École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

Centre de Recherche
en Biomédecine de Strasbourg | CRBS
Université de Strasbourg

Thèse présentée pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Science de la vie et de la santé (ED 414)

Spécialité : Science de la vie et de la santé

Présenté par

Adella KARAM

Caractérisation des phénotypes ciliaires cellulaires et contribution à la validation fonctionnelle de variants pathogènes de gènes de ciliopathies

Directeur de thèse : Mme le Professeur Hélène DOLLFUS

Co-directeur de thèse : M. le Docteur Jean MULLER

Laboratoire de Génétique Médicale, INSERM UMR-S 1112, Strasbourg

Thèse soutenue publiquement le 2 octobre 2023 devant le jury :

Co-directeur de thèse	M. le Docteur Jean MULLER, Strasbourg
Rapporter externe	Mme le Professeur Bénédicte DURAND, Lyon
Rapporteur externe	Mme le Docteur Isabelle PERRAULT, Paris
Examinateur interne	M. le Docteur Jocelyn LAPORTE, Strasbourg

École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

Centre de Recherche
en Biomédecine de Strasbourg | CRBS
Université de Strasbourg

Thèse présentée pour l'obtention du grade de :
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Science de la vie et de la santé (ED 414)
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présenté par
Adella KARAM

Caractérisation des phénotypes ciliaires cellulaires et contribution à la validation fonctionnelle de variants pathogènes de gènes de ciliopathies

Directeur de thèse : Mme le Professeur Hélène DOLLFUS
Co-directeur de thèse : M. le Docteur Jean MULLER

Laboratoire de Génétique Médicale, INSERM UMR-S 1112, Strasbourg

Thèse soutenue publiquement le 2 octobre 2023 devant le jury :

Co-directeur de thèse	M. le Docteur Jean MULLER, Strasbourg
Rapporter externe	Mme le Professeur Bénédicte DURAND, Lyon
Rapporteur externe	Mme le Docteur Isabelle PERRAULT, Paris
Examinateur interne	M. le Docteur Jocelyn LAPORTE, Strasbourg

Contrat doctoral financé par une bourse de l'école doctorale (concours MTR)

“To get something you’ve never had, you have to do something you’ve never done”
Thomas Jefferson

To the person I was 4 years ago!

Avant de débuter ce manuscrit, il me tient à cœur de remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnées et soutenues tout au long de cette aventure.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse **le Pr. Hélène Dollfus**, pour m'avoir donné l'opportunité de rejoindre le laboratoire en 2019 pour mon stage de Master 2. Vos conseils éclairés et votre capacité à me guider avec sagesse à travers les complexités de la recherche ont joué un rôle déterminant dans la réalisation de cette thèse. Votre passion pour votre travail et votre engagement envers l'excellence m'ont poussé à donner le meilleur de moi-même à chaque étape de ce processus. On m'a toujours dit que pour réussir il faut que l'opportunité rencontre le courage, j'ai donc eu le courage de quitter le Liban, cependant c'est grâce à l'opportunité que vous m'avez généreusement proposée que je me tiens ici aujourd'hui. Milles merci.

Ensuite, j'adresse un grand merci à mon co-directeur de thèse, le **Dr. Jean Muller,** pour son soutien et son suivi pendant mes 4 années au laboratoire. Jean, ta patience infaillible et ton attitude bienveillante, même lors des moments difficiles, ont été des piliers essentiels tout au long de mon aventure doctorale. J'ai également apprécié tous les moments de rires et de plaisanteries, surtout lors de nos participations aux congrès. Tous ces moments ont rendu le travail sérieux beaucoup plus léger et agréable. Je tiens tout particulièrement à te dire merci pour t'être autant investi dans nos discussions scientifiques, dans la relecture des articles et de mon manuscrit.

Je tiens également à remercier mes 2 rapporteurs externes, le **Pr. Bénédicte Durand** et le **Dr. Isabelle Perrault** d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, de lire et d'évaluer mon travail. Je remercie également le **Dr. Jocelyn Laporte** de m'avoir suivi en participant à mon comité de suivi de thèse pendant ma première et deuxième année et d'être revenu cette année pour ma soutenance.

Je tiens particulièrement à remercier le **Dr. Nicolas Le May,** le chercheur exceptionnel du laboratoire qui, malgré ces nombreuses responsabilités, a fait preuve d'une écoute inestimable et m'a prodigué des conseils précieux qui ont grandement orienté mon travail. Au-delà de ton engagement professionnel, je te remercie chaleureusement pour le lien personnel que nous avons tissé au fil du temps. J'ai énormément apprécié de partager tes expériences de vie, les plaisanteries, les rires, les verres levés. Tous ces bons moments resteront gravés comme de précieux souvenirs.

Un immense et chaleureux remerciement à **Clarisse Delvallée**. Comment aurais-je pu accomplir tout cela sans toi ? Ta formation dès mon arrivée au laboratoire a été inestimable, et ta présence a grandement facilité mon parcours. Ta passion pour ton travail est véritablement contagieuse, ta bonne humeur et tes « BONJOUR » tous les matins (plutôt tout au long de la journée) étaient un véritable moteur pour maintenir un environnement propice

à la productivité dans une très bonne ambiance. Tout simplement merci d'être là jusqu'à la dernière minute, tu es devenue bien plus qu'une collègue, tu es une sœur pour moi.

J'adresse un grand merci à M. **Pascal Kessler,** le responsable de la plateforme d'imagerie au CRBS. Ta contribution lors de nos réunions ainsi que ta disponibilité pour discuter des expériences et des défis liés à l'imagerie du cil ont été d'une aide inestimable. Merci de m'avoir appris les techniques d'imageries et d'avoir toujours trouvé des solutions aux problèmes rencontrés. C'était un grand plaisir de travailler avec toi, ta bonne humeur a enrichi nos réunions d'une atmosphère conviviale et animée.

Un sincère remerciement à **Gaëlle Hayot**, que j'ai eu le plaisir de rencontrer et qui a été présente au laboratoire pendant une brève période de ma thèse. Malgré cette courte durée, ta contribution s'est avérée essentielle pour certains projets, je tiens à exprimer ma gratitude pour ton apport précieux.

Je souhaite ensuite remercier mes collègues avec lesquels j'ai partagé mes journées au laboratoire au fils de ces 4 années :

Stéphane : merci pour les intéressantes discussions scientifiques que nous avons eu, merci pour ton écoute bienveillante et surtout merci pour les pâtisseries et les meringues délicieuses que tu nous préparent. Merci à **Éléonore** pour nos discussions animées qui m'ont toujours remonté le moral, en particulier lors des week-ends de travail au laboratoire. Merci à **Cathy**, qui malgré sa charge de travail trouvait toujours le temps pour me décongeler les cellules. Merci à **Samira, Marie et Raphaël** avec lesquels j'ai partagé mon bureau ainsi que les repas du midi. Nos échanges, nos histoires partagées et nos discussions sur une multitude de sujets (surtout sur les bonnes recettes de cuisine) m'ont permis de décompresser et de penser à autre chose que le travail.

J'aimerai exprimer ma gratitude envers les filles que j'ai rencontrées dans le cadre du travail et qui sont devenues de véritables amies au fils du temps. Les filles vous êtes au top*, thank you for making me feel home away from home*.

Laurie, je te remercie simplement d'être toi-même : une personne débordante d'énergie positive et de dévouement, ta présence et ta précieuse amitié a été une source inestimable de soutien moral tout au long de ces années (j'attends ta visite au Liban !!!!!!).

Amandine, merci d'être là, merci de m'avoir supportée et soutenue à travers tous mes états d'âmes, merci pour les sorties et les aventures de découverte que nous avons vécues ensemble ainsi que pour ta contribution essentielle à mon intégration sur les plans culturels et gastronomiques.

Manon, travailler avec toi pendant ton année de recherche au laboratoire a été un réel plaisir. Tu es une médecin et une maman exceptionnelle et j'ai eu la chance de bénéficier des deux.

Je te remercie du fond du cœur pour m'avoir soutenue durant les périodes de doute et de difficulté (surtout lors de la rédaction de ma thèse).

Caroline, je tiens à te remercier pour tous les moments que nous avons partagés. Merci pour nos sorties (notamment le shopping), pour les délices sucrés et les vidéos de « GusGus » qui égayaient nos journées au laboratoire. C'est un véritable bonheur de t'avoir rencontrée (PS : nous avons un voyage à organiser !!!!!!!).

Aurélie, bien que ton passage au laboratoire fût bref, ta présence était synonyme de joie, de bonne humeur et de rire à chaque instant.

Céleste, merci d'être une voisine bienveillante, tes messages spontanés arrivent toujours au moment parfait : toutes les balades et les repas partagés ensemble ont été une source de grand réconfort. Nos moments, durant lesquels nous échangions nos aventures, ont été essentiels pour m'apaiser l'esprit.

Ma reconnaissance s'adresse enfin à ma famille, mes amis et tous ceux qui m'ont soutenu moralement et émotionnellement tout au long de ce voyage académique :

Merci à mes amies du Liban, **Noelle** et **Antonella,** pour votre amitié solide : vos encouragements et votre soutien sont parvenus à traverser les kilomètres qui nous séparent et ont été d'une importance inestimable pour moi.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mon oncle **Elias**, ma tante **Florence** et mes cousins **Selma, Eva** et **Louis** pour m'avoir chaleureusement accueilli tout au long de mon séjour à Strasbourg. Le chemin qui m'a menée jusqu'ici a été empreint de défis, d'ajustements culturels et de découvertes passionnantes. Votre générosité, votre chaleur humaine et votre hospitalité ont illuminé ce chapitre important de ma vie. Votre confiance en mes capacités a été une source constante de motivation et m'a donné la volonté nécessaire pour surmonter les obstacles. Merci d'avoir été les compagnons de ce parcours, je serai éternellement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Merci à ma famille, mes parents **Georges** et **Ghada**, mes sœurs **Angelina** et **Mariella** et mon frère **Antoine**. Bien que séparés par des kilomètres, votre soutien a transcendé les frontières et les océans pour me guider tout au long de cette aventure académique. Vos mots d'encouragement, vos prières et vos pensées positives ont été une source de motivation inépuisable pour moi, me rappelant constamment que je n'étais pas seule dans ce voyage. Chaque étape de cette thèse a été marquée par votre présence virtuelle, vos conversations réconfortantes et votre soutien émotionnel. Merci à mes neveux et à ma nièce qui ont toujours eu le pouvoir de me dessiner un sourire sur mon visage : vous êtes adorable, je vous aime.

Merci au reste de la famille, mes tantes, mes oncles, mes cousines et cousins**, Joyce, Maria, Reine, Serge, Antoine, Charbel, Michael…** (je ne peux pas tous vous citer mais le cœur y est)

qui ont toujours su me témoigner leur fierté, me booster pendant mes vacances en m'encourageant à persévérer dans ce que j'ai entrepris.

Finalement, je veux transmettre un grand merci à tous mes grands-parents et avoir une précieuse pensée pour mon **papi Edward** qui n'a jamais manqué une occasion de m'exprimer sa fierté en croyant en moi et me conseillant toujours de viser plus haut : tu resteras à jamais gravé dans mes pensées.

Finalement, j'exprime ma gratitude éternelle au Liban, ma patrie et ma vie et à la France, qui l'a enrichie de nouveaux horizons.

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADPKD: autosomal dominant polycystic kidney disease

ARL13B: ADP-ribosylation factor-like protein 13B

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messager

ARPKD: autosomal recessive polycystic kidney disease

ATD: Asphyxiating thoracic dystrophy

BBS: Bardet-Biedl syndrome

CCT : chaperone-containing T- complex polypeptide1

CDK10: Cyclin-Dependent Kinase 10

Co-IP: Co-immunoprécipitation

CRMR : centre de référence maladies rares

DHH: Desert-Hedgehog

DIC : differential interference contrast

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP: désoxy nucléotides tri-phosphate

DPI : Diagnostic Pré Implantatoire

DPN : Diagnostic Pré Natal

ECL: enhanced chemiluminescent

ERC: endocytic recycling compartment

ERG : électrorétinogramme

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GLI: Glioma-associated oncogene homolog

GPCR: G protein-coupled receptor

GTPase : Guanosine Triphosphate phosphatase

IF: immunofluorescence

IFT: Intraflagellar Transport

IHH: Indian-Hedgehog

iPSC: induced Pluripotent Stem Cell

KD: Knock-Down

KI: Knock-In

KO: Knock-Out

MC: Mother Centriole

MO: Morpholinos

MR: Maladies Rares

MZSDS: Mainzer-Saldino Syndrome

NGS : Next Generation Sequencing

NPHP1: Nephronophthisis 1

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS: Outer Segment

pb : paire de base

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCD: Primary Ciliary Dyskinesia

PCM: Pericentriolar Material

PCR: Polymérase Chain Reaction

PFA : Paraformaldéhyde

PH : Pleckstrine Homology

PI (PtdIns) : Phosphatidylinositol

PI3K: Phosphoinositides 3-kinases

PS : Pénicilline et Streptomycine

PVDF : PolyVinyliDene Fluoride

RhoA: Ras homolog family member A

rhSHH: recombinant Human Sonic HedgeHog

RIPA: Radio-Immunoprecipitation Assay

RP : Rétinopathie Pigmentaire

RT : Reverse Transcription

RT: Room Temperature

SAG: Smo Agoniste

SHH: Sonic-Hedgehog

SMO : Smoothened

SUFU : Suppresseur de *fused*

TBS-T: Tris Buffered Saline-Tween

TGS: Tris-Glycine-SDS

TPR : Tetratricopeptide Repeat

TZ : Transition Zone

VPS34: Vacuolar Protein Sorting 34

VPS15: Vacuolar Protein Sorting 15

VSI : Variant de Signification Incertaine

WB: Western Blot

WT: Wild Type

Introduction 1

I. Les maladies génétiques rares 1

A. Définition : 1

B. Classement des maladies génétiques rares 3

1. Prise en charge des maladies génétiques rares : 5

C. Les affections génétiques ophtalmologiques 7

II. Les cils 9

A. Structure des cils 11

B. Localisations des cils 13

C. Fonctions des cils 14

D. Un cil spécialisé dans sa structure, localisation et fonction : le cil primaire des photorécepteurs 15

E. Le cil primaire 16

1. Ciliogénèse 16

2. Le trafic des protéines ciliaires 20

- Le transport intraflagellaire (IFT) 22
- BBSome 24
- Le complexe chaperonin-like 26

3. La fonction du cil primaire 28

- La voie Sonic Hedgehog SHH 29

III. Les ciliopathies 33

A. Définition 33

B. Le syndrome de Bardet-Biedl 36

1. Le phénotype du BBS 36

2. Les signes cliniques majeurs du BBS 37

3. Les gènes impliqués dans le BBS 39

IV. La Recherche translationnelle 44

A. Le diagnostic clinique 46

1. La difficulté du diagnostic clinique dans le cadre du BBS 46

B. Le diagnostic moléculaire 47

C. Stratégie diagnostique 48

D. Classification des variants et outils de prédictions 50

E. Les tests fonctionnels pour valider l'implication des variants dans la pathologie 53

V. Les problématiques 57

Projet 1 : Développement de tests fonctionnels (« boite à outils ciliopathies ») pour l'identification des phénotypes cellulaires ciliaires 61

I. Synopsis 61

II. Mise au point de la « boite à outil ciliopathies »..... 62
A. Sélection des contrôles..... 62
B. Ciliogénèse (nombre de cellules ciliées)..... 63
A. Longueur du cil..... 63
B. Etude de la voie SHH..... 65
C. Prolifération cellulaire..... 67

III. Conclusion..... 68

Projet 2 : Validation fonctionnelle de variants candidats et étude comparative du phénotype ciliaire pour différents gènes BBS : application de la « boite à outils ciliopathies ». 69

Projet portant sur *BBS5*.....*69*

I. Introduction du gène *BBS5*..... 69

II. Synopsis..... 71

III. Article..... 72

IV. Données supplémentaires non publiées..... 73
A. Etude de la voie SHH au niveau protéique..... 73
1. Quantification de GLI2 et PTCH1 par WB..... 73
2. Translocation de SMO dans le cil..... 76
B. Test de prolifération cellulaire..... 77
C. Test de complémentation (rescue)..... 78
1. La lipofection..... 79
2. La magnétofection..... 82
D. Conclusion..... 83

Le projet portant sur l'étude comparative des phénotypes ciliaires BBS.....*85*

I. Introduction..... 84
E. Le gène BBS10..... 86
F. Le gène *IFT172/BBS20*..... 88

II. Le synopsis..... 90

III. Article..... 93

Projet 3 : Application de la « boite à outil ciliopathie » pour valider des variants de gènes responsables de maladies génétiques rares avec une atteinte du cil primaire. 94

Projet portant sur PIK3C2A 95

I. Introduction..... 94
A. La famille des PI3K..... 94

1. Les PI3K de classe I 95
2. Les PI3K de classe II 96
3. Les PI3K de classe III 97
B. Les pathologies associées au défaut du métabolisme des PI 97
C. PIK3C2A/PIK3C2α 98
1. Rôle de PIK3C2A dans le cil primaire 99
2. Le syndrome lié à *PIK3C2A* 101

II. Synopsis 102

III. Article 103

Projet portant sur CDK10 105

I. Introduction 104
A. Le gène *CDK10* 104
B. Rôle de CDK10 dans le cil primaire 105
C. Le syndrome d'Al Kaissi 107

II. Synopsis 108

III. Article 109

Discussion générale 110

I. Diagnostic clinique 111

II. Diagnostic moléculaire/génétique 112
A. Séquençage à haut débit (panel et WES) 113
B. Le génome complet (WGS) 113
C. La cartographie optique 114
D. Les gènes modificateurs 116

III. Les Tests fonctionnels pour valider les VSI 118
A. Modèles d'étude cellulaire 119
1. Les iPSC et les organoïdes 119
2. Les PBMC 121
3. Les UREC 122
B. Etude du phénotype ciliaire 123
1. Ciliogénèse et longueur du cil 123
2. Automatisation de l'analyse des résultats 124
3. Etude de la voie SHH 125
4. Les tests de complémentation (sauvetage du phénotype) 128

IV. Peut-on considérer que toutes les pathologies qui présentent des anomalies ciliaires sont des ciliopathies ? Finalement, qu'est-ce qu'une ciliopathie ? 129

Conclusions et perspectives.....132

Références 134

Annexes : Matériels et Méthodes.....168

I. Les méthodes 168
A. Culture cellulaire.....168
1. Induction de la ciliogénèse.....168
2. Stimulation de la voie SHH 168
B. Validation des variants génétiques 168
1. Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc.....168
2. Design des amorces.....168
3. PCR et RT-PCR 169
4. Séquençage Sanger 170
C. Etude de l'expression génétique 170
1. RT-qPCR, PCR quantitative en temps réel.....170
D. Etude de l'expression protéique.....170
1. Extraction de protéines totales 170
2. Extraction différentielle de protéine 171
3. Western blot.....171
E. Etude de la fonction enzymatique (kinase) 172
1. Extraction lipidique et ELISA.....172
F. Immunofluorescence.....172
G. Test de prolifération cellulaire.....173
H. Expériences de complémentation.....173
1. La lipofection 173
2. La magnétofection.....175

II. Le matériel 178
A. Tableau 4 : Liste des amorces.....178
B. Tableau 5 : Liste des anticorps.....179
C. Tableau 6 : Liste des bases de données et des logiciels 180

Figure 1 : Stratification des maladies rares et étapes de l'évaluation. 2
Figure 2 : Regroupement des maladies génétiques rares en fonctions des organes et systèmes affectés. 5
Figure 3 : La rétine 9
Figure 4 : Aperçu des différents types de cils et de flagelles observé par microscopie électronique 11
Figure 5 : Représentation de la structure du cil. 13
Figure 6 : Les deux types de cils et leurs localisations dans le corps humain.. 14
Figure 7 : Le cil primaire des photorécepteurs. 16
Figure 8 : Représentation de la ciliogénèse dépendante du cycle cellulaire.. 18
Figure 9 : Les deux voies de la ciliogénèse. 19
Figure 10 : Les complexes BBS dans le cil primaire.. 21
Figure 11 : Les IFT.. 23
Figure 12 : Le BBSome.. 26
Figure 13 : La voie SHH à travers le cil primaire. 32
Figure 14 : L'hétérogénéité phénotypique des ciliopathies. 34
Figure 15 : L'hétérogénéité génétique des ciliopathies. 35
Figure 16 : Le phénotype typique BBS.. 37
Figure 17 : Les protéines BBS.. 42
Figure 18 : Le pourcentage de patient mutés pour chacun des gènes BBS.. 43
Figure 19 : La recherche translationnelle. 45
Figure 20 : Stratégie du diagnostic moléculaire.. 50
Figure 21 : Les critères de classification des variants selon l'ACMG/AMP.. 53
Figure 22 : Du test génétique à la validation fonctionnelle.. 56
Figure 23 : Ciliogénèse des fibroblastes cutanés de contrôles. 64
Figure 24 : Longueur du cil chez les contrôles.. 65
Figure 25 : Etude de la voie SHH dans les fibroblastes cutanés des contrôles. 66
Figure 26 : Test de prolifération des fibroblastes cutanés des contrôles.. 67
Figure 27 : BBS5.. 70
Figure 28 : Extraction différentielle de protéines et quantification de GLI2. 74
Figure 29 : Quantification de PTCH1.. 75
Figure 30 : Activation de la voie SHH avec le ligand rhSHH. 77
Figure 31 : Test de prolifération des fibroblastes cutanés *BBS5*. 78
Figure 32 : Transfection des HEK avec la lipofectamine 3000. 79
Figure 33 : Transfection des HEK avec l'X-tremeGENE 9 DNA. 80
Figure 34 : Transfection des HEK et fibroblastes avec l'X-tremeGENE™ HP. 81
Figure 35 : Transfection des fibroblastes avec la Lipofectamine LTX and PLUS™ Reagent. 82

Figure 36 : Magnétofection des fibroblastes de contrôles. 82
Figure 37 : BBS1. 86
Figure 38 : BB10. 87
Figure 39 : Caractérisation du gène *IFT172* de *Chlamydomonas* et de sa protéine. 90
Figure 40 : La famille des PI3K. 95
Figure 41 : Structure des isoformes de PI3K classe II. 97
Figure 42 : Rôle de PIK3C2A dans le cil primaire. 101
Figure 43 : CDK10. 105
Figure 44 : Rôle de CDK10 dans le cil primaire. 106
Figure 45 : Proposition de classification des ciliopathies. 131
Figure 46 : La magnétofection. 176
Figure 47 : Carte des plasmides. 177

Tableau 1 : Liste des outils en ligne. 7
Tableau 2 : Liste des gènes BBS.. 41
Tableau 3 : Liste des contrôles avec leurs caractéristiques 62
Tableau 4 : Liste des amorces 178
Tableau 5 : Liste des anticorps 179
Tableau 6 : Liste des bases de données et des logiciels 180

I.

Introduction

I. Les maladies génétiques rares

A. Définition :

Les maladies rares ont émergé comme un sujet de santé publique durant les années 1990 en France et dans tous les pays occidentaux. Le progrès de l'espérance de vie a été très net pour les enfants entre le début du XIXe siècle et la fin du XXe. La mort d'un enfant était fréquente et admise dans le cours de la vie jusqu'au début du XIXe siècle (près de 35% d'une génération mouraient avant 5 ans en 1900) et elle est devenue une exception – voire un scandale – à la fin du XXe siècle avec moins de 5 décès pour mille enfants avant cinq ans. Et de ce fait, les pathologies létales de l'enfance, diverses, chroniques, et rares, sont devenues une priorité de santé. Les maladies rares ont une définition épidémiologique qui est inscrite dans la loi, notamment dans celle de la santé publique de 2004 (LOI n° 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique (1) - Légifrance (legifrance.gouv.fr)) : Ainsi la prévalence, est un indicateur épidémiologique qui vient définir une maladie. Le terme "maladie rare" est utilisé pour décrire les affections qui touchent une proportion de la population très minoritaire. Le terme "maladie orpheline" est utilisé pour décrire une maladie rare pour laquelle il n'existe pas de traitement spécifique, c'est-à-dire qu'il n'y a pas encore de traitement permettant de guérir cette maladie. Selon l'Organisation pour les maladies rares - Inde (ORDI), trois éléments permettent de déterminer si une maladie donnée est rare pour un pays : (1) le nombre total de personnes atteintes de la maladie, (2) la prévalence de la maladie et (3) la non-disponibilité d'un traitement pour cette maladie. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), une maladie rare est une maladie dont la fréquence est inférieure à 6,5-10 pour 10 000 personnes. Aux États-Unis, toute maladie ou affection touchant moins de 200 000 personnes est considérée comme rare (http://www.fda.gov, mai 2017). Au Japon, la fréquence définie est de 50 000 et en Chine une maladie est considérée comme rare si elle touche moins de 1/500 000 personnes ou si la morbidité néonatale est inférieure à 1/10 000. En Europe, les maladies rares sont décrites comme affectant moins d'une personne sur 2000 (https://fondation-maladiesrares.org/les-maladies-rares/). Ainsi, la manière la plus appropriée pour un pays de définir une maladie particulière comme rare est de tenir compte de sa population, de son système de soins de santé et de ses ressources (Sharma et al., 2022). Les statistiques suggèrent que collectivement, 8% à 10% de la population est touché par les maladies rares (California Healthcare Institute : http://califesciences.org/) (Pogue et al., 2018). Bien que les termes soient souvent utilisés de manière interchangeable, les maladies orphelines ont été longtemps peu considérées avant les années 2000. Le portail Orphanet sur les maladies rares et les médicaments orphelins (http://www.orpha.net) répertorie 6172 maladies dans sa base de données (Août 2023). Dans ce contexte, les maladies rares représentent un impact significatif sur la santé et à ce titre des ressources importantes ont été mises à disposition des professionnels de la santé pour soutenir leur diagnostic, leur gestion et leur traitement (Pogue et al., 2018).

Selon une étude réalisée par l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) en collaboration avec Orphanet, la prévalence globale des maladies rares en France

est estimée à environ 3,5 % de la population, soit environ 2,4 millions de personnes sachant que le nombres d'habitants en France en 2023 est de 68 millions. Cela inclut les maladies génétiques rares ainsi que d'autres maladies rares non génétiques. (Inserm. Les maladies rares en France : état des lieux, enjeux et perspectives. 2017). La prévalence spécifique des maladies génétiques rares peut être inférieure à cette estimation globale. Les données épidémiologiques sur les maladies génétiques rares sont constamment mises à jour au fur et à mesure que de nouvelles recherches et études sont menées.

Environ 80% des maladies rares sont d'origine génétique, les autres sont causées par des infections (bactériennes ou virales), des allergies ou des facteurs environnementaux (https ://fondation-maladiesrares.org/les-maladies-rares/). Les maladies génétiques rares sont des affections héritées qui sont causées par des altérations ou des mutations dans les gènes. Le plus souvent, elles sont sévères, chroniques, d'évolution progressive et affectent considérablement la qualité de vie des personnes malades. Elles entrainent un déficit moteur, sensoriel ou intellectuel dans 50% des cas et une perte totale d'autonomie dans 9% des cas. Les maladies rares affectent un nombre restreint de personne et se caractérisent par une vaste palette de symptômes, qui varient d'une maladie à l'autre, mais aussi d'un patient à l'autre pour une même maladie.

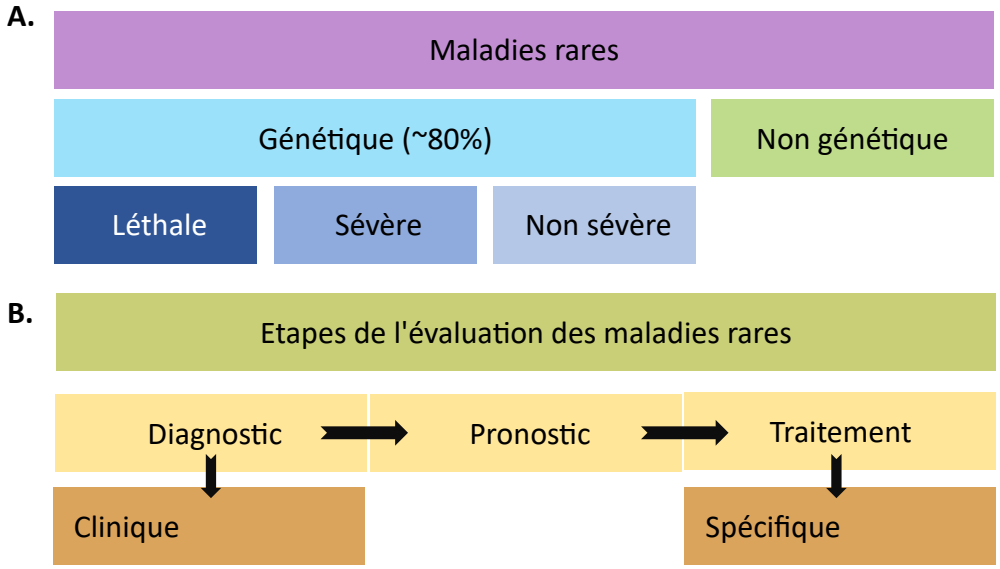


Figure 1 : Stratification des maladies rares et étapes de l'évaluation. **A.** Les maladies rares peuvent être divisées en maladies héritées génétiquement et en maladies non héritées génétiquement, qui peuvent présenter différents degrés de gravité. **B.** Les étapes du diagnostic des maladies rares sont essentielles, car une fois le diagnostic posé, le professionnel de santé peut évaluer le pronostic du patient et les options thérapeutiques, qui peuvent être spécifiques à la maladie traitée ou non spécifiques, en se concentrant sur l'atténuation des symptômes de la maladie (Adapté de (Pogue et al., 2018)).

B. Classement des maladies génétiques rares

Les maladies génétiques rares peuvent être classées de différentes manières en fonction de différents critères. Voici quelques approches courantes sachant qu'il est important de noter que ces classifications peuvent se chevaucher et qu'il peut y avoir des nuances dans chaque catégorie de classification :

Par mode de transmission génétique : Les maladies génétiques rares peuvent être transmises de différentes manières en fonction du type de mutation génétique et du mode d'hérédité spécifique. Voici quelques exemples de modes de transmission courants des maladies génétiques rares :

- Transmission autosomique récessive : dans ce cas, la maladie est causée par une mutation présente sur les deux copies d'un gène autosomique non sexuel. Les parents porteurs sains, c'est-à-dire ayant une copie mutée et une copie normale du gène, n'ont généralement pas de symptômes. Cependant, ils ont une probabilité de 25% d'avoir un enfant atteint si les deux parents sont porteurs de la mutation. Un exemple de maladie génétique rare récessive est le syndrome de Bardet-Biedl (Elawad et al., 2022; Tsang et al., 2018).
- Transmission autosomique dominante : dans ce cas, la maladie est causée par une mutation présente sur une seule copie d'un gène autosomique non sexuel. Les personnes atteintes ont un parent atteint qui transmet la mutation avec une probabilité de 50%. Par exemple la maladie de Huntington (McColgan and Tabrizi, 2018), et le syndrome de Kartagener (primary ciliary dyskinesia) (Zurcher and Kawashima, 2021).
- Transmission liée à l'X récessive : Dans ce cas, la maladie est causée par une mutation présente sur un gène du chromosome X. Comme les hommes ont un seul chromosome X, ils sont plus susceptibles d'être atteints de maladies liées à l'X que les femmes. Les femmes peuvent être porteuses de la mutation sans présenter de symptômes, mais elles ont une probabilité de 50% de transmettre la mutation à leurs fils. Un exemple de maladie génétique rare liée à l'X est le syndrome de Nephronophthisis 1 (NPHP1) (König et al., 2017)

Par type de variation génétique : les maladies génétiques rares peuvent également être classées en fonction du type de variant génétique. Cela peut inclure des variants faux-sens (changement d'un seul nucléotide dans la séquence de l'ADNg qui entraine le changement d'un acide aminé dans la séquence protéique) qui sont la plupart du temps considérés comme étant des variants de signification incertaine (VSI). Parmi les autres types de variations, on retrouve des non-sens (changement d'un seul nucléotide dans la séquence de l'ADNg qui entraine l'apparition d'un codon stop prématuré)en général il s'agit de variants délétères, des délétions (perte de matériel génétique, en phase ou pas, causant un décalage du cadre de lecture « frameshift » et l'apparition d'un codon stop prématuré, des duplications (réplication de segments génétiques), des translocations (échange de segments génétiques entre différents chromosomes) etc.

Par défaut génétique sous-jacent : Cette approche de classification regroupe les maladies génétiques rares en fonction de la mutation spécifique dans un gène particulier. Par exemple, les maladies telles que la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchenne et la neurofibromatose sont classées selon les gènes spécifiquement mutés (*CFTR*, *DMD*, *NF1* respectivement).

Par organe ou système affecté : certaines maladies génétiques rares affectent spécifiquement un organe ou un système particulier du corps. Par exemple, les maladies génétiques rares peuvent se concentrer sur le système nerveux, le système musculaire, le système cardiovasculaire, le système oculaire, etc.

- Maladies neurologiques héréditaires : ce groupe comprend des maladies telles que l'ataxie cérébelleuse, la maladie de Huntington, l'amyotrophie spinale, l'adrénoleucodystrophie, la neurofibromatose, la maladie de Charcot-Marie-Tooth et de nombreuses autres maladies neurodégénératives (Morena et al., 2019; Pedroso et al., 2019).
- Maladies génétiques du système musculosquelettique : ce groupe comprend des maladies comme la dystrophie musculaire de Duchenne, la myopathie de Becker, l'ostéogenèse imparfaite (ou maladie des os de verre), l'achondroplasie, l'ostéopétrose et d'autres troubles du développement osseux et musculaire (Baalann and Krishnan, 2022; May et al., 2020) .
- Maladies génétiques du système cardiovasculaire : cela comprend des conditions telles que la cardiomyopathie hypertrophique, la dysplasie arythmogène du ventricule droit, les troubles du rythme cardiaque héréditaires, les malformations cardiaques congénitales et d'autres maladies cardiovasculaires d'origine génétique (Sun et al., 2015; Teekakirikul et al., 2019).
- Maladies génétiques du système oculaire (maladies sensorielles) : cela inclut les maladies qui affectent la structure ou la fonction des tissus oculaires telles que la rétinopathie pigmentaire, la cataracte congénitale, le syndrome de Lyell, le syndrome de Bardet-Biedl, la dystrophie de cornée et d'autres (Liu et al., 2022; Louison et al., 2019).

En France, il existe 23 filières de santé maladies rares (FSMR) dont les objectifs dans un groupe de pathologies sont l'amélioration de la prise en charge des malades, la coordination de la recherche fondamentale, translationnelle, clinique et organisationnelle, le développement de l'enseignement, de la formation et de l'information tout en garantissant une coordination avec les structures européennes (https://www.filieresmaladiesrares.fr/). Ces groupes de pathologies sont représentés dans la (

Figure 2). Le laboratoire de Génétique Médicale s'intéresse en particulier aux maladies sensorielles qui sont prises en charge par la filière SENSGENE, c'est donc sur certaines de ces pathologies que j'ai travaillé pendant ma thèse.

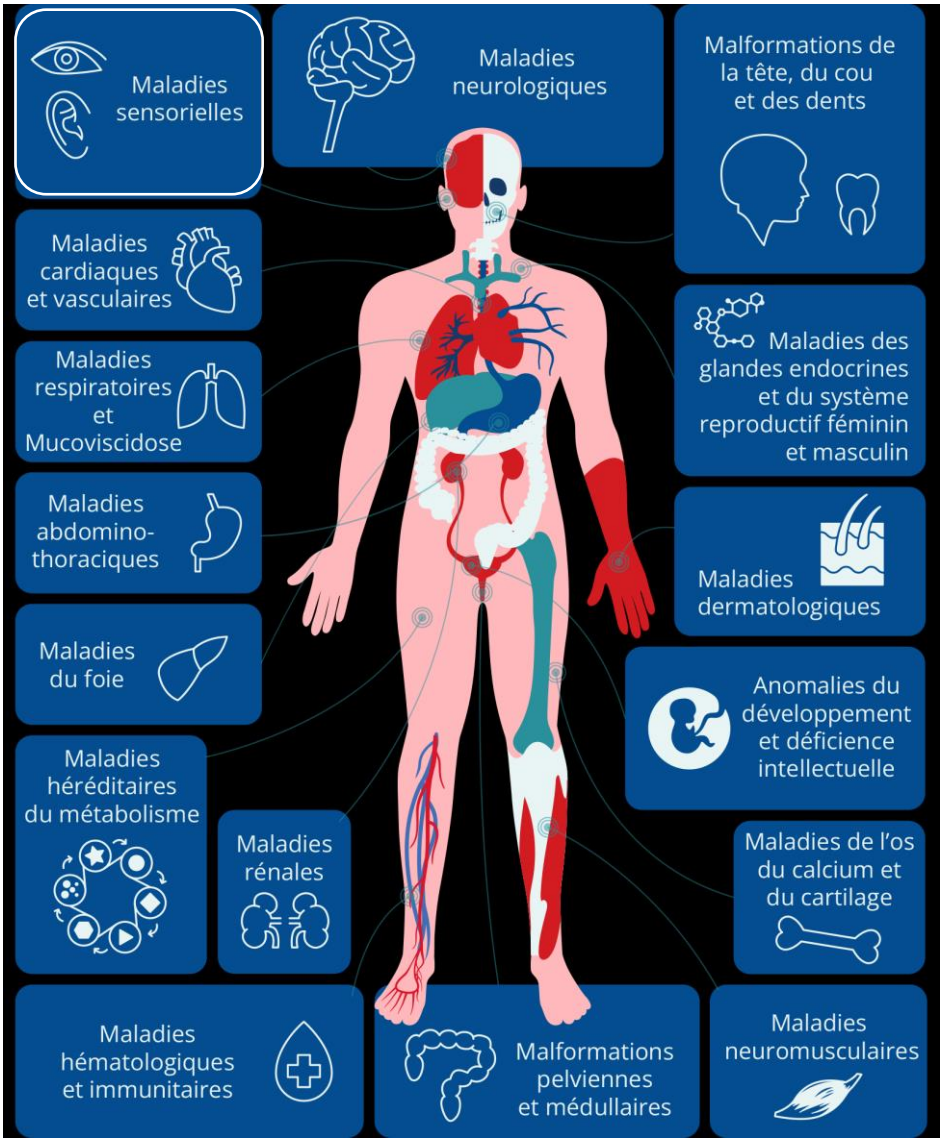


Figure 2 : Regroupement des maladies génétiques rares en fonctions des organes et systèmes affectés. Le laboratoire de Génétique Médiale s'intéresse aux maladies sensorielles prise en charges par la filière SENSGENE (https://www.filieresmaladiesrares.fr/#corpshumain).

1. Prise en charge des maladies génétiques rares :

Les maladies génétiques rares posent des défis en termes de diagnostic précis et de prise en charge médicale. Les patients atteints de ces maladies peuvent rencontrer des difficultés pour obtenir un diagnostic approprié en raison de la méconnaissance de la maladie ou du manque

de tests spécifiques. De plus, les traitements spécifiques sont souvent limités ou inexistants, ce qui rend la prise en charge de ces maladies particulièrement complexe (Azie and Vincent, 2012). À ce jour, 5 000 à 8 000 maladies rares ont été reconnues, ces derniers sont une priorité de santé dans les pays développés prises collectivement elles constituent une part importante des maladies chroniques et invalidantes (affectent 8 à 10% des populations).

Afin d'améliorer et d'organiser la prise en charge de ces dernières, la France a mis en place depuis 2004, 3 plans nationaux de santé (PNMR) qui ont structurés l'accès aux soins avec la création de centres de référence maladies rares (CRMR) et permis aux laboratoires de diagnostic génétique de s'équiper en séquenceur à haut débit.

Ils ont tous des impacts mesurables sur la santé des patients concernés. Ils disposent d'une production scientifique très substantielle et de recrutements de patients très importants.

Par rapport aux maladies courantes et complexes qui touchent des centaines de millions de personnes, comme le diabète ou le cancer entre autres, les maladies rares peuvent ne pas susciter le même intérêt de la part du grand public, des communautés médicales et de recherche et des entreprises pharmaceutiques. En outre, le fait que le développement de médicaments en général soit compliqué, long et coûteux, avec des taux de réussite extrêmement faibles, complique encore la situation (He et al., 2022). Dans ce contexte, les médicaments orphelins sont définis comme des composés utilisés pour traiter des maladies rares (Huyard, 2009). A savoir qu'il existe actuellement des registres nationaux des maladies rares en Amérique du Nord et en Europe, tandis que certains pays comme la France disposent de registres spécifiques pour certains pathologies ou groupes de pathologies.

Pour résumer, les principales préoccupations des personnes souffrant de maladies génétiques rares sont le diagnostic, le traitement, la réadaptation, les ressources limitées et les infrastructures de santé. En outre, comme le nombre de personnes souffrant de ces troubles est faible, il devient difficile d'étudier la distribution épidémiologique et l'évolution naturelle de la maladie. Il était donc nécessaire d'établir des registres pour ces maladies rares. Cela a permis de créer des bases de données spécifiques sur les patients souffrant de la même pathologie (atteinte oculaires, squelettique, cardiaque, etc) ce qui est avantageux tant pour les patients que pour les chercheurs et les professionnels de santé. Pour les patients, il s'agit d'outils indispensables qui leur permettent d'identifier et de rencontrer des familles souffrant de problèmes similaires, de bénéficier de services de réadaptation et d'accéder à des essais cliniques visant à mettre au point de nouveaux traitements pour ces maladies rares. Du point de vue des chercheurs, il est bénéfique car ils auront accès à un ensemble de données qui pourront être utilisées comme point de départ de la recherche sur ces maladies rares.

Afin de hiérarchiser cette masse de données, de nombreuses bases de données sous la forme de sites web sont accessibles afin d'avoir accès à l'information autour des différentes maladies rares incluant les informations cliniques, génétiques et médicales ainsi que la littérature scientifique. Une sélection est proposée ci-dessous (Tableau 1). Les outils et des plateformes mentionnés facilitent le diagnostic et la sélection de traitements spécifiques disponibles ou

même d'essais cliniques en cours pour des maladies spécifiques (Mateus et al., 2017; Rubinstein et al., 2010; Taruscio et al., 2015).

Ressource	Lien	Objectif de la ressource
Eurordis	https://www.eurordis.org	Fourni des informations sur des maladies génétiques rares spécifiques
GeneReviews®	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/	Outil permettant de s'informer sur une maladie génétique donnée et sur les tests génétiques et la prise en charge clinique
NORD	https://rarediseases.org/	Créée dans le but de soutenir les patients et les familles atteints de maladies orphelines et rares, afin de promouvoir la recherche et le développement de traitements pour les maladies rares.
OMIM	https://www.omim.org/	Catalogue public en ligne décrivant les syndromes génétiques et les gènes. Il fournit l'historique des recherches, des informations phénotypiques, ainsi que des données concernant le mode de transmission de l'hétérogénéité génétique.
Orphanet	http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php	Fournit des descriptions de maladies rares ainsi qu'un outil d'aide au diagnostic et des informations sur les composés pharmacologiques disponibles pour ces maladies
PatientsLikeMe	https://www.patientslikeme.com/	Offre un forum aux patients souffrant de différents troubles afin qu'ils puissent partager leurs expériences et trouver de l'aide pour eux-mêmes.
Phenome Central	https://phenomecentral.org/	L'objectif de cette ressource est de mettre en relation les chercheurs travaillant sur des cas similaires susceptibles d'avoir la même étiologie génétique en combinant les informations génotypiques et phénotypiques.
GenIDA	https://genida.unistra.fr/	Une plateforme participative pour la recherche sur les troubles neurodéveloppementaux

Tableau 1 : Liste des outils en ligne et assistés par ordinateur disponibles pour aider au diagnostic et à la gestion des maladies génétiques rares adapté de (Pogue et al., 2018).

C. Les affections génétiques ophtalmologiques

Parmi les maladies génétiques rares, les affections rares en génétique ophtalmologique font référence à un groupe de maladies oculaires héréditaires qui sont peu fréquentes dans la population générale. Ces affections sont souvent causées par des variations pathogènes génétiques spécifiques qui affectent la structure ou la fonction des tissus oculaires, tels que la rétine, l'iris, la cornée, etc (Figure 3A). Ces maladies peuvent entraîner une altération de la vision qui peut être progressive et commencer à plusieurs âges (enfance ou adulte par exemple), une sensibilité à la lumière accrue, des anomalies de la pigmentation oculaire, et

d'autres symptômes spécifiques à chaque affection. Le besoin d'identification et de surveillance des maladies oculaires rares ne cesse de croître car la déficience visuelle et la cécité sont des problèmes de santé publique majeurs.

- Les dystrophies héréditaires de la rétine (DHR)

Parmi l'ensemble des affections génétiques ophtalmologiques, je m'intéresse aux dystrophies héréditaires de la rétine (DHR). La rétine est un tissu sensoriel multicouche qui tapisse le fond de l'œil. Comme le résume la Figure 3A, la rétine se compose de 10 couches contenant 3 types cellulaires majeurs : les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires dont le regroupement des axones forme le nerf optique. Sa fonction principale est de transformer les signaux lumineux en signaux électriques qui seront acheminés jusqu'au cerveau via le nerf optique, ce processus est connu sous le nom de la phototransduction. Les éléments sensibles à la lumière de la rétine sont les cellules photoréceptrices. La rétine contient deux types de photorécepteurs, les bâtonnets (96%) et les cônes (4%). Les bâtonnets sont les photorécepteurs majoritaires de la rétine, (environ 120 millions dans l'œil humain) sont responsables de la vision nocturne. Tandis que les cônes (6 à 7 millions dans l'œil humain) sont responsables de l'acuité visuelle et de la vision des couleurs. Chez l'homme, les cônes sont regroupés au niveau d'une zone centrale appelée macula. Les dystrophies héréditaires de la rétine, qui comptent parmi les maladies génétiques les plus courantes chez l'homme, définissent un groupe cliniquement hétérogène de troubles qui entraînent une perte de la vision due à un développement incorrect, à un dysfonctionnement ou à la mort prématurée des photorécepteurs de la rétine (Duncan et al., 2018). Les dystrophies héréditaires de la rétine (DHR) se distinguent par plusieurs facteurs, notamment le type et la localisation des cellules affectées et le moment de l'apparition de la maladie. Elles peuvent exister sous une forme isolée ou non-syndromique et ne toucher que l'œil. La forme la plus courante est la rétinite pigmentaire (RP) (également connue sous le nom de dystrophie cône-bâtonnet) (Verbakel et al., 2018). La RP est causée par une dégénérescence progressive des photorécepteurs. La disparition de cette couche de cellules est visualisable par l'examen du fond de l'œil car la couche de l'epithélium pigmentaire devient visible. Cette dégénérescence progressive cause une déficience visuelle sévère qui peut aboutir à une cécité à long terme (Figure 3B). Parmi les autres formes isolées, on peut citer la dystrophie cône/cône-bâtonnet (CD/CRD) (Thiadens et al., 2012), l'amaurose congénitale de Leber (ACL) (Kumaran et al., 2017), la dystrophie maculaire (MD) et l'achromatopsie (monochromatisme des bâtonnets) (Tsang and Sharma, 2018), et d'autres. Les dystrophies héréditaires de la rétine sont également l'un des groupes de troubles les plus hétérogènes sur le plan génétique chez l'homme, avec plus de 260 gènes identifiés à ce jour (RetNet : https://sph.uth.edu/retnet/).

Alors que dans la plupart de ces dystrophies, la maladie se limite à l'œil (forme non syndromique dite isolée), plus de 80 formes de DHR syndromiques ont été décrites. Environ 200 gènes sont associés à ces syndromes (Tatour and Ben-Yosef, 2020). Dans les formes syndromiques, la RP est souvent associée à d'autres manifestations extra-oculaires comme des

malformations squelettiques, des troubles du développement, des anomalies rénales et d'autres. La majorité des dystrophies rétinienne syndromiques (DRS) sont rares et ont un mode de transmission récessif. La plupart de ces DRS peuvent être classées dans l'un des deux grands groupes de maladies : les erreurs innées du métabolisme (IEM) et les ciliopathies. Les IEM sont des maladies génétiques entraînant une défaillance du métabolisme des glucides, du métabolisme des protéines, de l'oxydation des acides gras ou du stockage du glycogène (Ferreira and van Karnebeek, 2019). Le terme « ciliopathie » regroupe des pathologies humaines causées par une anomalie du cil consécutive à des variations pathogènes dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation et la fonction des cils.

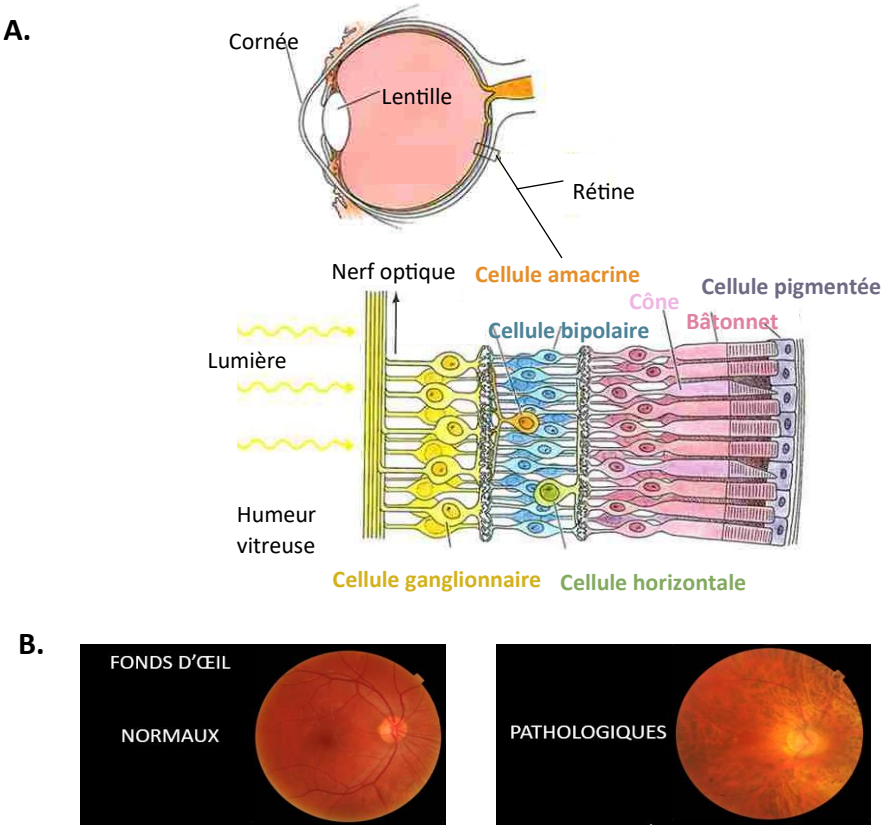


Figure 3 : A. La rétine traite l'information visuelle par l'intermédiaire d'un réseau de cinq couches de neurones : cellules ganglionnaires, cellules amacrines, cellules horizontales, cellules bipolaires et photorécepteurs (cônes et bâtonnets) (Adapté de http://physiqueclaudeb.free.fr). **B.** La différence entre un fond d'œil normal et un fond d'œil dans le cas d'une rétinopathie pigmentaire (observation d'un dépôt de pigments noir au niveau de la rétine).
(Adapté de https://www.oph78.fr/ophtalmologie/anatomie-oeil)

II. Les cils

La quasi-totalité des cellules eucaryotes présentent à leur surface une extension de la membrane plasmique communément appelée le cil (Singla and Reiter, 2006). Le cil a été observé pour la première fois chez les protozoaires en 1674 par le hollandais Antoni Van Leewenhoek avec les débuts de la microscopie (Lane, 2015) : Le cil observé permettait à ces protozoaires de se déplacer dans l'eau. L'étude du cil a évolué avec l'amélioration des techniques de la microscopie et notamment la microscopie électronique qui a permis aux scientifiques de découvrir la structure du cil motile et de pouvoir ainsi observer les défauts de

structure en cas d'anomalie. C'était le cas pour la première fois en 1976 où quatre patients produisant des spermatozoïdes immobiles ont été étudiés. Chez trois d'entre eux, il n'y avait pas de transport mucociliaire, ils souffraient de bronchites et de sinusites fréquentes. La microscopie électronique a montré que les cils des cellules de ces patients étaient dépourvus de bras de dynéine. Il s'agit du premier cas de dyskinésie ciliaire rapporté (Afzelius, 1976).

Les découvertes ont été poursuivies au cours du 20ème siècle et c'est dans le contexte des études intenses sur les centrosomes, les centrioles, les corps basaux et les relations possibles entre eux que le cil primaire a été découvert.

Contrairement aux cils motiles dont la dynamique de battement est évidente, les cils primaires ou non motiles des métazoaires, en particulier des mammifères, ont longtemps été considérés comme vestigiaux jusqu'à la découverte de la relation entre la biogenèse des cils primaires et une pathologie humaine la polykystose rénale (PKD). Des défauts dans le gène *tg737*, un homologue de l'*IFT88* de *Chlamydomonas reinhardtii*, compromettent l'assemblage des cils primaires dans les cellules qui tapissent les tubules des voies urinaires ce qui entraîne une mauvaise localisation des protéines liées à la PKD (Pazour et al., 2000; Yoder et al., 2002)

Peu après, il a été démontré que les défauts des cils primaires affectent la voie de signalisation Sonic hedgehog (Shh) et celle du calcium (Huangfu et al., 2003) (Pazour and Witman, 2003) permettant ainsi de considérer le cil primaire comme étant une antenne sensorielle et un organite de signalisation à part entière. La combinaison des progrès techniques de la microscopie optique (en partie grâce à l'informatique et à la technologie des caméras), de la biologie moléculaire et de la génétique ont donné lieu à l'augmentation spectaculaire des connaissances sur les cils primaires, qui a débuté dans les années 2000. Le développement d'organismes modèles appropriés comme Chlamydomonas, Caenorhabditis (*Caenorhabditis elegans*), la souris, le poisson zèbre et d'autres, a offert de grandes possibilités expérimentales qui ont contribuées à une meilleure compréhension de la biologie du cil et de sa fonction (Bloodgood, 2009a). A titre d'exemple le premier organisme modèle qui a joué un rôle clé dans l'étude des cils primaires était « *Amphioxus* » (*Branchiostoma floridae)*, des espèces de céphalocordé marin au corps fusiforme aujourd'hui appelés lancettes.

De ce fait, l'histoire montre comment l'évolution de la technologie notamment des techniques d'imageries ainsi que les avantages particuliers de certains organismes modèle ont pu éclaircir la connaissance des scientifiques sur le domaine du cil concernant les différents types, sa structure et sa fonction. Toutes ces découvertes ont montré que cette protubérance de la membrane plasmique joue un rôle important et non négligeable dans fonctionnement des cellules ce qui a attiré l'intérêt de plusieurs scientifiques qui cherchent à élucider les causes moléculaires des maladies causées par des atteintes des cils.

Il existe deux types de cils qui se distinguent par leurs structures, localisations, et fonctions (Baker and Beales, 2009) : le cil motile « 9+2 » et les cil non motile « 9+0 » également appelé cil primaire (Figure 4).

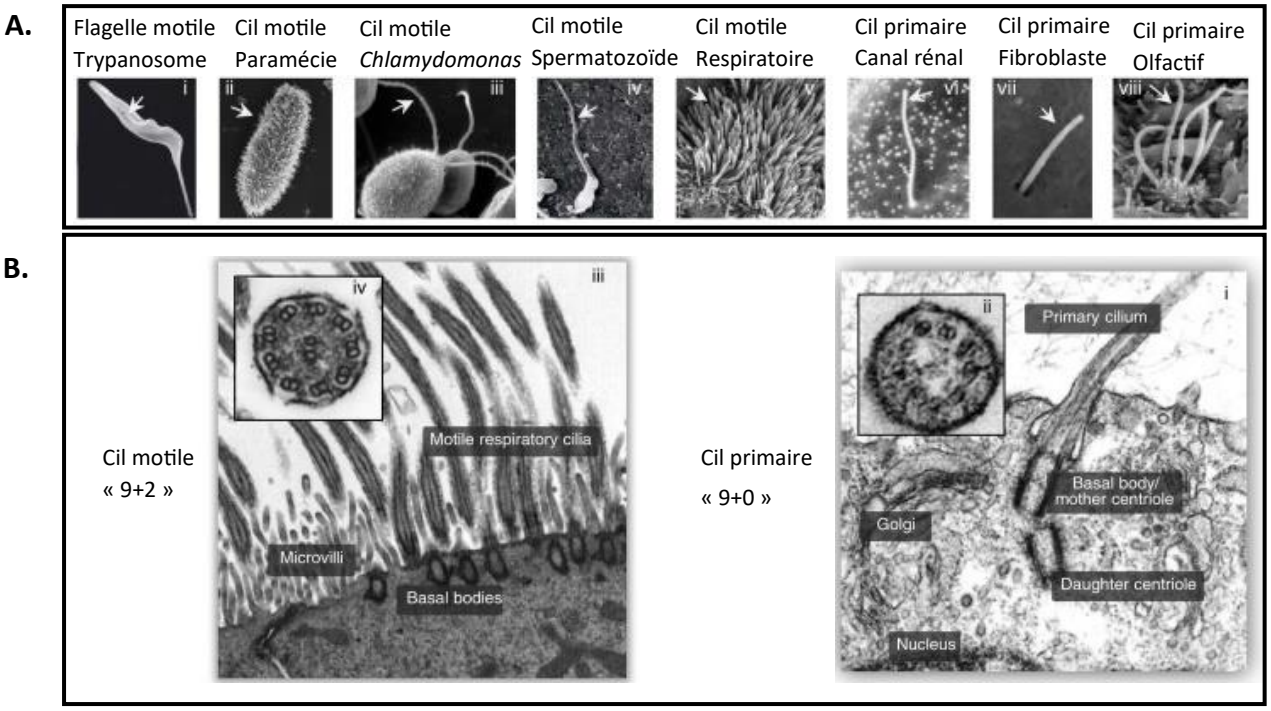


Figure 4 : Aperçu des différents types de cils et de flagelles observé par microscopie électronique. A. Exemples d'organismes et de types de cellules présentant différents types de cils mobiles ou non mobiles : (i) Vaughan *et al*. 2008, (ii) Vincensini *et al*. 2011, (iii) et (v) Dartmouth College Electron Microscope Facility (http://www.dartmouth.edu/~emlab/gallery/), (iv) Sanchez et Mardomingo, 2007, (vi) Wheatley *et al*. 1996, (vii) Christensen *et al*. 2012, et (viii) Zeiske *et al*. 2003. **B.** Micrographies électroniques de coupes transversales ou longitudinales d'un cils motile « 9+2 » (à gauche) et d'un cil primaire « 9+0 » (à droite). (i) Jensen *et al*. 2004, (ii) Kiprilov *et al*. 2008, (iii) et (iv) Dartmouth College Electron Microscope Facility (http://www.dartmouth.edu/~emlab/gallery/).

A. Structure des cils

Les deux types de cils sont soutenus par un squelette de microtubules, appelée axonème, entouré d'une matrice et recouverte de la membrane ciliaire, qui est en continuité avec la membrane plasmique.

A la base de cet ensemble, un centriole spécialisé, appelé corps basal, lie le cil au reste de la cellule (Marshall and Nonaka, 2006). L'axonème du cil primaire est constitué de 9 doublets externes de microtubules (MT) « 9+0 », tandis que les cils mobiles possèdent une paire interne supplémentaire de microtubules « 9+2 » renforcée par des ponts de nexine (protéine élastique de l'axonème) et une structure formée de bras de dynéine et de rayons radiaux qui est impliquée dans la motilité (Canty et al., 2021) (Figure 5). Les deux types de cils partagent donc 75% des composants structurels et c'est la présence d'un doublet central de microtubules (MT) chez les cils motiles qui les distinguent des autres, c'est donc cette différence dans la composition de l'axonème qui rend un type de cil motile et pas l'autre (Ishikawa et al., 2012)

Pour plus de précision structurale, chaque doublet de MT contient un microtubule « complet » (A) formé de 13 protofilaments parallèles formant un cylindre complet, et d'un

microtubule « incomplet » (B) constitué de 9 protofilaments formant un cylindre incomplet. Les protofilaments sont composés chacun d'une série d'hétérodimères de tubuline α et β associés entre eux. Les microtubules (la tubuline) subissent des modifications post-traductionnelles, notamment l'acétylation, la glutamylation, la détyrosination et la glycylation, qui sont cruciales pour la longueur, la stabilité, la fonction et la motilité des cils (Wloga et al., 2017).

Le corps basal contient 9 triplets de microtubules disposés radialement (A, B et C) et aucune paire centrale. Les tubules A et B se développent dans le segment proximal du cilium et sont reliés à la membrane ciliaire par des fibres Y, constituant un sous-compartiment distinctif connu sous le nom de zone de transition (Figure 5).

A proximité des fibres Y se trouvent les fibres de transition, qui contribuent à ancrer le corps basal à la membrane plasmique (Reiter et al., 2012). Le corps basal est responsable de la configuration de l'échafaudage de microtubules et coordonne la voie de trafic ciliaire, il est donc impliqué, avec les fibres transitionnelles, dans la ciliogénèse (Vertii et al., 2016).

Autour des fibres de transition se trouvent de nombreuses chaînes de particules, agissant comme un filtre sélectif pour les molécules de transport intraflagellaire (IFT), connues sous le nom de collier ciliaire ((Satir and Christensen, 2007) (Hu et al., 2010)).

Dans la région distale du cil, se trouve une seule fibre de microtubule (tubule A), qui délimite la pointe ciliaire, une zone protéique dont la structure et la fonction sont spécifiques du type cellulaire (Czarnecki and Shah, 2012).

Ainsi, la description de la structure du cil constituée d'un corps basal, d'une zone de transition, d'un axonème et d'une région distale (apex du cil), montre que cette organelle de quelques µm possède une structure assez complexe.

Le cil primaire, souvent considéré comme un organite sensoriel non mobile, s'est révélé mobile dans le nœud embryonnaire (le cil nodal) des vertébrés au cours du développement, où il joue un rôle crucial dans la détermination de l'asymétrie gauche-droite du corps. Il s'agit donc d'un cil motile « 9+0 » qui ne présentent pas de doublet central de MT mais porte des bras de dynéines leur permettant de faire un mouvement (Takeda and Narita, 2012) (Figure 5).

Il existe aussi une exception avec des cils primaires « 9+2 » qui sont observés dans les cellules de l'oreille interne (Dabdoub and Kelley, 2005).

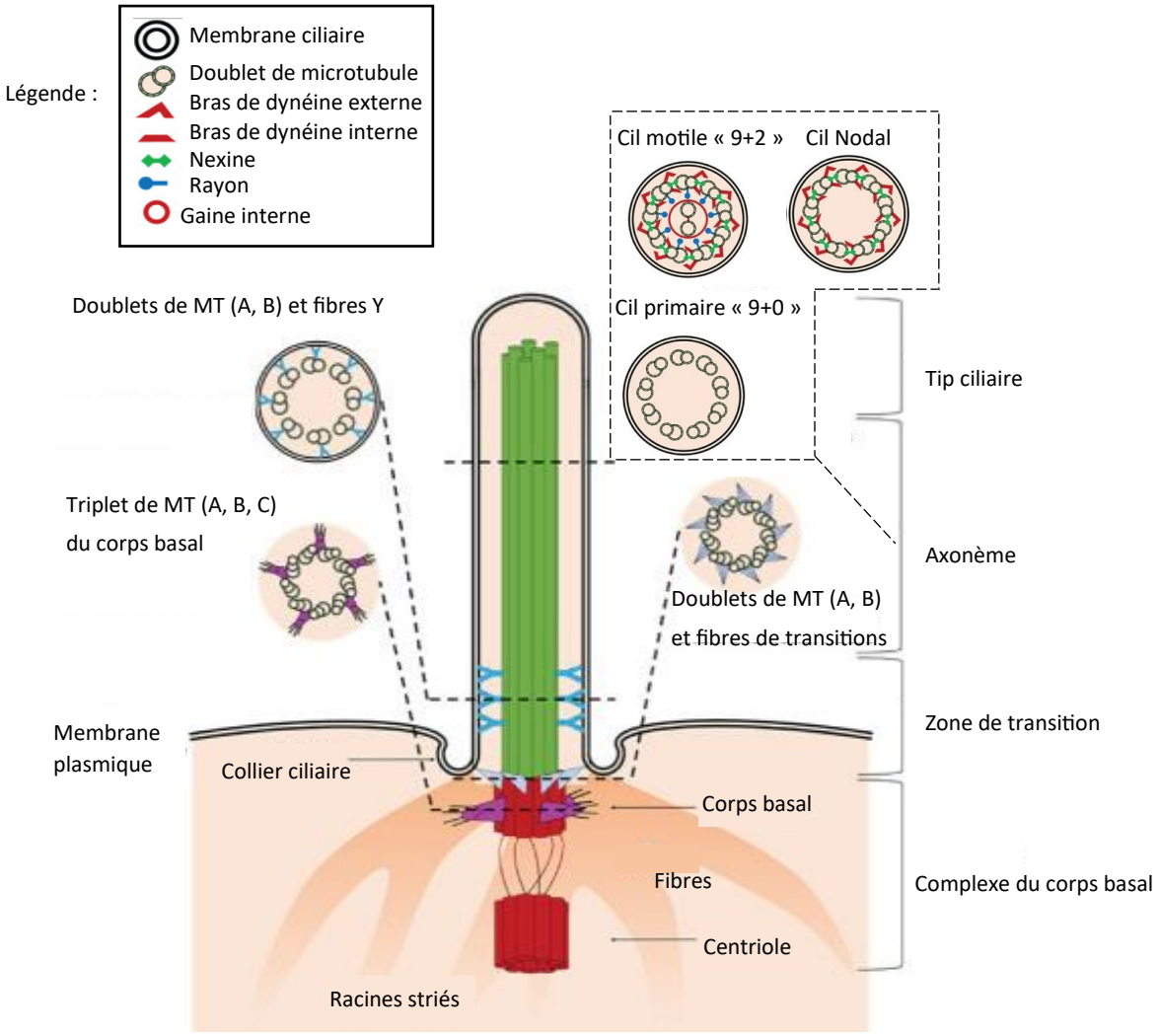


Figure 5 : Représentation de la structure du cil. Les différents types de cil partagent ~75% de leur structure avec des différences observé surtout au niveau de la composition de l'axonème en microtubules (Adapté de **(Pablos et al., 2022))**

B. Localisations des cils

Le premier critère qui distingue les deux types de cil est leur localisation, c'est-à-dire leur nombre et le types de cellules sur lesquels ils sont présents.

Les cils motiles « 9+2 » sont pour la plupart multiples à la surface des cellules dites multi ciliées qui tapissent la lumière des organes. Ils se trouvent dans les voies respiratoires, les trompes de Fallope, les ductiles efférents des testicules et les ventricules cérébraux (Lee, 2011; Mitchison and Valente, 2017). Ils peuvent aussi être présent en un seul exemplaire à la surface d'une cellule dite mono-ciliée, c'est le cas des spermatozoïdes qui présentent un flagelle considéré comme étant un cil motile spécialisé.

Les cils primaires, « 9+0 », non motiles, sont présents en un seul exemplaire à la surface apicale des cellules. Un aspect qui a retenu l'attention des spécialistes du cil primaire est sa

distribution ubiquitaire sur la quasi-totalité des cellules de l'organisme. Les cils primaires se trouvent sur les cellules épithéliales telles que les tubules rénaux, les voies biliaires, le pancréas endocrine et la thyroïde, mais aussi sur les cellules non épithéliales telles que les chondrocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les neurones, les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) et les cellules de Schwann (Figure 6).

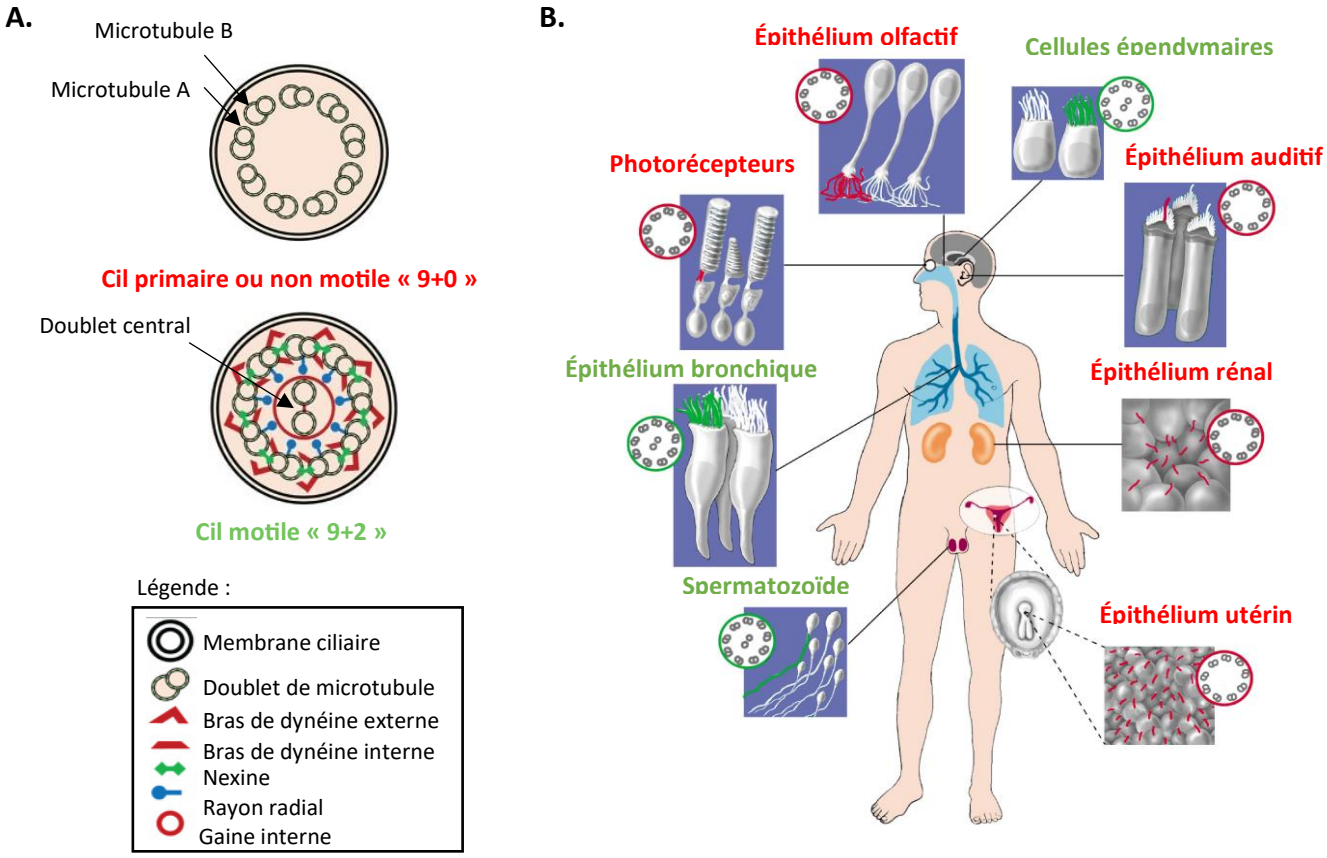


Figure 6 : Les deux types de cils et leurs localisations dans le corps humain. A. Coupe transversale d'un cil primaire et d'un cil motile. **B.** Localisation du cil primaire et du cil motile dans différents types cellulaires. Les cils primaires représentés en rouge (exception dans l'épithélium olfactif). Sont en un seul exemplaire à la surface des cellules, les cils motiles représentés en vert sont multiples à la surface des cellules (exception dans les spermatozoïdes) (Laboratoire de Génétique Médicale, U1112).

C. Fonctions des cils

Les cils sont conservés au cours de l'évolution : ils sont présents chez les protozoaires unicellulaires et sont également largement répandus chez les vertébrés (Rosenbaum and Witman, 2002). Les fonctions des cils peuvent être résumées en trois catégories.

1. La première est la motilité, une fonction réservée aux cils motiles. Par exemple, les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* et les spermatozoïdes des mammifères utilisent tous les deux leur flagelle comme propulseur leur permettant de se mobiliser. D'autres

exemples montrent que les cils motiles des cellules épithéliales respiratoires humaines éliminent les bactéries et la poussière par un mouvement directionnel.

2. La seconde est la fonction sensorielle ; par exemple, les cils spécialisés sont essentiels à la vision, à l'audition et à l'olfaction chez les vertébrés (Axelrod, 2008). En outre, de nombreux récepteurs membranaires, y compris ceux impliqués dans les voies de signalisation telles que les voies Hedgehog et Wnt, qui régulent le développement animal, sont concentrés sur les cils (Oh and Katsanis, 2013). Par conséquent, comme les antennes, les cils peuvent recevoir des signaux de l'environnement extérieur.
3. La troisième est la fonction sécrétoire (Wang et al., 2014), les exosomes ciliaires sont sécrétées de la membrane ciliaire par bourgeonnement et transportent des composants protéiques spécifiques, y compris des protéines spéciales de la membrane ciliaire, des enzymes et diverses molécules de signalisation qui assurent la communication entre les cellules (Long et al., 2016). Il a donc été proposé que les cils agissent à la fois comme des récepteurs et des émetteurs de signaux

D. Un cil spécialisé dans sa structure, localisation et fonction : le cil primaire des photorécepteurs

En plus de la structure classique du cil décrite ci-dessus, le cil primaire peut adopter une structure et une morphologie particulière qui sera en faveur de sa fonction dans certains tissus.

C’est le cas du cil primaire des photorécepteurs qui sont les cellules présentent sur la face externe de la rétine qui réalise la phototransduction (Figure 3A).

Les photorécepteurs ont comme rôle d’assurer la transformation de quanta de lumière en influx nerveux : ils convertissent les signaux lumineux donc les photons en signaux électriques pour induire une réponse nerveuse (la vision). Cette conversion des photons est assurée par des protéines opsines sensibles à la lumière, qui se trouvent dans les segments externes des photorécepteurs où se produit la première étape de la cascade de phototransduction.

L’ensemble segments externe et cil connecteur correspondant à des cils primaires hautement spécialisés et modifiés, ils sont ancrés à l'intérieur de la cellule par un centriole modifié appelé le corps basal. Le segment externe (OS) est relié au segment interne (IS) par le cil connecteur (CC), qui est équivalent à la zone de transition dans d'autres cils primaires, il agit donc comme un gardien du compartiment ciliaire, contrôlant la composition protéique et lipidique du segment externe (OS).

Les protéines photosensibles de l'opsine et d'autres composants de la cascade de phototransduction sont intégrés dans des repliements membranaires qui remplissent tout l'OS. Les photons déclenchent la conversion des protéines photosensibles de l'opsine, ce qui modifie la charge de la membrane et déclenche la libération de neurotransmetteurs au niveau de la synapse du photorécepteur (hyperpolarisation) en contact avec les cellules bipolaires. les signaux électriques provenant des photorécepteurs sont intégrés et modulés par les cellules bipolaires et les cellules horizontales, le signal résultant est transmis aux cellules ganglionnaires dont les regroupement des axones forme le nerf optique, connecté au cerveau

(Masek et al., 2023). Les cils primaires du segment externe de la rétine jouent donc un rôle primordial dans la transduction du signal lumineux, ce qui explique pourquoi la dystrophie rétinienne est une caractéristique clé des ciliopathies (Bachmann-Gagescu and Neuhauss, 2019) (Figure 7).

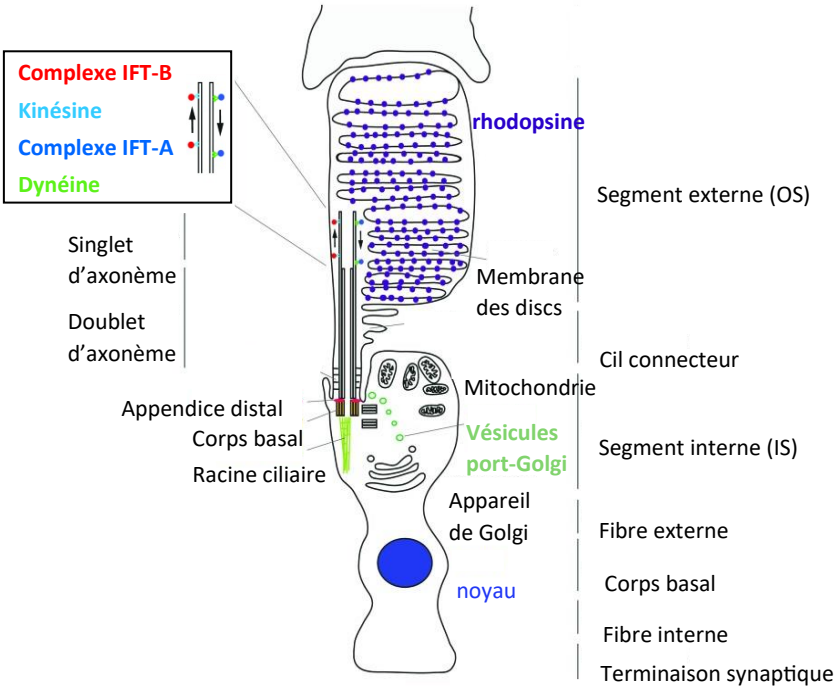


Figure 7 : Le cil primaire des photorécepteurs. Annotation des parties d'un photorécepteur et de son cil primaire (Adapté de Wheway *et al*.2014).

- Pendant ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à la fonction du cil primaire dont je vais détailler son rôle par la suite.

E. Le cil primaire

1. Ciliogénèse

La ciliogénèse est un processus complexe qui implique de multiples machineries cellulaires et voies de signalisation. Les cils sont des organites dynamiques dont l'assemblage et le désassemblage sont des processus étroitement régulés au cours du cycle cellulaire. L'assemblage du cil a lieu pendant la phase G0, c'est-à-dire après la sortie de la cellule de la mitose, et le désassemblage a lieu avant la mitose donc avant que la cellule se prépare pour la division. Ceci met en évidence une coordination étroite entre le cycle cellulaire et la ciliogénèse (Goto et al., 2017; Zhao et al., 2023).

La ciliogénèse se déroule en phase G0 du cycle cellulaire qui est aussi appelé la phase de quiescence. L'assemblage des cils est contrôlé par la régulation transcriptionnelle ainsi que par la stimulation des facteurs de croissance et des facteurs mitogènes. Par exemple, les facteurs

de transcription de la famille RFX contrôlent l'expression des machineries du corps basal et des protéines spécifiques nécessaires à la ciliogénèse (Piasecki et al., 2010).

La formation du cil est initiée par la maturation du centriole mère qui devient le corps basal, suivie par l'extension des microtubules de l'axonème, la formation de la zone de transition et la croissance du cil grâce aux mécanismes de trafic ciliaire tels que le transport intraflagellaire (IFT).

- La préparation à la ciliogénèse avec l'évolution du cycle cellulaire

La préparation à la ciliogénèse commence au début du cycle cellulaire, avec au premier lieu la maturation du centriole mère. Dans les cellules de mammifères, le centriole est un organite à base de microtubules conservé au cours de l'évolution, dont les dimensions typiques sont de ∼200 nm de diamètre et ∼500 nm de longueur, et dont la structure cylindrique est constituée de neuf triplets de microtubules (Nevers et al., 2017; Ross and Normark, 2015). Une paire de centrioles perpendiculairement (le centriole mère et le centriole fille) recrutent un réseau protéique, appelé matériel péricentriolaire (PCM), pour former le centrosome. Le centrosome est responsable de l'assemblage du réseau de microtubules dans les cellules en interphase et de la formation du fuseau mitotique pendant la mitose.

La duplication du centrosome et la conversion du centriole mère en corps basal sont étroitement coordonnées avec le cycle cellulaire. Pendant la phase G1/S du cycle cellulaire le centriole fille (DC) perd la plupart de ces protéines enrichies, ce processus est nécessaire pour permettre la duplication du centriole (Wang and Dynlacht, 2018). Pendant la phase G2, les centrioles subissent une élongation et pendant la phase M, les centrioles subissent une maturation et se transforment en deux centrosomes qui migrent chacun vers un pôle de la cellule afin de former le fuseau mitotique important à la mitose (Figure 8).

À la sortie du cycle cellulaire, le centriole mère acquiert la compétence pour la ciliogénèse en réponse à des signaux développementaux et/ou environnementaux spécifiques. Ainsi l'assemblage des différents compartiments du cil commence en G0 (Figure 8).

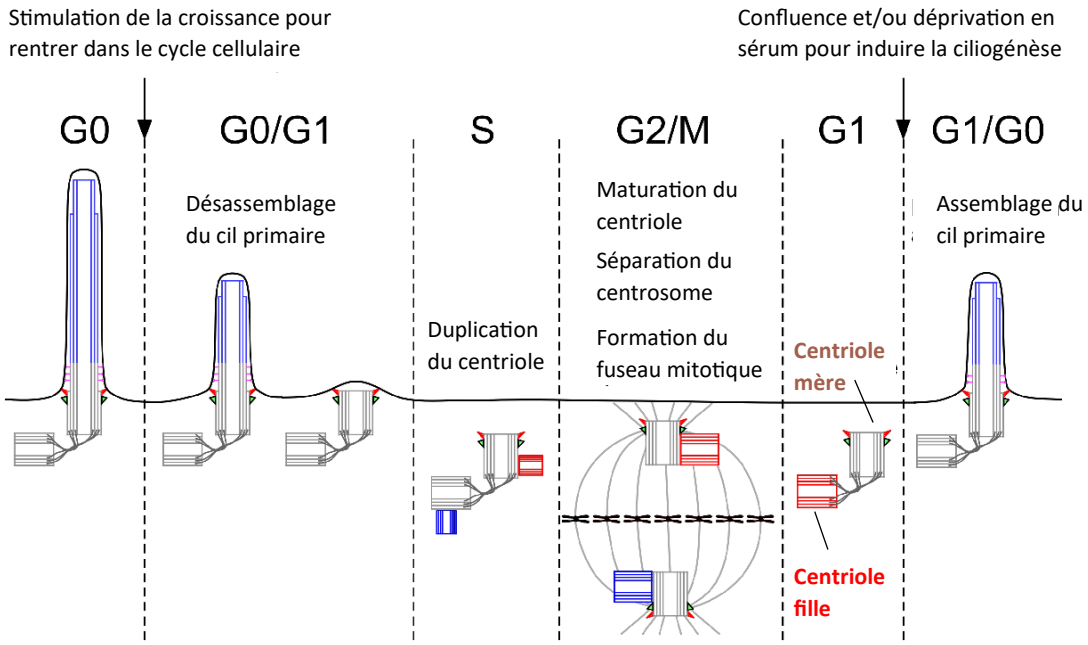


Figure 8 : Représentation de la ciliogénèse dépendante du cycle cellulaire. Le cil primaire se forme généralement au stade quiescent G0 du cycle cellulaire. La stimulation de la croissance par divers facteurs de croissance extracellulaires permet à la cellule d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire. Avant d'entrer dans le cycle cellulaire, le cil primaire est désassemblé à la limite G0/G1. Pendant la phase S, les centrioles sont dupliqués pour former une copie du centrosome. Pendant la phase G2, les centrioles filles sont matures et les centrosomes sont séparés pour former les pôles bipolaires et le fuseau mitotique. Au cours de la phase G1, le centriole mère et les centrioles dupliqués sont désengagés. Pour former le cil primaire, les cellules doivent être confluentes et/ou privées de sérum pendant au moins plusieurs heures (Adapté de Suizu *et al*.2016).

➢ Les deux voies de la ciliogénèse

Selon que l'élongation commence dans le cytoplasme ou à la surface de la cellule, le processus de la ciliogénèse des cils primaires peut être classé comme une voie intracellulaire ou extracellulaire, respectivement (Sorokin, 1962). La voie intracellulaire est adoptée par la plupart des cellules, y compris les photorécepteurs et les fibroblastes tandis que l'assemblage extracellulaire est observé dans les cellules épithéliales polarisées du rein et du poumon (Sedmak and Wolfrum, 2011; Wang and Dynlacht, 2018). C'est grâce à des analyses de microscopie électronique à transmission (MET) (Sorokin, 1968) qu'il a été démontré que la ciliogénèse pourrait être réalisée par ces deux voies distinctes :

- La voie intracellulaire ou « voie classique » se déroule dans les cellules non polarisées comme les fibroblastes et les photorécepteurs où le cil primaire émerge d'une invagination de la membrane plasmique appelée la poche ciliaire. Plus précisément, une vésicule ciliaire interagit avec l'appendice distal du centriole mère situé près du noyau, suite à la formation de la zone de transition (TZ), l'axonème émerge et s'allonge

de cette vésicule et se met à croitre dans la poche ciliaire (caractérisée par la présence de vésicules à clathrine participant à un trafic vésiculaire actif caractérisant cette région) (Ghossoub et al., 2011). L'élongation de l'axonème se fait grâce à la machinerie ciliaire dont le transport intraflagellaire (IFT). La membrane intracellulaire du cil en développement fusionne ensuite avec la membrane plasmique pour étendre le cil à la surface de la cellule (Figure 9).

- La voie extracellulaire ou « voie alternative » est observée dans les cellules polarisées comme les cellules épithéliales où le centriole mère s'ancre directement à la membrane plasmique pour former le corps basal du cil primaire. Cette voie ne nécessite pas de formation de poche ciliaire, le cil primaire croît directement dans le milieu extracellulaire. Lorsque le cil primaire n'est pas inséré dans la poche ciliaire, son rôle de senseur biomécanique serait favorisé (Mazo et al., 2016). En effet, libre de mouvement comme au niveau des cellules épithéliales rénales, il pourrait mieux capter les modifications de flux urinaire (Figure 9).

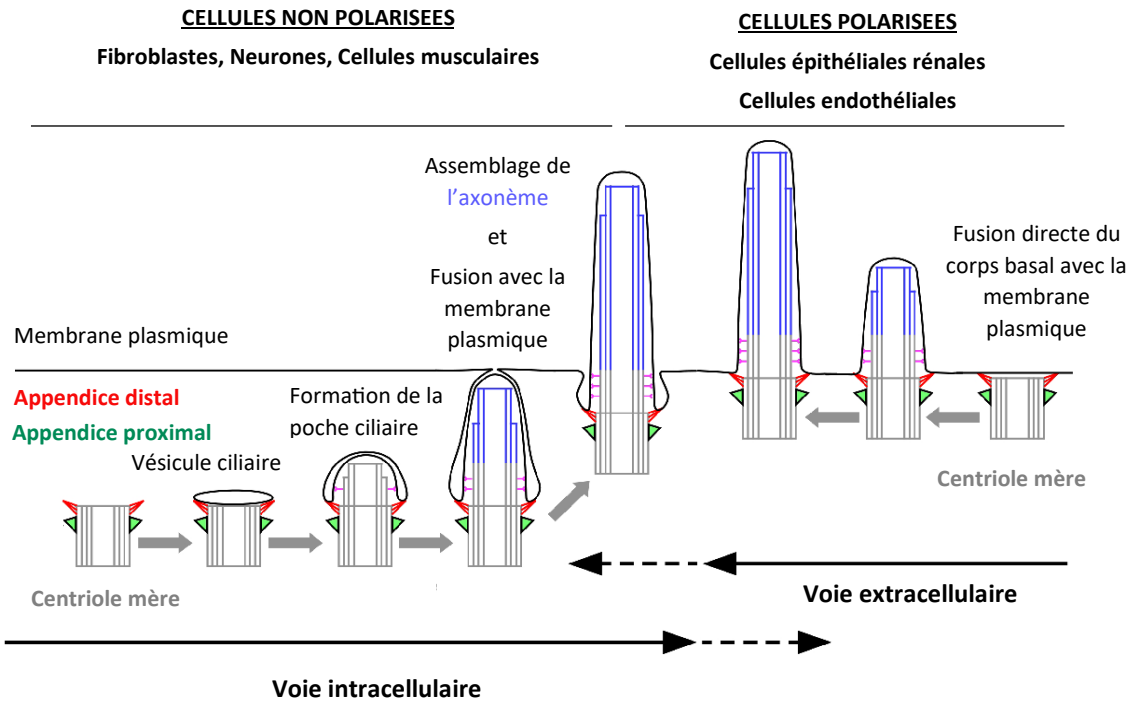


Figure 9 : Les deux voies de la ciliogénèse. Selon le type cellulaire la ciliogénèse peut se dérouler de deux façons différentes : la voie intracellulaire (cellules non-polarisées) et la voie extracellulaire (cellules polarisées). La voie intracellulaire comporte les étapes suivantes: une vésicule ciliaire dérivée de l'appareil de Golgi ou des endosomes se lie à l'extrémité distale du centriole mère par l'intermédiaire de fibres de transition (appendices distaux), une poche ciliaire comprenant la zone de transition se développe en allongeant l'axonème à partir du centriole mère à l'aide de fibres de transition, enfin la fusion de la poche ciliaire avec la membrane plasmique et la croissance ultérieure de l'axonème se produite permettant de compléter l'assemblage ciliaire et son extension à la surface de la cellules. Les cellules polarisées adoptent la voie extracellulaire : dans cette voie, la croissance de l'axonème commence après la liaison directe du centriole mère à la membrane plasmatique. (Adapté de Suizu *et al*.2016).

2. Le trafic des protéines ciliaires

Contrairement à d'autres organites tels que les chloroplastes et les mitochondries, les cils ne sont pas complètement liés par une membrane qui les sépare de la membrane plasmique (PM) et du cytoplasme. Le cil primaire est dépendant de la machinerie cellulaire pour la synthèse des 1500 protéines impliquées dans sa formation, sa maintenance et son fonctionnement (Wheway et al., 2018). De ce fait, les protéines ciliaires synthétisées dans le réticulum endoplasmique seront par la suite acheminées dans le cil par différents systèmes de fusion et de transport.

Leur adressage dans le cil implique un traitement, une modification et un tri (des modifications post-traductionnelle) par l'appareil de Golgi. Ensuite, elles sont transportées vers la membrane plasmique ou la membrane de la base ciliaire par des vésicules de transport, et entrent dans les cils par un transport latéral à travers la barrière de diffusion avec l'aide de protéines assistantes (telles que les sous-unités IFT-B du transport intraflagellaire , KIF17 et Rab23) (Leaf and Von Zastrow, 2015) ou par la voie du recyclage (Boehlke et al., 2010).

De nombreuses protéines impliquées dans le trafic ciliaire ont été identifié au niveau de la zone de transition (TZ) du cil dont la plupart ont été associées à des ciliopathies. Plusieurs études sur l'interactome ont permis d'identifier que ces protéines constituent deux complexes protéiques principaux biochimiquement distincts (Roberson et al., 2015). L'un d'entre eux est le complexe NPHP constitué de NPHP1, 4 et 5 et est associé à la néphronophtise. L'autre complexe protéique est MKS/JBTS constitué de 16 protéines et est associé aux syndromes de Meckel-Gruber et de Joubert (JBTS) (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2012). Il a été démontré que les deux complexes MKS et NPHP interagissent entre eux par un réseau de faibles connexions, par exemple, la protéine CEP290 (qui fait partie du complexe MKS) interagit avec NPHP5 : une protéine du corps basal et de la zone de transition associée au complexe NPHP (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017). Ces deux complexes sont impliqués dans la sélection et le transfert des protéines à l'intérieure et l'extérieure du cil, ils interviennent dans les mécanismes empêchant la libre diffusion entre le cytoplasme et le cil permettant ainsi de maintenir cette compartimentation. Ils participent donc au maintien et à la fonction du cil primaire (Barker et al., 2014).

Après l'entrée des protéines dans les cils, leur dynamique et leur homéostasie sont maintenues par deux méthodes : elles entrent et sortent du cil par un processus connu sous le nom du transport intraflagellaire (IFT), où elles sont sécrétées dans l'environnement extracellulaire par les exocytoses ciliaires. Le transport des protéines membranaires ciliaires et celui des protéines impliquées dans sa fonction est un processus élaboré et précis impliquant la coordination de multiples organites. Plusieurs modes de transport correspondant à différents types de protéines ciliaires ont été identifiés (Kim et al., 2014; Long and Huang, 2020; Witzgall, 2018). Ces transports sont réalisés par différents complexes protéiques ayant chacun sa propre composition, sa structure d'assemblage et sa fonction.

Par la suite, je décrirai trois des complexes ciliaires (IFT, BBSome et Chaperonin-like) (Figure 10) qui sont impliqués dans le syndrome de Bardet-Biedl.

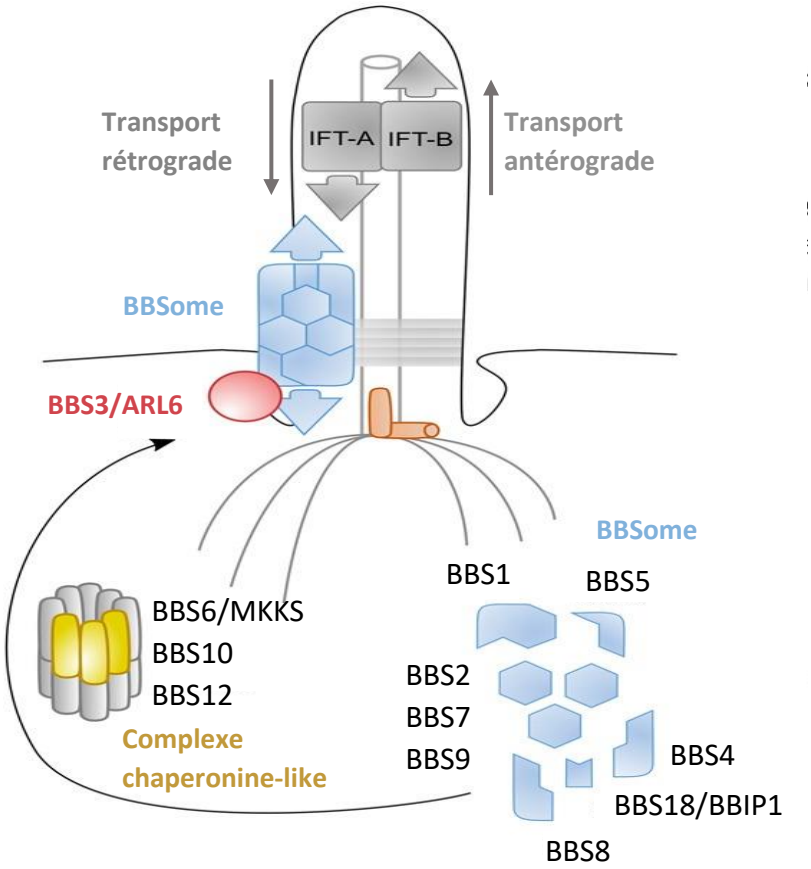


Figure 10 : Les complexes BBS dans le cil primaire. Présentation des complexes IFT et du BBSome responsables du trafic ciliaire à travers l'axonème. Le complexe chaperonin-like localisé à la base du cil intervient dans l'assemblage du BBSome (adapté de Niederlova *et al. 2019*).

- Le transport intraflagellaire (IFT)

Le transport intraflagellaire a été identifié pour la première fois par le laboratoire de Rosenbaum. En utilisant un microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC), ils ont fait l'observation que de larges particules pouvaient se déplacer le long des cils motiles de *Chlamydomonas reinhardtii* de façon bidirectionnelle et ceci indépendamment du battement ciliaire (Johnson and Rosenbaum, 1992). La purification ultérieure de ces particules, a ouvert le champ à l'analyse moléculaire (Cole et al., 1998) et à la découverte de plusieurs maladies liées aux cils. L'ajout d'un étiquette GFP aux protéines a permis la visualisation directe de composants IFT spécifiques se déplaçant le long du cil dans des cellules vivantes (Orozco et al., 1999).

Les progrès rapides réalisés par de nombreux laboratoires dans la compréhension du mécanisme de l'IFT ont fait l'objet de nombreuses études permettant d'enrichir les connaissances sur ce sujet. Il s'agit d'un processus hautement spécialisé qui se produit dans le compartiment ciliaire, c'est un mouvement bidirectionnel au cours duquel un complexe protéique est transporté le long des microtubules à travers l'axonème depuis le corps basal jusqu'à l'extrémité du cils (grâce au transport kinésine-antérograde) et inversement (facilité par le transport dynéine-rétrograde) (Klena and Pigino, 2022).

L'IFT a été rapidement assimilé à un transport ferroviaire et le terme de « IFT train » est souvent utilisé pour décrire son fonctionnement. Il est composé de deux complexes multiprotéiques qui se lient aux molécules moteurs (la kinésine et la dynéine), pour assurer l'acheminement des protéines ciliaire à travers le cil. Ces deux complexes sont appelés IFT-A et IFT-B et ont été identifiés à l'origine par l'analyse de gels natifs de flagelles isolés de *C. reinhardtii* (Piperno and Mead, 1997) :

- L'IFT-A est composé de 6 protéines (IFT43-121-122-139-140-144) qui interagissent avec la dynéine-2 et participent au transport rétrograde de l'extrémité du cil vers le corps basal. Ces 6 protéines se divisent en deux sous-domaines (FT122-140-144 et IFT43-121-139) qui interagissent entre eux. L'IFT rétrograde permet d'évacuer et de recycler hors du cycle les protéines permettant la résorption du cil (le désassemblage du cil). Il intervient aussi lorsqu'une voie de signalisation ciliaire n'est plus stimulé et ses acteurs n'ont plus de rôle dans le cil et doivent être évacués hors de ce dernier (Figure 11).

L'IFT-B est composé de 16 protéines (IFT20-22-25-27-38-46-52-54-56-57-70-74-80-81-88-172) qui interagissent avec la kynésine-2 et participent au transport antérograde de cargos protéiques depuis le corps basal jusqu'à l'extrémité du cil. La cristallographie des composants IFT-B de *C. reinhardtii* a révélé des sous-domaines et des modes d'interaction entre les composants IFT-B (Taschner et al., 2018). Le complexe IFT-B est organisé en IFT-B1 (le noyau IFT-B comprenant 10 sous-unités IFT-88-81-74-70-56-52, 46-27-25 et 22) et IFT-B2 (le complexe IFT-B périphérique comprenant six sous-unités, IFT-172-80-57-54-38 et 20), tous les deux sont capables de s'assembler en complexes stables (Taschner et al., 2016, p. 80). Le mécanisme de

reconnaissance de l'IFT-B par la tubuline a été élucidé, ce sont l'IFT74 et l'IFT81 (deux protéines de l'IFT-B) qui forment un module de liaison à la tubuline et permettent d'accomplir cette tâche essentielle dans l'assemblage ciliaire (Kanie et al., 2017). Le transport antérograde permet de délivrer à l'intérieur du cil une variété de molécules et de cargos protéiques qui sont adressés à ce dernier par l'appareil de golgi. Ainsi les molécules impliquées dans la l'élongation et la signalisation ciliaire peuvent s'incorporer dans la membrane ciliaire ou parcourir l'axonème afin d'accomplir leurs fonctions dans le cil (Figure 11)

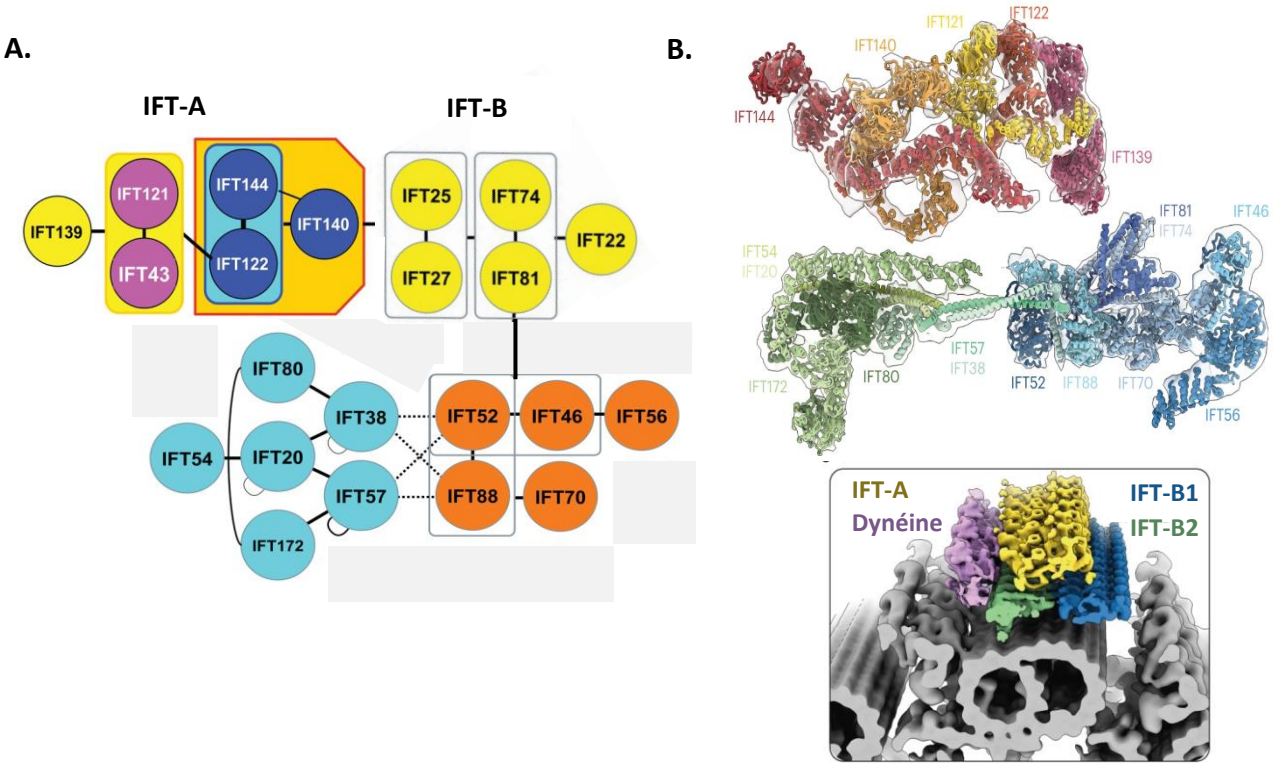


Figure 11 : Les IFT. A. Les deux complexes IFT, position des protéines périphériques et centrales dans chacun des complexes IFT-A et IFT-B (adapté de Nakayama and Katoh *et al*. 2018). **B.** Représentation de leur structure 3D et de leur interaction au niveau de l'axonème du cil (Lacey *et al*. 2023).

Il a été démontré que ces deux complexes (IFT-B et IFT-A) agissent de manière coordonnée (Lacey et al., 2023; Ma et al., 2023). Les trains IFT antérogrades et rétrogrades se déplacent très rapidement (jusqu'à 3,5 µm/s) et sans collisions évidentes le long du cil, bien qu'ils soient confinés dans un espace étroit entre les microtubules et la membrane ciliaire. Il a été démontré que le système IFT utilise une solution pour éviter les collisions pendant le transport le long des pistes des microtubules. En utilisant la microscopie à fluorescence corrélative couplé la microscopie électronique à transmission, il a été démontré que les trains antérogrades et rétrogrades peuvent voyager sur le même doublet de microtubule, mais éviter les collisions en utilisant spécifiquement le doublet de microtubule comme une piste

bidirectionnelle, les trains antérogrades (IFTB) utilisent le tubule B comme piste et les trains rétrogrades utilisent le tubule A comme piste (Stepanek and Pigino, 2016). Pour plus d'informations chez les *Chlamydomonas*, il a été démontré que la taille des trains d'IFT est inversement proportionnelle à la longueur des cils, les trains sont plus longs lorsque le cil est plus court et vice versa, ce qui indique que la régulation de la longueur des trains d'IFT pourrait représenter un mécanisme crucial de contrôle de la longueur des cils (Vannuccini et al., 2016). Une étude réalisée en 2023 a utilisé la tomographie cryo-électronique *in situ* des cils de *Chlamydomonas reinhardtii* et les prédictions de la structure des protéines AlphaFold2 pour générer un modèle moléculaire de l'ensemble du train antérograde. En se basant sur les configuration 3D, ils ont montré comment le complexe IFT-B interagit avec l'IFT-A de façon à maintenir une connexion qui peut résister aux contraintes mécaniques présentes dans les cils en battement actif (Lacey et al., 2023) (Figure 11).

Donc, comme la synthèse des protéines essentielles au développement des cils n'est pas possible à l'intérieur du compartiment ciliaire, l'importance de l'IFT dans la ciliogénèse doit être soulignée, ainsi que son implication dans la transmission des signaux du cil à la cellule, mettant en évidence son rôle significatif dans les voies de signalisation médiées par les cils. Ainsi, plusieurs études ont montré que l'apparition de certaines ciliopathies peut être causé par des variants dans les gènes *IFT* qui aboutissent à des altérations dans la formation et la fonction du cil.

- BBSome

Un autre complexe multiprotéique, le BBSome, agit comme un adaptateur reliant les complexes IFT aux molécules de signalisation et est nécessaire à l'exportation ciliaire des récepteurs de signalisation activés (Nachury, 2018). Le BBSome découvert en 2007 est un complexe regroupant le produit de 8 gènes *BBS* à savoir BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 et BBIP1 (BBS18), chacune présente en seul exemplaire (Nachury et al., 2007) (Figure 12). Ce complexe a un poids moléculaire de 490 kDa (Chou et al., 2019), et il est relié à la membrane ciliaire par la GTPase ARL6/BBS3. Une étude menée en 2012 a démontré que l'assemblage du BBSome est un processus ordonné impliquant les protéines BBS chaperonine-like (BBS6, BBS10 et BBS12) et des interactions protéine-protéine intrinsèques. A ce jour, le complexe chaperonine-like est connu pour permettre l'assemblage du BBSome en stabilisant BBS7 pour former le cœur du complexe avec BBS2 et BBS9 (Zhang et al., 2012). Ensuite, les sous unités périphériques BBS1, BBS5, BBS8 et BBS4 s'incorporent au complexe (Wei et al., 2012). Enfin, BBS4 recrute BBIP1/ BBS18 qui est une protéine importante à la stabilité du BBSome (Klink et al., 2020).

A ce jour, les détails de son rôle ne sont pas encore totalement compris. Néanmoins, il est impliqué dans la sélection et le transport des cargos protéiques adressés au cil, dans l'ancrage et la fusion des vésicules de protéines membranaires à la base du cil (Madhivanan and Aguilar, 2014; Wang et al., 2018). La question de savoir si le BBSome représente un troisième composant intégral des particules de l'IFT, comme l'IFTA et l'IFTB a été discutée. Dans les cils

des mammifères et des nématodes, il semble être présent dans une stœchiométrie de (1:1) par rapport aux particules IFT et pourrait être nécessaire à l'intégrité structurelle des particules IFT en maintenant ensemble l'IFTA et l'IFTB lorsqu'elles sont déplacées le long du cil par les moteurs kinésine-2 (Williams et al., 2014).

Par contre, chez Chlamydomonas, le BBSome semble être fortement sous-stœchiométrique (≈1 :6) par rapport à l'IFT-A et l'IFT-B, et il est proposé qu'il serve d'adaptateur impliqué dans l'exportation des protéines de signalisation du cil, plutôt que de composant intégral des particules IFT (Lechtreck et al., 2009). Ces études montrent que le BBSome est également impliqué dans l'assemblage et la stabilisation du complexe IFT (Wei et al., 2012) avec un impact variable sur la stabilité de l'IFT dans différents organismes (Williams et al., 2014)

La perte de la fonction du BBSome entraîne des changements dans la composition protéique des membranes ciliaires, ce qui est cohérent avec le rôle du complexe dans le trafic des protéines de la membrane ciliaire (Williams et al., 2014). Dans l'ensemble, les données disponibles suggèrent que le BBSome peut fonctionner soit comme un régulateur de l'IFT, soit comme un composant central de l'IFT ou encore comme un adaptateur de cargaison d'une manière qui est apparemment spécifique au type de cellule.

Bien que la fonction de chacune des protéines du BBSome n'est pas déterminé jusqu'à présent, une étude menée sur *C. elegans* montre que BBS4 et BBS5 présentent une redondance fonctionnelle inattendue dans la régulation de la ciliogénèse et la régulation de l'élimination par les cils des récepteurs sensoriels par la dégradation lysosomale (Xu et al., 2015). Dans ce cas, BBS4 interagit directement avec BBS5 (cette interaction peut être interrompue par une mutation conservée identifiée dans BBS4 chez l'Homme). Ainsi, cette étude a révélé un rôle nouveau et hautement conservé pour le BBSome dans la régulation négative des récepteurs sensoriels des cils qui vont être dégradés par les lysosomes. Le dysfonctionnement du BBSome entraîne alors une rétention anormale des récepteurs sensoriels à l'intérieur des cils et pourrait entraîner une activation indésirable de la signalisation ciliaire (Xu et al., 2015) dont la voie SHH fait partie.

À ce jour, plus d'une centaine de variations pathogènes affectant les sous-unités du BBSome sont à l'origine d'anomalies, dont les dégénérescences rétiniennes non syndromique et le BBS (Chou et al., 2019). Dans certains cas, une mutation d'une protéine du complexe peut se traduire par l'accumulation d'un intermédiaire d'assemblage qui maintient une fonction résiduelle ou un gain de fonction. Dans d'autres cas, les mutations peuvent changer l'ordre d'assemblage provoquant l'absence du complexe BBSome et donc une perte totale de sa fonction (Zhang et al., 2012). Dans les deux cas, la dérégulation de la fonction du BBSome a été rapporté comme cause de ciliopathies notamment du syndrome de Bardet-Biedl. Par exemple, il a été démontré que les protéines du BBsome interagissent physiquement avec les récepteurs de la leptine et joue un rôle dans la régulation de voie de signalisation visant à réduire l'apport alimentaire (Seo et al., 2009). La dérégulation de ce rôle causé par des variants dans les gènes du BBSome peut expliquer un des phénotypes du BBS qui est l'obésité liée à une hyperphagie.

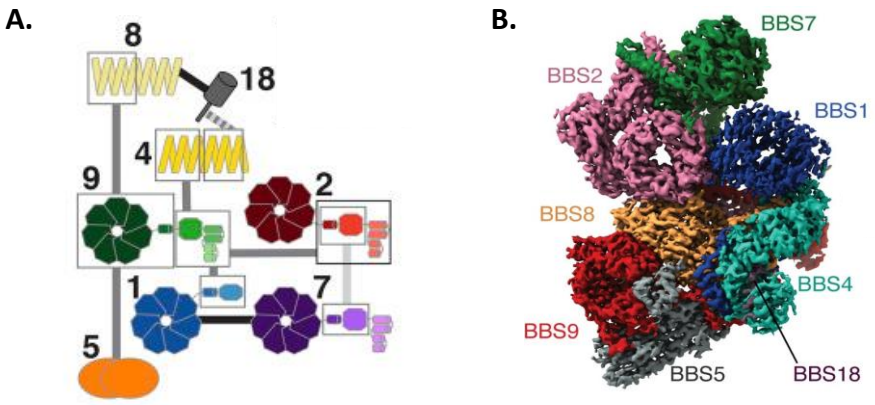


Figure 12 : Le BBSome. A. Représentation schématique des interactions entre les 8 sous-unités du complexe octamérique du BBSome (à droite) (Chou *et al.* 2019). **B.** Représentation de la structure 3D du complexe à gauche (Singh *et la* 2020).

- Le complexe chaperonin-like

Le complexe chaperonin-like est composé des trois protéines suivantes : BBS6/MKKS, BBS10 et BBS12. Ces protéines présentent une homologie de séquence avec les protéines chaperonnes de type II. Les protéines chaperonnes représentent une famille de protéines ubiquitaire et essentielle qui jouent le rôle de facilitateurs et de régulateurs du changement de la conformation des protéines (repliement tridimensionnelle) dans les cellules (Kim et al., 2013). Elles assistent ainsi les autres protéines dans leur maturation. Il est intéressant de noter que les protéines BBS chaperonin-like partagent avec les protéines chaperonnes une similarité possiblement structurale, mais n'ont pas forcément la même fonction. Les gènes BBS chaperonin-like se caractérisent par le fait d'avoir des séquences génomiques courtes avec très peu d'exons, ce qui les rend adaptés au criblage mutationnel. Ils présentent une large distribution de variants pathogènes tout au long de la séquence codante et ils représentent plus de ~30% de la charge mutationnelle dans le syndrome de Bardet-Biedl (Billingsley et al., 2010; Muller et al., 2010).

Une analyse phylogénétique a montré que les protéines BBS chaperonines-like sont des membres divergents de la famille des chaperonnes CCT (chaperone-containing T-complex polypeptide 1, aussi connu sous le nom de TRiC) (Stoetzel et al., 2007). Les protéines CCT/ TRiC forment un complexe hétéro-oligomérique de ~900 kDas, constitué de huit sous-unités disposées (CCT1-8), il assure la médiation du repliement des protéines en fonction de la disponibilité en ATP (Spiess et al., 2004).

Cette divergence des protéines chaperonin-like n'est pas due à leur structure primaire qui est principalement conservée mais elle est due à la différence entre les divers motifs de la structure secondaire, y compris le motif d'hydrolyse de l'ATP surtout chez BBS12 qui est considéré comme le membre le plus divergent. Par conséquent, la structure typique des chaperonnes, composée de trois domaines (apical, intermédiaire et équatorial), est

principalement conservée dans les protéines BBS chaperonin-like avec une insertion supplémentaire dans le domaine intermédiaire et équatorial. Le motif ATP-hydrolyse, essentiel au repliement des protéines et hautement conservé dans les protéines CCT, n'est pas conservé dans MKKS/BBS6 et BBS12 ou partiellement conservé dans BBS10 (Kim et al., 2005; Stoetzel et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les protéines BBS6, BBS10 et BBS12 n'ont probablement pas d'activité ATPase et ne fonctionnent pas comme de véritables chaperonnes.

Bien que le rôle de ces protéines n'ait pas été encore bien caractérisé, des études récentes ont mis en évidence que les protéines BBS6, BBS10 et BBS12 permettent l'association de BBS7 avec six protéines CCT canoniques (CCT1-5 et CCT8), agissant ainsi comme une unité de liaison au substrat du complexe chaperon (Seo et al., 2010). Ainsi, BBS10 régule l'interaction de BBS6, BBS12 et BBS7 intermédiaires avec les protéines CCT pour former le complexe TRiC/CCT/BBS sans être structurellement impliqué (Zhang et al., 2012).

De plus, après l'assemblage initial du complexe BBSome, l'interaction entre BBS2 et BBS7 est couplée en même temps que BBS6 et BBS12 sont libérés du complexe, de même, les protéines CCT sont libérées après la formation du complexe central BBSome (BBS2-BBS7-BBS9).

Ainsi, les protéines BBS chaperonin-like pourraient avoir évolué afin de médier l'association des chaperonnes CCT/TRiC avec les sous-unités du BBSome contenant un domaine de feuillet β telles que BBS2 et BBS7 participant ainsi à l'assemblage du BBSome.

La formation du complexe BBSome mature est finalement réalisée par une interaction protéine-protéine intrinsèque entre les composants du BBSome qui contiennent des domaines de feuillet β, de répétition de tétratricopeptide (TPR) et d'homologie de plecktrine (PH) (Zhang et al., 2012).

Il est intéressant de noter que les protéines BBS6, BBS10 et BBS12 sont spécifiques aux vertébrés et qu'aucun de leurs homologues ne se trouve chez les invertébrés. Malgré le décodage du mécanisme et des rôles distincts des protéines BBS chaperonine-like, les détails de la formation du complexe (BBS/TRiC/CCT) et la manière dont la transition de BBS7 au BBSome s'achève requièrent une attention particulière. Par contre, il n'est toujours pas connu si chez les invertébrés les chaperonnes CCT n'ont pas besoin de BBS6, BBS10 et BBS12 pour interagir avec les sous-unités du BBSome ou si le BBSome s'assemble sans avoir besoin la fonction des protéines chaperonin-like (Seo et al., 2010).

3. La fonction du cil primaire

Depuis leur découverte dans les reins et la glande thyroïde par Zimmermann en 1898 (Bloodgood, 2009a), les cils primaires ont été considérés comme des organites vestigiaux, sans fonction spécifique, en raison de leur manque de motilité et de leur absence dans plusieurs cellules lors de la mitose (Bloodgood, 2009b). En 1975, Webber et Lee (Webber and Lee, 1975) ont émis l'hypothèse d'un possible rôle sensoriel des cils du néphron des mammifères, en les comparant à ceux des tissus sensoriels. Cette hypothèse a été confirmée en 2000 par une étude de Pazour et al (Pazour et al., 2000), qui a présenté des preuves expérimentales démontrant la fonction physiologique du cil primaire.

Lorsque l'implication des cils primaires dans les maladies humaines a été démontrée (Pazour et al., 2002) la prise de conscience de l'importance de cet organite s'est accrue. Ainsi l'importance fonctionnelle du cil primaire a émergé au cours de ces 10 dernières années. En effet de nombreuses études ont montré les rôles complexes des cils primaires notamment son rôle central au cours du développement et son implication dans un grand nombre de voie de signalisations comme, par exemple, la voie Wnt et la voie Sonic Hedgehog (SHH) qui conduisent à des réponses cellulaires variées comme la différenciation ou la prolifération cellulaire (Fry et al., 2014). Les cils primaires sont donc principalement des organites de détection et de transduction des signaux, souvent appelés antennes cellulaires (Singla and Reiter, 2006). Les récepteurs et les molécules de signalisation sont concentrés au niveau des cils primaires et séquestrés du reste de la membrane plasmique. Nachury note que les cils primaires ont une surface 500 fois inférieure à l'ensemble de la membrane plasmique d'une cellule et un volume 5 000 fois inférieur à celui du cytoplasme (Nachury, 2014).

Cette caractéristique distinctive est propice à leur rôle de plaque tournante de la communication permettant aux cils de transduire les informations extracellulaires en voies de signalisation intracellulaires en aval afin de déclencher les réponses physiologiques appropriées.

Plusieurs récepteurs et canaux ioniques sont localisés sur la membrane ciliaire, où un nombre croissant de signaux extracellulaires sont reçus et transduits par l'ensemble ciliaire, facilitant certaines voies de signalisation qui contrôlent le développement des organes, ainsi que les processus cellulaires (prolifération, différenciation, sénescence). Les voies de signalisation primaires liées aux cils sont particulièrement importantes : Wingless (Wnt), Hedgehog (Hh), les récepteurs tyrosine kinase (RTK), les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), la voie Notch, les facteurs de croissance transformant-β (TGF-β), cible mécaniste de la rapamycine (mTOR) et la voie de signalisation Salvador-Warts-Hippo (SWH). En outre, d'autres voies de signalisation ont été associées aux cils primaires, notamment la signalisation médiée par la protéine de la matrice extracellulaire, la signalisation médiée par le canal potentiel des récepteurs transitoires, la signalisation de la vasopressine dans les cellules épithéliales rénales, la signalisation de la somatostatine, de la sérotonine et de l'hormone de concentration de la mélanine**.**

- La voie Sonic Hedgehog SHH

La voie de signalisation Hedgehog (Hh) conservée au cours de l'évolution est une voie majeure du développement embryonnaire des vertébrés et du maintien des cellules souches. Elle est impliquée dans la régulation de plusieurs processus, y compris la formation des membres et des doigts, des os du crâne et de la face, et dans la différenciation des cellules du tube neural (Dessaud et al., 2008) (Placzek and Briscoe, 2018). Etant donné que la voie SHH est très importante pour la formation des membres, une dérégulation peut être responsable d'anomalies telle que la polydactylie qui est une malformation congénitale caractérisée par l'existence d'un doigt ou orteil surnuméraire. La relation de cette voie avec le cancer a été longtemps étudiée et il a été démontré des dérégulations de certaines tumeurs humaines, telles que le carcinome basocellulaire et le médulloblastome. De ce fait, cette voie joue un rôle important dans l'évolution de la radio et de la chimiorésistance de plusieurs types de tumeurs. Ainsi, une meilleure connaissance de la voie SHH ouvre des perspectives pour des thérapies ciblées contre les tumeurs cérébrales en tenant compte d'un aperçu moléculaire multifactoriel. C'est pourquoi des études émergentes sont menées afin de trouver de nouveaux inhibiteurs de la voie de signalisation SHH, qui pourraient être utilisés en toute sécurité dans les essais cliniques (Skoda et al., 2018).

La voie Hh a été décrite pour la première fois dans des cellules non ciliées chez *Drosophila melanogaster* où son activation était non canonique (He et al., 2017; Riddle et al., 1993). Bien que le processus intracellulaire précis de la signalisation Hh est légèrement divergé entre les espèces, impliquant différents mécanismes et composants protéiques, il a été démontré que les cils primaires jouent un rôle essentiel dans la signalisation Hh dans le développement des vertébrés et des invertébrés. L'association entre Hh et les cils a d'abord été établie à partir d'un dépistage génétique chez la souris basé sur la structure du tube neural des embryons de souris. Ce dépistage identifie un ensemble de gènes nécessaires (comme les gènes IFT) à la signalisation normale de Hh et à la formation des cils primaires (Huangfu et al., 2003).

Il a été suggéré que le cil fonctionne comme le centre de transduction de la voie Hh, il concentre tous les acteurs primordiaux de la voie qui à travers le cil subit une activation dite canonique (Goetz et al., 2009).

Il existe trois protéines qui peuvent activer la voie Hh chez les mammifères : Sonic-Hedgehog (SHH), Indian-Hedgehog (IHH) et Desert-Hedgehog (DHH). Ce sont des facteurs de signalisation paracrine qui permettent la communication entre les cellules. l'expression de IHH est limitée au cartilage et au tube digestif, celle de DHH est limité aux gonades, notamment aux cellules de la granulosa des ovaires et aux cellules de Sertoli des testicules (Wijgerde et al., 2005).Vue son expression ubiquitaire, SHH est le plus étudié des trois ligands. Il joue un rôle particulièrement important dans la spécification des types de cellules du système nerveux et dans la formation des membres.

- **La voie « OFF »**

La signalisation HH implique de multiples interactions inhibitrices. En absence du ligand SHH, le récepteur à 12 domaines transmembranaires PTCH1 (Patched1) est situé à la base d'un cil primaire et inhibe l'activité du récepteurs 7 domaines transmembranaires SMO (Smoothened) par une cascade de signalisation non identifiée. SMO est une protéine de type GPCR (G protein-coupled receptor) et sa translocation dans la membrane ciliaire est une condition préalable à l'activation des GLI ((Goetz and Anderson, 2010) (Lee and Ko, 2016)). Ainsi, en absence de sa translocation dans le cil, les facteurs de translocation GLI seront inhibés par SUFU (un régulateur négatif de la voie de signalisation SHH) qui se lie directement aux protéines GLI et les séquestrent dans le cil, empêchant ainsi l'activation de la voie (Kogerman et al., 1999).

Cependant, les mécanismes spécifiques de l'inactivation des GLI par SUFU ne sont pas complètement compris. Les protéines GLI-FL (Glioma-associated oncogene homolog, full lengh) sont converties en une forme répressive raccourcie en C-terminal : GLI-R. Cette forme tronquée de GLIs est ensuite partiellement dégradée après une phosphorylation ultérieure par le glycogène synthase kinase 3 bêta (GSK3β), la caséine kinase I (CK1) et la protéine kinase A (PKA) (Teglund and Toftgård, 2010). Les protéines GLI retenues dans le cytoplasme par SUFU sont ensuite dégradées ou traitées, ce qui inhibe la signalisation SHH (Humke et al., 2010) Lorsque les GLI-R se déplacent vers le noyau, ils répriment les gènes cibles de la voie SHH, y compris PTCH1 et GLI1 eux-mêmes (boucle de rétro-contrôle) (Figure 13).

- **La voie « ON »**

En présence d'un ligand SHH ou d'un agoniste de la voie comme le SAG (Smo AGonist), l'inhibition de SMO par PTCH1 au niveau du cil primaire est abolie : PTCH1 est internalisé et dégradé. SMO migre alors à l'intérieur du cil en passant par la zone de transition et puis par l'axonème où il sera acheminé grâce aux IFT pour arriver à l'extrémité du cil où il va s'accumuler. Ainsi, SMO sera activé et stabilisé par le déclenchement de la cascade de signalisation SHH en aval (Denef et al., 2000).

L'activation de SMO va permettre d'arrêter l'inhibition des GLIs via l'inactivation de SUFU. qui sera hyper-phosphoryler par plusieurs protéines kinase comme les PKC (protéine kinase C), PI3K (phosphoinositide-3-kinase) et d'autres (Lauth et al., 2007). L'inactivation de SUFU va permettre la libération des GLIs. On notera qu'il existe trois protéines GLI (GLI1, GLI2 et GLI3). Ce sont des facteurs de transcription à doigt de zinc exprimés chez les vertébrés dans des domaines qui se chevauchent et sont partiellement redondants. Ces trois protéines sont SHH-dépendantes, où seule GLI1 se présente comme un activateur transcriptionnel complet (full-length). Tandis que GLI2 et GLI3 agissent comme des régulateurs négatifs ou positifs (GLI2A activateur ou GLI2R répresseur et GLI3A activateur ou GLI3R répresseur, respectivement) de la voie en fonction des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles qu'elles auront subies (dont les clivages protéolytiques) (Sigafoos et al., 2021). Le passage de la forme GLI3A à la forme GLI3R est favorisé par rapport à GLI2. Par conséquent, les GLI2s agissent

majoritairement comme des facteurs de transcription activateurs, tandis que les GLI3s agissent comme des répresseurs. Donc quand des GLIA (activateurs) sont libérés, notamment GLI2 va subir une translocation nucléaire (migrer du cytoplasme vers le noyau). GLI2 est un facteur de transcription qui se fixe sur des régions régulatrices du génome et favorise l'expression de gènes cibles de la voie y compris *PTCH1* et *GLI1*, dans une boucle de rétrocontrôle négative ou positive, respectivement (Kong, Siebold, et Rohatgi 2019) (Figure 13).

Il a été démontré que la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, rétiniennes et neurales ainsi que le développement des tissus épithéliaux au cours de l'organogenèse, sont en partie modulés par la voie SHH (Briscoe and Thérond, 2013). En plus, comme les cils primaires sont essentiels pour la transduction de la signalisation SHH, ils jouent un double rôle permettant une régulation positive et négative de la voie. Il a été démontré que des cils anormaux peuvent conduire à des phénotypes de perte de fonction SHH dans le tube neural, ou à des phénotypes de gain de fonction SHH dans les membres, ce qui indique que la voie SHH peut jouer un rôle important dans la biogenèse des cils primaires (Alves et al., 2023) et causer des ciliopathies/pathologies.

Avec l'état d'avancement des connaissances et des modèles d'études disponibles, il est devenu possible de tester cette voie de signalisation avec des modèles d'études *in vitro* et *in vivo*.

In vitro la voie SHH peut être activée par le traitement des cellules avec des ligands activateurs de la voie avec ou sans induction de la ciliogénèse. Les ligands les plus utilisés sont le SAG (Smoothened Agoniste) ou la rhSHH (recombinant-human Sonic hedgehog), ils diffèrent par leur mode d'action.

Le SAG a la même action que SMO : il va donc activer la voie SHH en court-circuitant l'activité de SMO, c'est-à-dire sans avoir besoin que ce dernier subisse une translocation ciliaire. Ainsi l'utilisation du SAG ne permettra pas de déterminer un défaut de translocation ou de la fonction de SMO dans les cellules de patients présentant une altération de la voie SHH.

Le rh-SHH joue le rôle du ligand SHH présent dans le corps humain, il va se fixer sur PTCH1 et induire la translocation de SMO dans le cil permettant ainsi l'activation de la voie en suivant toutes les étapes de la cascade de signalisation. Le choix de l'activateur de la voie SHH dépend donc des questions biologiques posées.

Grâce aux différents modèles existant et notamment aux modèles cellulaires, il est possible d'étudier le fonctionnement de la voie SHH à plusieurs niveaux. Au niveau de l'ARNm, il est possible de déterminer le niveau d'activation de la voie en analysant le niveau de transcription des gènes cibles de la voie comme *PTCH1* et *GLI1* par qRTPCR. Au niveau protéique, il est possible de visualiser la translocation de SMO dans le cil ou la localisation des GLIs dans le cytoplasme ou le noyau grâce à leur marquage par immunofluorescence (IF) avec des anticorps spécifiques. La réalisation de western blot (WS) permet d'identifier la présence de chaque protéine dans les différents compartiments de la cellule et d'établir les rapport GLI2 et GLI3 cytoplasmique vs nucléaire ou GLI3R vs GLI3A.

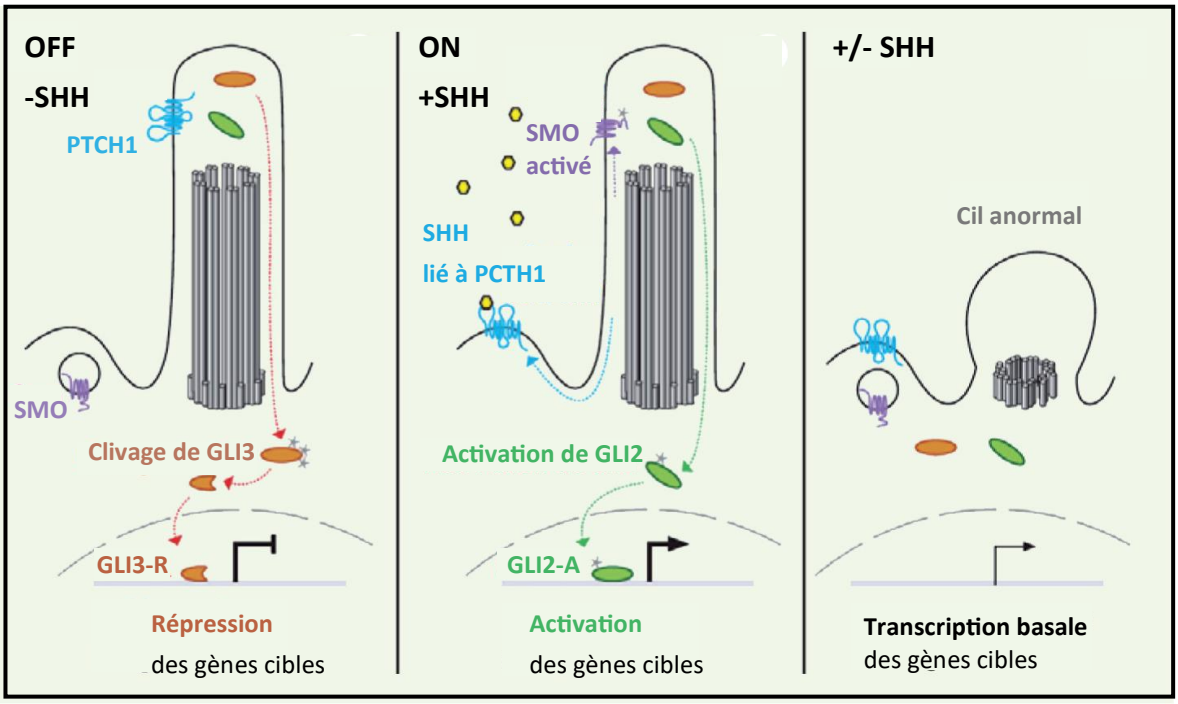


Figure 13 : La voie SHH à travers le cil primaire. Présentation schématique de la régulation de la cascade de signalisation de la voie SHH quand elle est OFF en absence du ligand SHH, ON en présence du ligand et dans le cad d'une anomalie ciliaire (adapté de Laclef *et al*. 2014)

III. Les ciliopathies

A. Définition

Le terme « ciliopathie » regroupe des pathologies humaines causées par une anomalie du cil consécutive à des variations pathogènes dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation et la fonction du cil. Il s'agit de maladies génétiques rares dont les prévalences peuvent varier de 1/1000 (pour les plus fréquentes comme les polykystoses autosomales dominantes, PKD) à 1/1 000 000 (dans le cas des ciliopathies ultra-rares comme le syndrome d'Alström) (Choudhury et al., 2021) (McConnachie et al., 2021).

Un large groupe de plus de 35 maladies génétiques humaines, connues sous le nom de "ciliopathies", a été lié à plus de 180 protéines associées aux ciliopathies (Reiter and Leroux, 2017; Wheway et al., 2015). En plus de l'hérédité mendélienne monogénique, l'oligogénisme (quand une maladie est due à des mutations dans 2 ou plusieurs gènes), les modifications génétiques, les interactions épistatiques (ce sont les interactions existant entre 2 ou plusieurs gènes, l'un d'entre eux masquant ou empêchant l'expression des autres) et les insertions de rétrotransposons ont toutes été décrites lors de la définition du phénotype des ciliopathies (Focșa et al., 2021).

La classification des ciliopathies est basée sur la physiopathologie sous-jacente et permet la distinction entre les ciliopathies « motiles » (dyskinésie ciliaire) et « non motiles ».

- Comme leur nom l'indique, les ciliopathies « motiles », sont causés par des anomalies du cil motile consécutives majoritairement à des variations dans les gènes codant pour des protéines en lien avec les bras de dynéines affectant ainsi la motilité du cil. Elles peuvent aller des anomalies isolées telle que la stérilité masculine (le spermatozoïde est pourvu d'un cil motile) à des troubles multisystémiques tels que la dyskinésie ciliaire primaire (PCD, MIM244400) qui est la ciliopathie motile la plus courante. Les patients atteints présentent des *situs inversus*, des bronchites et sinusites chroniques et des problèmes de fertilité (Wallmeier et al., 2020).

- Les ciliopathies « non motiles » sont des maladies du cil primaire dont la présence est quasi-ubiquitaire dans le corps humain. Il s'agit donc de pathologies pléiotropiques qui touchent principalement dix organes : la rétine, les gonades, le système nerveux central, le système olfactif, le foie, les reins, le tissu adipeux, les membres et le squelette (Marion et al., 2011). Ces atteintes d'organes peuvent être soit isolées (ex : RP où seule la rétine est atteinte) soit associées c'est-à-dire plusieurs organes simultanément sont atteints : on parle d'une forme syndromique (ex : Syndrome de Bardet Bidl, BBS).

Ces pathologies sont caractérisées par une forte hétérogénéité phénotypique et génétique.

L'hétérogénéité phénotypique est expliquée par le fait qu'un individu atteint d'une ciliopathie peut présenter plusieurs signes cliniques simultanément mais pas nécessairement toutes les manifestations typiques du syndrome. Par exemple, seulement certains les patients BBS sont concernés par la polydactylie (Figure 14).

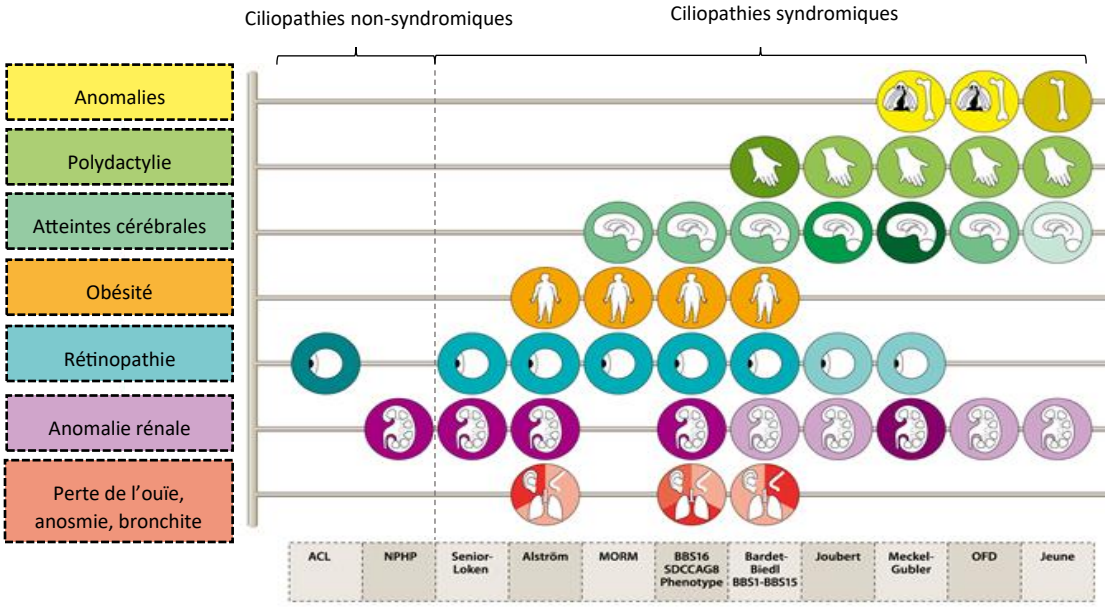


Figure 14 : L'hétérogénéité phénotypique des ciliopathies. Représentation des différentes atteintes dans chacun des sous-groupes de ciliopathies sous leurs formes isolés et syndromiques. La couleur des organes plus ou moins foncée représente leur atteinte plus ou moins sévère. Le chevauchement des phénotypes entre les sous-groupes rend le diagnostic clinique compliqué. (ACL : Amaurose congénitale de Léber, ALMS : syndrome d'Alström, NPHP : Néphronophtises, MKKS : syndrome de McKusick Kaufman, BBS : syndrome de Bardet-Biedl, JBT : syndrome de Joubert, MKS : syndrome de Meckel-Gruber, OFD : syndrome Oro-facial-digital) (Laboratoire de Génétique Médicale, U1112).

L'hétérogénéité génétique est expliquée par le fait que plusieurs gènes peuvent être responsables de la même pathologie (ex : 26 gènes sont connus pour être responsable du syndrome de Bardet-Biedl qui est un sous-groupe des ciliopathies) (Melluso et al., 2023) (Figure 15).

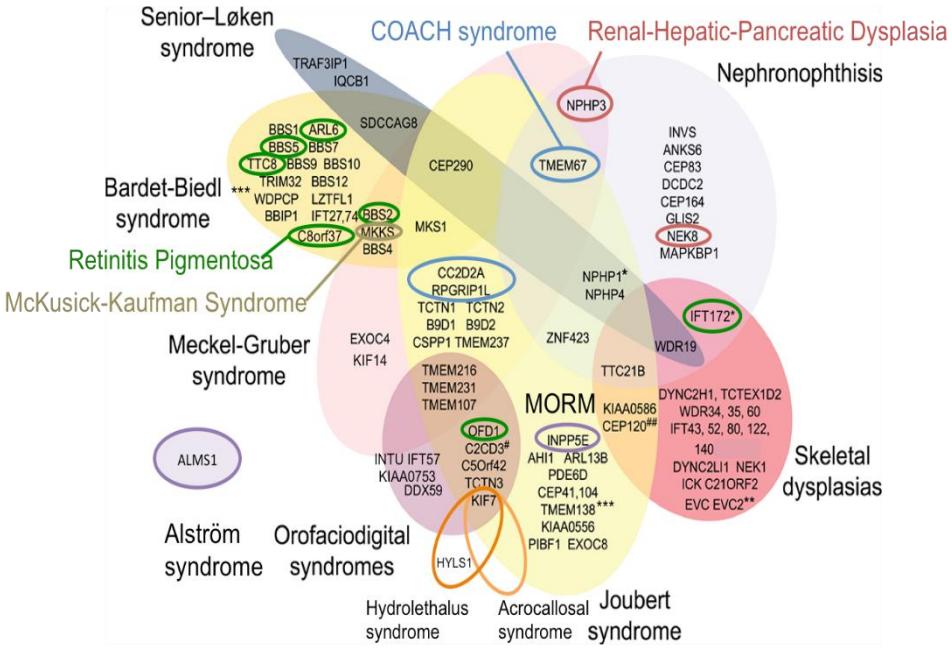


Figure 15 : L'hétérogénéité génétique des ciliopathies. Représentation des chevauchements des gènes impliqués dans les ciliopathies : certains gènes peuvent être responsable de plusieurs ciliopathies d'où la complexité du diagnostic moléculaire. (BBS : syndrome de Bardet-Biedl, MKS : syndrome de Meckel-Gruber, JBT : syndrome de Joubert, NPHP : Néphronophtises ; MKKS : syndrome de McKusick Kaufman et ALMS : syndrome d'Alström) (Adapté de Mitchison *et al.* 2017).

Du fait de leur mécanisme physiopathologique commun, les ciliopathies présentent un chevauchement moléculaire. Par exemple, le gène *BBS1* peut être responsable aussi bien d'un syndrome de Bardet-Biedl que d'une rétinopathie pigmentaire isolée (Estrada-Cuzcano et al., 2012). Les ciliopathies sont également caractérisées par un chevauchement clinique : chacune présente l'association d'atteintes d'organes précise dressant ainsi des tableaux cliniques typiques mais certains des signes cliniques sont communs entre deux ciliopathies distinctes.

L'atteinte prédominante permet d'orienter le diagnostic vers un sous-groupe de ciliopathies et c'est l'association parfois spécifique de signes cliniques additionnels qui oriente plus spécifiquement le diagnostic. Par exemple, le syndrome oro-facio-digital (OFD) est caractérisé par une atteinte squelettique prédominante alors que le syndrome de Meckel-Gruber (MKS) est caractérisé par une atteinte neurologique prédominante (Zaghloul and Katsanis, 2009) Ainsi, 2 patients peuvent avoir des signes cliniques proches mais des anomalies génétiques dans des gènes différents. L'examen clinique seul aurait potentiellement conclut à la même ciliopathie. Mais, le diagnostic moléculaire permet de conclure à deux ciliopathies différentes.

- Le laboratoire s'intéresse aux ciliopathies non motiles qui forment un vaste groupe de maladies génétiques provoquées par un défaut du cil primaire et plus particulièrement au syndrome de Bardet-Biedl (BBS) qui sera défini par la suite.

B. Le syndrome de Bardet-Biedl

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS, MIM# 209900) est un sous-groupe de ciliopathies primaires. C'est une maladie génétique rare héréditaire à transmission autosomique récessive qui touche plusieurs organes (Beales et al., 1997). Il s'agit de la première ciliopathie décrite en 2003 (Ansley et al., 2003) bien que cette maladie soit connue depuis 1866, lorsque les médecins Laurence et Moon (Laurence and Moon, 1995) ont décrit pour la première fois le phénotype, comprenant la rétinite pigmentaire, la déficience intellectuelle, l'hypogonadisme et la paraplégie spastique, dans quatre cas. Des décennies plus tard, un phénotype similaire, consistant en une obésité, une dystrophie rétinienne, une polydactylie et des problèmes cognitifs avec des difficultés d'apprentissage, a été rapporté en 1920 par le Docteur Bardet et en 1922 par le professeur Biedl (Moore et al., 2005). Il s'agit d'une affection rare, dont la fréquence varie selon les zones géographiques. La prévalence du BBS varie de 1/160 000 dans les populations du nord de l'Europe (Waters and Beales, 2011) à 1/13 500 et entre ~1/45 000 et ~1/66 000 dans les communautés isolées du Koweït et de l'Ile de la Réunion respectivement, où règne un niveau de consanguinité plus élevé (Farag and Teebi, 1989; Gouronc et al., 2020).

1. Le phénotype du BBS

Les patients atteints du BBS sont caractérisés par le tableau clinique suivant associant : une rétinopathie pigmentaire (RP), une obésité, une insuffisance rénale, une polydactylie, un retard des acquisitions et un hypogonadisme. Ce tableau clinique n'est pas toujours complet chez les patients et en plus de ces manifestations majeures des manifestations mineurs peuvent aussi se rajouter telle que les anomalies hépatiques, le diabète, un retard de croissance et d'autres. De ce fait, les critères diagnostiques établis correspondent à l'association de 4 critères majeurs (RP, obésité, insuffisance rénale, polydactylie, retard des acquisitions et hypogonadisme) ou de 3 critères majeurs associés à 2 ou 3 critères mineurs (anomalie hépatique, diabète sucré, retard de croissance, retard psychomoteur, trouble du langage, retard de développement, strabisme, anomalies dentaires, perte auditive, malformations cardiaques) (Beales et al., 1999; Billingsley et al., 2011; Putoux et al., 2012) (Figure 16).

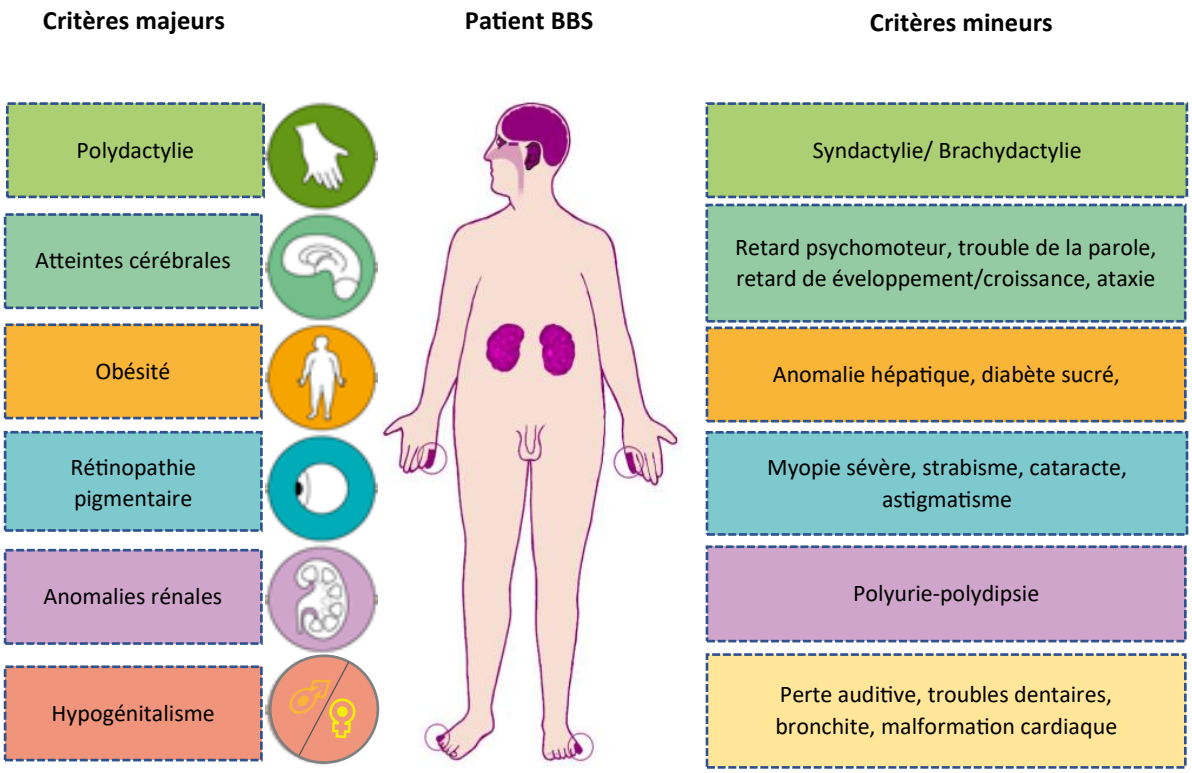


Figure 16 : Le phénotype typique BBS. Les critères majeurs et mineurs du phénotype d'un patients attient du BBS. Selon Beales *et al*. 1999, le diagnostic clinique d'un BBS se fait par l'association de 4 critères majeurs ou de 3 critères majeurs associés à 2 ou 3 critères mineurs (Laboratoire de Génétique Médicale, U1112).

2. Les signes cliniques majeurs du BBS

- La rétinopathie pigmentaire : La dystrophie rétinienne est l'atteinte la plus pénétrante affectant jusqu'à 100 % des patients. La formes la plus courante est une dystrophie bâtonnets-cônes avec une atteinte maculaire précoce. La dégénérescence des photorécepteurs se traduit par un dépôt de pigments au fond de l'œil d'où le nom de rétinopathie pigmentaire. Elle provoque une déficience visuelle qui apparaît généralement très tôt et aboutit à une cécité entre la deuxième et la troisième décennie de la vie pour la plupart des patients. (Denniston et al., 2014). Les examens permettant de faire le diagnostic d'une rétinopathie pigmentaire et de suivre son évolution sont : l'électrorétinogramme (ERG), un examen du fond de l'œil et un examen du champ visuel. La rétine est affectée dans presque toutes les ciliopathies du fait de présence des cils primaires dans les photorécepteurs (bâtonnets et cônes).

Comprendre la pathogénicité des dystrophies rétiniennes dans les ciliopathies est donc une condition préalable à la mise au point des thérapies ciblées.

- L'obésité : Les patients BBS présentent généralement une obésité (dans 72 à 92 % des cas). Les patients présentent généralement un poids normal à la naissance, mais dans 90 % des cas, ils prennent du poids au cours de la première année de vie et l'obésité devient évidente au cours des trois premières années de vie (Lee et al., 2022). L'apparition de l'obésité chez les patients BBS est due au fait que certaines protéines BBS sont impliquées dans la signalisation de la leptine (hormone de la satiété) à travers le cil primaire (Dam, 2018; Guo et al., 2016; Seo et al., 2009). Certaines études suggèrent que les cils sont nécessaires à la signalisation de la leptine dans l'hypothalamus. La leptine est l'hormone contrôlant la sensation de satiété qui, en cas, de dérégulation conduit à une hyperphagie et à l'obésité à long terme. Des modèles murins du BBS (*Bbs2-/-*, *Bbs4-/-* et *Bbs6-/-*), présentent une résistance à la leptine et une hyperlipidémie, le même mécanisme est observé chez les patients BBS qui présentent des taux plasmatiques de leptine élevés. En plus, il a été démontré que BBS1 interagit physiquement avec le récepteur de la leptine, et que BBS1 et BBS2 sont nécessaires au transport du récepteur de l'insuline vers la membrane. Les études portant sur les souris BBS (*Bbs2-/-*, *Bbs4-/-* et *Bbs6-/-*) montrent que les animaux présentent aussi une résistance à l'insuline. Ces études suggèrent un rôle central des protéines BBS dans le contrôle du poids corporel (Seo et al., 2009; Starks et al., 2015).

- La polydactylie postaxiale : La polydactylie postaxiale se trouve chez 63-81% des patients BBS. Son apparition est due au fait que certaines protéines BBS participent à la régulation des voies de signalisations impliquées dans le développement des membres et des doigts comme la voie SHH. Par exemple il a été démontré que BBS1 interagit avec des acteurs de la voie SHH comme SMO et PTCH1. Chez certaines souris, la perte de protéines Bbs entraîne une réduction de la réponse Shh qui pourrait être à l'origine de la polydactylie chez ces derniers (Priya et al., 2016). La majorité des patients ont un doigt surnuméraire entièrement formé sur le bord latéral du pied (plus fréquemment) ou de la main, la polydactylie peut être présente dans les quatre membres (21%), uniquement sur les mains (8%) ou uniquement sur les pieds (21%) (Beales et al., 1999). Il est intéressant de noter que la polydactylie méso-axiale peu courante peut aussi se trouver et elle est associée à des mutations du gène *BBS17*/*LZTFL1*) (Schaefer et al., 2014) ou *IFT27/BBS19* (Schaefer et al., 2019). D'autres caractéristiques secondaires peuvent aussi se manifester comme une brachydactylie (longueur des doigts plus court) (46%) ou une syndactylie, fusion de 2 doigts (8%, généralement entre le deuxième et troisième orteils).

- Les anomalies rénales : La prévalence des anomalies rénales chez les patients varie d'une étude à l'autre, l'une des raisons est liée à la définition de l'anomalie rénale considérée. Certains considèrent des anomalies structurelles des reins et d'autres

considère une perte de la fonction rénale. A savoir que les anomalies rénales dans le BBS peuvent être à la fois anatomiques et fonctionnelles et comprennent la dysplasie kystique, des reins avec une volumétrie variable (reins hyperéchogènes en anténatal par ex), des reins ectopiques, la néphrite tubulo-interstitielle, la glomérulosclérose, la polyurie et les défauts de concentration de l'urine et d'autres (Marchese et al., 2020). L'expression des protéines BBS dans le rein suggère que des facteurs locaux peuvent contribuer à l'atteinte rénale (Patnaik et al., 2020). Une étude a démontré que l'absence de l'un des principaux gènes BBS (le gène *BBS10*), provoquent plusieurs aberrations métaboliques dans une lignée cellulaire dérivée de l'épithélium rénal de souris (IMCD3-Bbs10-/-). Ces anomalies comprennent une augmentation de la glycolyse aérobie, une accumulation anormale de lipides cytoplasmiques et un dysfonctionnement mitochondrial : des facteurs contribuant à la progression de la maladie rénale. Ces aberrations biologiques sont connues pour être en corrélation avec l'apparition d'un dysfonctionnement rénal chronique dans la population générale et pourraient contribuer à l'incidence élevée du dysfonctionnement rénal chez les patients BBS (Marchese et al., 2022).

- L'hypogonadisme : L'hypogonadisme ou les anomalies génito-urinaires sont présents chez 59 % des patients atteints de BBS (Forsyth and Gunay-Aygun, 1993). Les patients peuvent présenter un retard dans l'apparition des caractères sexuels secondaires, une cryptorchidie (9 %), un micropénis, des testicules de petit volume, un utérus malformé, une atrésie vaginale et d'autres anomalies génitales. Les femmes ont souvent un cycle menstruel irrégulier et des ovaires polykystiques (14,7 %, une caractéristique mineure) (Niederlova et al., 2019).

- Retard des acquisitions : Le retard des acquisitions est présent chez 60 à 66 % des patients. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) montre une réduction du volume de la matière grise de l'hippocampe et une perte du volume en matière blanche dans le faisceau longitudinal inférieur droit (McIntyre et al., 2016). Le retard du développement est souvent global mais il est parfois spécifique à certains domaines, comme la motricité et/ou le langage. Les retards de langage sont souvent pris en charge par la thérapie orthophonique. Kerr *et al* ont rapporté que le fonctionnement intellectuel moyen des patients était inférieur de 1,5 déviations standards par rapport aux attentes normales, mais que seuls 20 à 25 % des patients répondaient aux critères diagnostiques (Kerr et al., 2020) (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, DSM-5) de la déficience intellectuelle (Zacchia et al., 2017b)(Gouronc et al., 2020).

3. Les gènes impliqués dans le BBS

A ce jour et grâce aux progrès des méthodes de séquençage, 26 gènes ont été identifiés comme responsables du BBS (Meyer et al., 2022; Solarat and Valverde, 2023). L'ensemble des

protéines codées par ces gènes BBS participent au fonctionnement ou à la formation du cil primaire (Novas et al., 2015). Cependant, pour certains gènes, le rôle des protéines qu'ils codent reste à déterminer. Tous ces gènes sont répartis sur plusieurs autosomes et représentent au total plus de 200 exons, pour lesquels il y a eu l'identification de variants pathogènes permettant ainsi de résoudre environ 80% des cas BBS examinés cliniquement. La plupart des protéines BBS ont été détectées à la base du cil primaire, certaines d'entre elles ont été détectées le long du cil et d'autre ont des localisations extra ciliaires (dans le noyau et le réticulum endoplasmique). Les protéines ainsi que leur localisation et leurs fonctions sont listés dans le tableau ci-dessous et présentés dans la (
Figure 17).

Gène	Nom de la protéine	Locus chromosomique	Localisation dans la cellule	Tissus spécifiques	Fonctions/ localisations ciliaires
BBS1	Bardet-Biedl syndrome 1	11q13.2	Cil et corps basal	Non	Composant du complexe BBSome
BBS2	Bardet-Biedl syndrome 2	16q13	Cil et corps basal	Non	Complexe BBSome
BBS3/ARL6	Bardet-Biedl syndrome 3 ADP ribosylation factor like GTPase 6	3q11.2	Cil, corps basal, zone de transition, cytosol	Non	GTPase impliquée dans le trafic ciliaire
BBS4	Bardet-Biedl syndrome 4	15q24.1	Cil et corps basal	Non	Composant du complexe BBSome
BBS5	Bardet-Biedl syndrome 5	2q31.1	Corps basal	Non	Composant du complexe BBSome
BBS6/MKKS	Bardet-Biedl syndrome 6 MKKS centrosomal shuttling protein	20p12.2	Cil et corps basal	Non	Composant du complexe chaperonine-like
BBS7	Bardet-Biedl syndrome 7	4q27	Cil et corps basal	Non	Composant du complexe BBSome
BBS8/TTC8	Bardet-Biedl syndrome 8 tetratricopeptide repeat domain 8	14q31.3	Cil, IFT et corps basal	Non	Composant du complexe BBSome
BBS9	Bardet-Biedl syndrome 9	7p14.3	Cil	Non	Composant du complexe BBSome
BBS10	Bardet-Biedl syndrome 10	12q21.2	Corps basal	Non	Composant du complexe chaperonine-like
BBS11/ TRIM32	Bardet-Biedl syndrome 11 tripartite motif containing 32	9q33.1	Filaments intermédiaires	Non	Ubiquitine ligase E3, dégrade plusieurs cibles
BBS12	Bardet-Biedl syndrome 12	4q27	Corps basal	Non	Composant du complexe chaperonine-like
BBS13/ MKS1	Bardet-Biedl syndrome 13 MKS transition zone complex subunit I	17q22	Corps basal	Non	Composant du complexe tectonic-like situé dans la zone de transition du cil primaire
BBS14/ CEP290	Bardet-Biedl syndrome 14 centrosomal protein 290	12q21.32	Corps basal et centrosome	Non	Protéine du centrosome impliqué dans la formation du cil primaire
BBS15/ WDPCP	Bardet-Biedl syndrome 15 WD repeat containing	2p15	Cytosol, axonème et membrane plasmique	Non	Contrôle la ciliogénèse

	planar cell polarity effector				
BBS16/ SDCCAG8	Bardet-Biedl syndrome 16 SHH signaling and ciliogenesis regulator	1q43-q44	Corps basal, zone de transition et centriole	Non	Impliqué dans la ciliogénèse et la voie SHH
BB17/ LZTFL1	Bardet-Biedl syndrome 17 leucine zipper transcription factor like I	3p21.31	Cil et corps basal	Surtout dans les tissus lymphoïdes	Régulele trafique du BBSome et la voie SHH
BBS18/ BBIP1	Bardet-Biedl syndrome 18 BBSome interacting protein I	10q25.2	Cytosol	Surtout dans les testicules	Composant du complexe chaperonine-like
BBS19/ IFT27	Bardet-Biedl syndrome 19 intraflagellar transport 27	22q12.3	Cil, IFT et corps basal	Non	Composant de l'IFT-B
BBS20/ IFT172	Bardet-Biedl syndrome 20 intraflagellar transport 172	2p23.3	Vésicules	Non	Composant de l'IFT-B
BBS21/ CFAP418/ C8ORF37	Bardet-Biedl syndrome 21 cilia and flagella associated protein 418	8q22.1	Corps basal et base du cil	Non	Fonction non déterminer
BBS22/ IFT74	Bardet-Biedl syndrome 22 intraflagellar transport 74	9p21.2	Cil, IFT et corps basal	Non	Composant de l'IFT-B
BBS23/ CEP19	Centrosomal protein 19	3q29	Centrosome	Non	Recrute la GTPase RABL2B à la base ciliaire et au complexe IFT-B
SCAPER	S-phase cyclin A associated protein in the ER	15q24.3	Réticulum endoplasmique, tip du cil	Non	Dynamique et désassemblage du cil
SCLT1	Sodium channel and clathrin linker 1	4q28.2	Centriole	Non	Composant des appendices distaux qui ancrent le cil à la membrane plasmique, impliqué dans la ciliogénèse
NPHP1/ CEP164	Nephrocystin 1	2q13	Zone de transition	Surtout dans le muscle squelettique	Signalisation de la matrice cellulaire au niveau de l'adhésion focale

Tableau 2 : Liste des gènes BBS. Listes des gènes connus responsables du syndrome de Bardet-Biedl chez l'Homme, leur localisation cellulaire et leur fonction (adapté de (Melluso et al., 2023)).

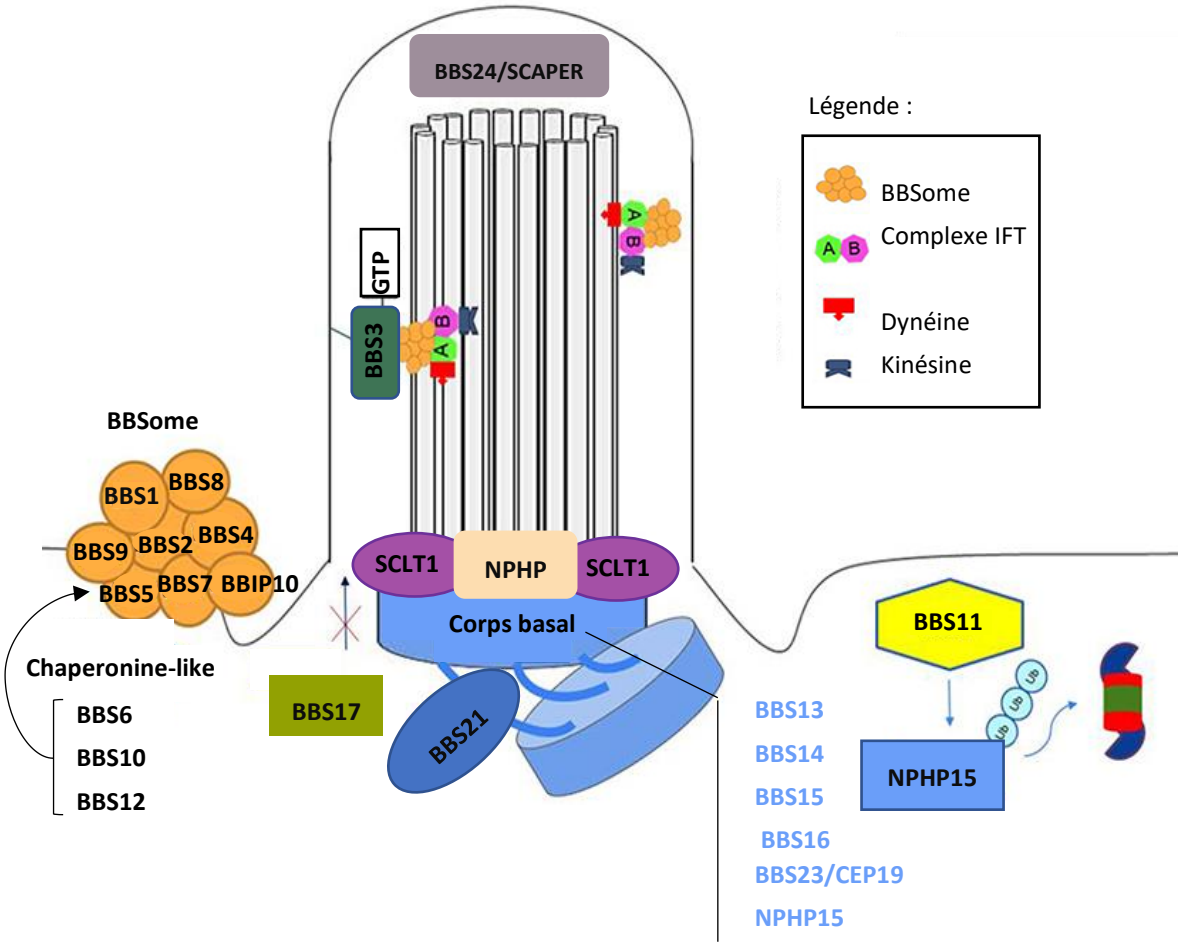


Figure 17 : Les protéines BBS. Représentation de la localisation des protéines BBS autour du cil primaire (adapté de Melluso *et al*. 2023).

La contribution de ces 26 gènes BBS est variable et peut selon les populations être différentes comme sur l'île de La Réunion avec le gène BBS3/ARL6 qui est majoritaire (Gouronc et al., 2020) (Figure 18).

Des variants pathogènes dans les gènes *BBS1* à *BBS24* représentent de 80 % à 100% des cas dans le monde selon les cohortes de patients (McConnachie et al., 2021; Shamseldin et al., 2020). *BBS1* et *BBS10* sont les contributeurs majeurs du *BBS*, environ 50 % des diagnostics dans les pays occidentaux sont dus à des mutations dans trois gènes : *BBS1*, *BBS2* et *BBS10* (Zacchia et al., 2021). Dans les populations caucasiennes, les mutations des gènes *BBS1* et *BBS10* sont en effet détectées chez 21 à 30 % des patients (Janssen et al., 2011; Muller et al., 2010) pourcentage qui atteint 40 à 50 % chez les patients d'Europe du Nord (Harville et al., 2010).

Un effet fondateur est à l'origine des deux mutations les plus courantes en Europe du Nord : p.M390R (*BBS1*, c.1169T>G représentant 70 % des cas de *BBS1*) et p.C91Lfs*5 (*BBS10*, c.271dupT représentant 48 % des cas de *BBS10*). Le reste des gènes *BBS* connus sont très

rarement mutés dans les familles BBS identifiées et représentent chacun ≤5% des cas BBS. Certains d'entre eux n'ont été identifiés que dans quelques familles BBS, ils sont donc des contributeurs mineurs du syndrome (Khan et al., 2016) et pour certains le statut de gène candidat est encore discuté (*TRIM32/BBS11*). Par exemple, le gène *BBS5* n'est retrouvé muté que chez 2% des patients BBS.

La plupart des gènes *BBS* ont une faible spécificité tissulaire. Il existe quelques exceptions telle que *BBS18*/*BBIP1* qui est principalement exprimé dans le testicule, *BBS17*/*LZTFL1* qui est exprimé dans le tissu lymphoïde et *NPHP1* dans le muscle squelettique. Presque tous les gènes *BBS* sont liés à la fonction du cil primaire et plusieurs d'entre eux ont été décrits dans d'autres ciliopathies. Par exemples des variants des gènes *BBS13, BBS14* et *BBS16* ont été identifiés dans le syndrome de Meckel (Schaefer et al., 2011) et des variants du gène *CEP290/NPHP6* dans les syndromes de Joubert, Senior-Løcken, Meckel-Gruber, la néphronophtise et l'amaurose congénitale de Leber (Zacchia et al., 2017a). Ce chevauchement génétique entres les différents sous-groupes de ciliopathies rend le diagnostic moléculaire compliqué. Malgré les difficultés du diagnostic, le BBS est la ciliopathie avec le taux de résolution le plus élevé avec plus de 80%, et seulement 20% des cas restent irrésolus (Mitchison and Valente, 2017). Des études supplémentaires seront requises afin de pouvoir résoudre les familles encore négatives.

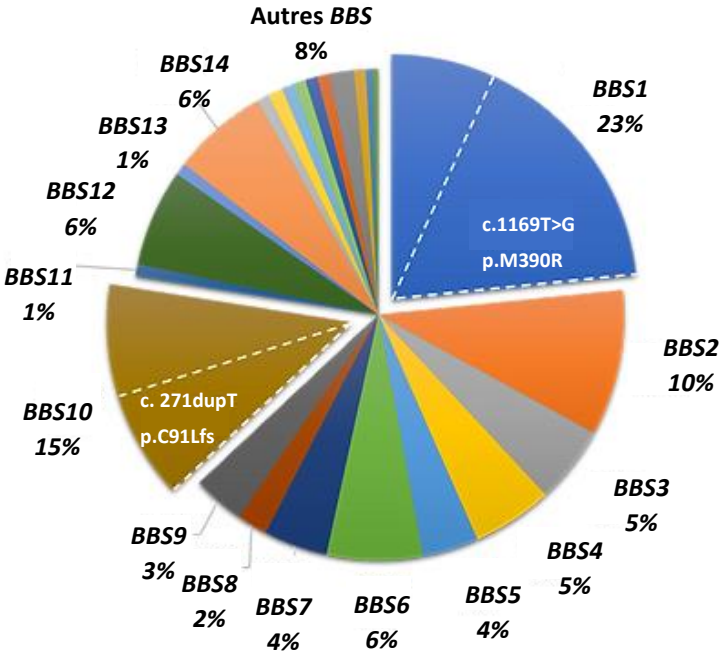


Figure 18 : Le pourcentage de patient mutés pour chacun des gènes BBS. Le camembert présente la contribution de chacun des gènes BBS chez les 80% de patients résolus (adapté de https://www.bardet-biedl.com, 2022).

IV. La Recherche translationnelle

Depuis 2002, le Laboratoire de Génétique Médicale (LGM, U1112) s'est concentré sur l'identification des causes moléculaires des dystrophies syndromiques rétiniennes (SRD) en se focalisant plus particulièrement sur les ciliopathies. Le Laboratoire cherche à identifier les mécanismes moléculaires (variations et gènes) responsables de ciliopathies, à caractériser les mécanismes physiopathologiques sous-jacents dans le but de révéler de possibles options thérapeutiques. Le LGM U1112 est une unité mixte de recherche (INSERM, Université de strasbourg) qui fait la transition entre l'activité de recherche clinique du service de génétique médicale des Hôpitaux Universitaire de Strasbourg (HUS), l'activité de diagnostic et l'activité de recherche scientifique plus fondamentale. Ainsi, l'équipe du laboratoire est constituée de cliniciens, de scientifiques et de bio-informaticiens qui développent une recherche translationnelle. Cette recherche a comme point de départ l'observation clinique de patient atteints de maladies génétiques rares dans le but d'identifier les causes génétiques de leur affection et d'en étudier les mécanismes physiopathologiques (au niveau cellulaire et au niveau d'organismes modèles) pour aboutir à des hypothèses thérapeutiques ouvrant la voie vers des projets de thérapies précliniques pour enfin retourner vers le patient (Figure 19). Le patient est donc le point de départ et le point d'arrivée de cette recherche. La recherche translationnelle permet de faire un lien direct entre la recherche fondamentale et la recherche clinique. Le flux bidirectionnel des connaissances entre les scientifiques et les médecins permet d'améliorer et d'enrichir les deux types de recherches. D'une part, l'évolution des techniques du diagnostic moléculaire et des tests fonctionnels pour la validation des variants permet d'identifier les causes moléculaires pour les patients concernés par « l'errance diagnostic », de rendre ainsi un résultat au patient et de confirmer son diagnostic clinique. Ce résultat est très important pour les patients et les membres de sa famille qui pourront bénéficier d'un conseil génétique dans le cas d'un projet parental. D'autre part, les observations cliniques permettent de favoriser l'exploration de nouvelles pistes, théories ou concepts dans l'étude des mécanismes physiopathologiques. Cela permettra une meilleure compréhension du rôle des gènes/protéines au niveau de la cellule et des organelles où ils sont exprimés, d'enrichir donc la connaissance. Dans le cadre des ciliopathies les cliniciens et les biologistes moléculaires font face à plusieurs difficultés liées à la grande hétérogénéité et chevauchement clinique et génétiques de ces pathologies. Comme il a déjà été expliqué, les formes syndromiques de ciliopathies sont caractérisées par une hétérogénéité phénotypique et génétique qui rendent le diagnostic clinique et moléculaire compliqués, les cliniciens et les chercheurs doivent franchir plusieurs défis aux différentes étapes de l'étude afin de pouvoir arriver à un résultat fiable. Des stratégies de diagnostic clinique et moléculaires ont donc été mis en place afin de faciliter ces étapes et d'harmoniser les critères d'évaluation entre tous les centres qui travaillent sur ces pathologies.

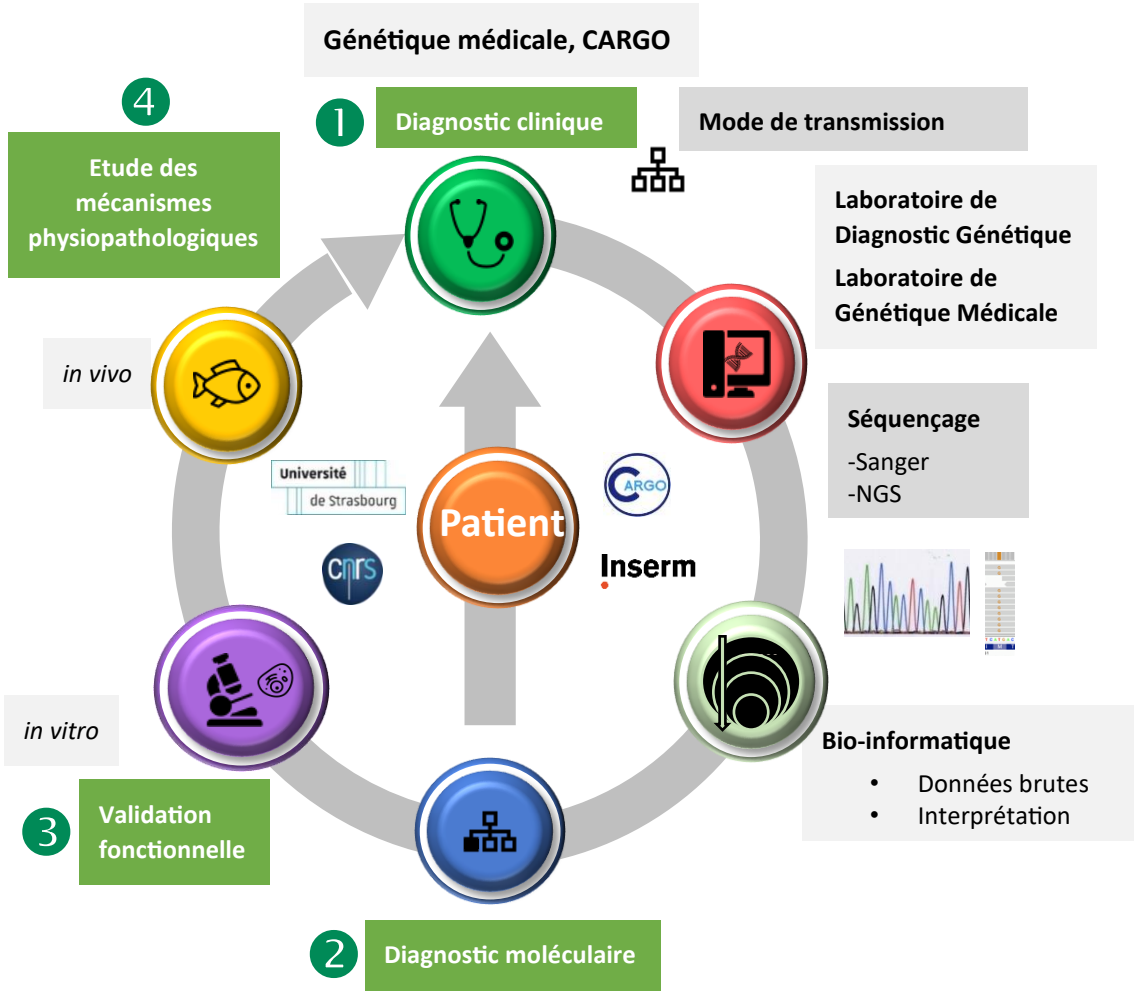


Figure 19 : La recherche translationnelle. Représentation des différentes étapes de la recherche appliquée dans le laboratoire de Génétique Médicale-U1112. CARGO : **C**entre de référence pour les **A**ffections **R**ares en **G**énétique **O**phtalmologiques**.**

A. Le diagnostic clinique

Le patient est orienté vers un centre de référence en fonction de son atteinte clinique. A Strasbourg, le CARGO (Centre de références pour les maladies génétiques rares ophtalmologiques) est le centre de référence pour tous les patients présentant des anomalies ophtalmologiques sous leur forme isolé et syndromique. Un bilan clinique sera réalisé pour le patient, le clinicien établit un formulaire clinique listant les atteintes et en fonction du niveau de complexité du tableau clinique du patient, même si le nom du syndrome est évident, une confirmation par un diagnostic moléculaire est indispensable.

Il existe des tableaux cliniques caractéristiques de chaque sous-groupe de ciliopathies, ils ont été établis en fonction des signes majeurs observés dans chacun de ces derniers. Les sous-groupes de ciliopathies sont définis par l'association spécifiques de phénotypes typiques, par exemple dans le syndrome de Bardet-Biedl le diagnostic est établi en fonction du nombre de signes cliniques observé chez les patients. Parfois une atteinte majeure peut être présente que dans un sous-groupe de ciliopathies et pas dans l'autre permettant ainsi de distinguer entre les deux. Par exemple, en théorie le syndrome de Joubert se distingue du syndrome de Meckel-Gruber par l'absence d'anomalies squelettiques et crânio-faciale.

Un autre critère important à prendre en considération est l'âge du patient lors du diagnostic clinique, certains symptômes et signes majeurs sont consécutifs d'une dégénérescence progressive et apparaissent tard, généralement au cours de la première décennie de la vie. Il est donc très fréquent que le phénotype ne répond pas aux critères de diagnostic dès le début de la vie. Le tableau clinique complet varie donc d'un individu à l'autre, d'où l'importance d'assurer un suivi continue et régulier des patients dans le meilleur des cas dès la petite enfance afin d'affiner au plus le diagnostic et de permettre une prise en charge optimale avec le temps.

1. La difficulté du diagnostic clinique dans le cadre du BBS

Les antécédents familiaux négatifs pour le BBS sont fréquents, comme c'est le cas pour d'autres maladies autosomiques récessives. A savoir que le diagnostic précoce est encore plus difficile, en raison de l'apparition progressive de certains signes cliniques au fil du temps.

Des signes cliniques sont particulièrement visibles de manière précoce (période anténatale) dont les anomalies rénales (comme des reins hyperéchogènes avec l'apparition de kystes). Mais ces observations sont clairement non spécifiques. Des reins hyperéchogènes pré/péri-nataux peuvent également être observés dans d'autres pathologies telles que la polykystose rénale autosomique récessive et dominante (ARPKD, ADPKD), ainsi que dans d'autres ciliopathies syndromiques, telles que le syndrome de Meckel-Gruber (Simonini et al., 2022). En France, l'analyse systématique des reins lors de la seconde échographie réalisée au second trimestre de la grossesse (entre 22 et 24 semaines d'aménorrhées) permet de détecter ce type

d'anomalies. En cas de détection positive, il est fortement recommandé de recherche une polydactylie afin de préciser les diagnostics différentiels (Mary et al., 2019). La polydactylie est plus complexe à identifier et ne fait pas partie des éléments systématiquement recherchés à l'échographie en dehors d'antécédents spécifiques. La polydactylie souvent associée avec des anomalies génito-urinaires à l'échographie prénatale, sa présence incite à la suspicion clinique (Forsythe et al., 2018). L'obésité est un autre signe assez précoce (petite enfance), les patients qui ont un poids corporel normal à la naissance, développent souvent une obésité au cours de la première année de vie (Forsythe and Beales, 2013). D'autres symptômes et signes majeurs apparaissent plus tard, généralement au cours de la première décennie de la vie, il est donc très fréquent que le phénotype ne répond pas aux critères de diagnostic dès le début de la vie. Le tableau clinique complet varie d'un individu à l'autre, selon Beales *et al* (Beales et al., 1999) l'âge moyen du diagnostic est de 9 ans (Gupta et al., 2022). Dans le « Clinical Registry Investigation of BBS » (CRIBBS), l'âge médian au moment du diagnostic est de 5,8 ans (Pomeroy et al., 2021). Il convient de noter que la variabilité phénotypique des patients atteints de BBS est assez élevée, même au sein d'une même famille, ce qui rend le diagnostic clinique difficile.

En plus, le chevauchement phénotypique avec d'autres ciliopathies syndromiques constitue une autre difficulté dans l'établissement du diagnostic clinique. Les patients adultes atteints de BBS présentent par exemple un chevauchement clinique avec les syndromes de Senior-Løken (SLS, OMIM#266900) et d'Alström (ALMS, OMIM#203800). Le SLS est caractérise par une RP et des anomalies rénales et l'ALMS est caractérisé par une dystrophie rétinienne (cône-bâtonnet), une perte d'audition, une obésité et petite taille entre autres. Malgré toutes les informations sur les phénotypes majeurs de chacun des syndromes et les critères diagnostiques propres à chacune des pathologies, le diagnostic clinique des ciliopathies et donc du BBS en particulier reste un défi auquel les cliniciens font face avec chaque patient.

B. Le diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire permet d'identifier les causes génétiques de la pathologie des patients permettant ainsi aux cliniciens de confirmer le diagnostic clinique réalisé ou de le réorienter en cas d'incertitude (si le gène trouvé ne correspond pas à l'hypothèse émise). Pour réaliser le diagnostic moléculaire un prélèvement biologique est réalisé (biopsies de peau, échantillons sanguins, échantillons de salive) auprès des patients et de ses parents si possibles et constitue la source du matériel biologique (ADN, ARN, protéines) permettant les analyses suivantes. Une exploration globale des séquences de l'ADNg sera ensuite réalisée pour le trio (le cas index et ses parents) grâce aux différentes techniques de séquençage afin d'identifier le(les) variant(s) pathogène(s) dans le gène chez le patient à l'état homozygote (ou hétérozygote composite) et chez les parents à l'état hétérozygote (dans le cas de la plupart des ciliopathies) et ainsi confirmer la ségrégation familiale.

En général, les ciliopathies, comme la plupart des maladies mendéliennes, sont des maladies monogéniques causées par la mutation d'un seul gène. La pénétrance de ces maladies est complète c'est-à-dire tous les individus qui portent le gène muté sont malades. Par contre, une

variabilité clinique significative a été rapportée parmi les frères et sœurs porteurs des mêmes mutations génétiques, ce qui suggère l'existence de modificateurs génétiques, épigénétiques ou même environnementaux capables de moduler leur manifestation phénotypique. Il a été donc constaté que certaines familles BBS présentaient d'hérédité oligogénique, c'est-à-dire que les mutations autosomiques récessives d'un gène *BBS* (2 mutations bialléliques) doivent être associées à une troisième mutation hétérozygote (3ème mutation monoallélique) d'un gène distinct pour devenir pénétrantes (il s'agit d'un triallélisme) (Badano et al., 2006; Lindstrand et al., 2016; Perea-Romero et al., 2022). Cette notion d'hérédité oligogénique" a été aussi décrite pour les cas de néphronophtise, une ciliopathie caractérisée par une atteinte rénale (Salomon et al., 2009). L'existence de modificateurs phénotypiques génétiques montre une corrélation positive entre la présence de certains variants hétérozygotes et l'apparition de manifestations neurologiques, rétiniennes ou rénales (Khanna et al., 2009; Tory et al., 2007). Toutefois, ces résultats doivent être confirmés par des cohortes plus importantes et indépendantes.

Avant 2010, l'identification des gènes mutés était possible par l'application de techniques permettant d'analyser un nombre limité de gènes connus (gène par gène) comme le séquençage Sanger ou l'analyse à une résolution limitée comme par l'analyse chromosomique par puce à ADN (ACPA, anomalies de quelques centaines de kb) et d'autres.

Depuis 2010, le nombre de gènes et de variants de ciliopathies identifiés par an a augmenté de manière exponentielle, grâce à l'amélioration des technologies de séquençage de l'ADN. En plus des techniques de séquençages ciblé (TES) de panels de gènes spécifiques à chaque sous-groupe de ciliopathies, l'avènement récent des stratégies de séquençage de l'exome entier (WES, whole exome sequencing) et du génome entier (WGS, whole genome sequencing) a accéléré de manière impressionnante l'identification de nouveaux gènes de ciliopathie. Les techniques de séquençage à haut débit ou de nouvelle génération (NGS) ont révolutionné le diagnostic génétique, permettant de séquencer simultanément, rapidement et à moindre coût des centaines de gènes ciliaires dans de vastes cohortes de patients (Knopp et al., 2015). À ce jour, plus de 150 gènes responsables de ciliopathies non-motiles sont connus et les études fonctionnelles ont révélé des corrélations intéressantes entre la fonction et le domaine ciliaire de la protéine mutée et le phénotype clinique sous-jacent.

C. Stratégie diagnostique

Pour réaliser le diagnostic moléculaire des ciliopathies, du syndrome de Bardet-Biedl en particulier, le laboratoire de génétique médicale suit une stratégie de diagnostic caractérisé par un pipeline utilisant les techniques du séquençage à haut débit (NGS) (Figure 20). Une première étape est réalisée en collaboration avec le laboratoire de diagnostic génétique au CHU de Strasbourg qui réalise en première intention la recherche des mutations récurrentes dans les gènes majeurs du syndrome (*BBS1* et *BBS10*). Si aucun variant n'est identifié dans les gènes les plus fréquemment mutés du syndrome, un séquençage d'un panel de 158 gènes de ciliopathies sera effectué. Le séquençage de ce panel permet de chercher des variants dans

des gènes connus dont la pathogénicité dans les ciliopathies a déjà été confirmé. Si le séquençage du panel ne donne aucun résultat la prochaine étape réalisé au laboratoire de recherche est le séquençage complet soit de l'exome (WES) soit du génome (WGS) qui est devenu techniquement possible et plus rentable, offrant de nouvelles opportunités pour le diagnostic et la recherche sur les maladies mendéliennes (Polla et al., 2015) . Le WES est le séquençage des régions du génome humain codant pour les protéines. Ces 180 000 exons représentent ∼2 % de l'ensemble du génome, mais contiennent environ 85 % des mutations héréditaires causant des maladies mendéliennes (Choi et al., 2009). Des études font état d'une sensibilité de 98,3 % pour la détection de mutations précédemment identifiées par cette méthode (DiStefano and Kingsley, 2018). Le WES permet de rechercher des variants à la fois dans les gènes déjà impliqués dans une ciliopathie tout en permettant si aucun gène connu semble responsable de la pathologie de rechercher également dans les autres gènes encore non impliqués en pathologie mais dont le rôle est relié aux cils primaires d'une façon directe ou indirect (par les interactions avec d'autres gènes ciliaires par exemple). Toutefois, il ne faut pas oublier que les variants affectant les régions régulatrices et non codantes de l'ADN peuvent être à l'origine de certains cas de ciliopathies, ce type de variants ne peuvent pas être détecté par le WES. Donc, malgré son grand succès dans la résolution des diagnostics moléculaires de familles négatives, le WES reste une technique limitée pour l'indentification de certains types de variants comme les variants non codants (zone non accessible) et les variations de structure (SV) comme les variations du nombre de copies (duplication ou délétion) ou les translocations équilibrées (pour des raisons techniques). Finalement, si toutes les techniques précédentes ne donnent aucun résultat, c'est-à-dire soit aucun variant dans aucun gène n'a été détecté, soit un seul variant à l'état hétérozygote a été identifié dans un gène connu. Dans le cadre des maladies récessives, il faut rechercher un deuxième variant dans le même gène pour que l'analyse soit complète et concluante, dans ce cas, le génome complet sera séquencé (WGS). Le WGS permet de séquencer le génome en entier y compris les régions promotrices, non codantes et les régions régulatrices et ne nécessite pas de passer par une étape de capture (préparation d'une librairie de séquences) contrairement aux techniques précédentes. Cette technique permet une couverture plus homogène permettant de détecter des variants de structures plus facilement avec notamment l'accès aux points de cassures de ces remaniements du génome.

Globalement, les techniques de séquençage à haut débit citées précédemment génèrent une quantité massive de données qui a nécessité le développement de logiciel bio-informatiques pour permettre leur analyse. Les données passent par plusieurs étapes d'annotations et de filtrations qui servent à réduire le nombre de variants et sélectionner ceux qui sont potentiellement pathogènes. L'annotation des variations et la détermination de leur pathogénicité repose depuis quelques années sur une nomenclature faisant suite à un besoin de standardisation dans la manière d'interpréter les variations d'un patient (Riggs et al., 2020).

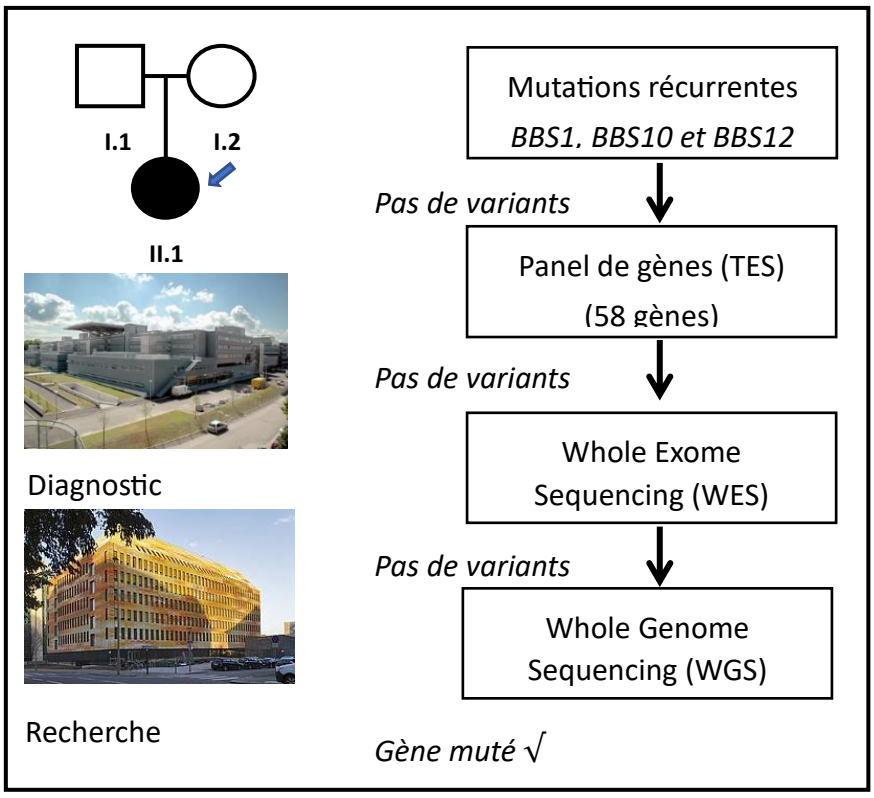


Figure 20 : Stratégie du diagnostic moléculaire. La stratégie suivie pour réaliser le diagnostic moléculaire (pipeline) dans le cas d'un BBS, grâce à un travail complémentaire entre le laboratoire de Diagnostic Génétique (Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg) le laboratoire de Recherche en Génétique Médical U-1112 (CRBS, Strasbourg) (Muller J. *et al* HG 2010, Redin C. *et al* JMG 2012, National Diagnostic decision tree ANPGM 08/2017).

D. Classification des variants et outils de prédictions

La mise en place du NGS a drastiquement amélioré le diagnostic moléculaire mais a également augmenté les problématiques de l'interprétation des variants avec de plus en plus de variations identifiées que cela soit dans des gènes déjà impliqués en pathologie mais également pour des nouveaux gènes dont les laboratoires n'ont pas encore d'expertise.

Pour homogénéiser et standardiser l'interprétation clinique des variants entre les laboratoires, plusieurs sociétés savantes, telles que l'ACMG/AMP (American College of Medical Genetics & Association for Molecular Pathology), EuroGentest/ESHG (European Society of Human Genetics) et ClinGen (Clinical Genome Resource) ont émis des recommandations pour guider les laboratoires dans l'interprétation (Amendola et al., 2016; Matthijs et al., 2016; Richards et al., 2015; Riggs et al., 2020). Ils ont mis en place un système de calcul de pathogénicité des variants basé sur plusieurs critères qui est devenu le standard mondial pour l'interprétation de l'analyse par NGS. Ce système de classification des variants adopté par la grande majorité des laboratoires, que cela soit pour le diagnostic ou la recherche en France, a comme objectif de

limiter la variabilité inter et intra-laboratoire dans l'interprétation des variants et d'aboutir à un consensus national proposé par le réseau NGS-Diagnostic (http://ffgh.net/index.php/presentation/les-reseaux-partenaires/reseau-ngs-diagnostic/182-reseaux/ngs/354-recommandations-professionnelles-du-reseau-ngs-diag). Le système de classification met en place une liste d'arguments et de critères à prendre en compte pour classer un variants donné. Les critères pris en compte par l'argumentaire sont les suivants : les données épidémiologiques, les critères cliniques, l'existence de variants associés, les données de ségrégation, les données computationnelles/bioinformatiques et les données fonctionnelles. Chacun des points sera étudié en se basant sur les informations déjà connues ou pas sur le gène et le variants en question. Voici les questions posées : le variant a-t-il déjà été rapporté dans d'autre familles ou pas (fréquence du variants) ? Quel est le niveau de sévérité du phénotype du patient en fonction des atteintes cliniques (modéré, moyen ou sévère) ? De quel type de variant s'agit-il (tronquant, faux-sens, etc.) ? Comment ce variant affecte la fonction protéique (perte ou gain de fonction) ? Tous ces arguments seront étudiés afin d'établir un score (faible, moyen, fort) pour chacun des points mentionnés selon les critères de l'ACMG/AMP (Figure 21). La combinaison des résultats permettra (des scores établis) d'assigner une des 5 classes suivantes au variant étudié :

- Classe 1 : variant bénin
- Classe 2 : variant probablement bénin
- Classe 3 : variant de signification incertaine (VSI)
- Classe 4 : variant probablement pathogène
- Classe 5 : variant pathogène

Il existe plusieurs ressources qui permettent de faciliter l'établissement des scores pour la classification des variants parmi lesquels on peut trouver ClinGen Pathogenicity Calculator (http://calculator.clinicalgenome.org), Varsome (https://varsome.com), InterVar Classify System (http://wintervar.wglab.org/evds.php), Franklin (https://franklin.genoox.com), ou encore MobiDetails (https://mobidetails.iurc.montp.inserm.fr/MD/ (Baux et al., 2021)).

Plusieurs bases de données de variations existent et sont mises à disposition de la communauté scientifique pour faciliter les annotations. D'une part, on peut considérer les bases incluant les populations à priori saines telle que gnomAD (http://gnomad.broadinstitute.org/ (Karczewski et al., 2020)) et 1000 Genomes (https://www.internationalgenome.org/ (Auton et al., 2015)) permettent d'avoir les informations sur la fréquence des variants dans la population générale. Plus les variants sont fréquents dans la population plus il y a de chance qu'ils ne soient pas responsables d'une pathologie rare. D'autre part, certaines bases de données intègrent des variations avec une interprétation déjà réalisée soit dans la littérature comme OMIM (https://www.omim.org/ (Amberger et al., 2015)) ou HGMD (https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php (Stenson et al.,

2020)) ou bien participative comme ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) ou Decipher (https://www.deciphergenomics.org/).

Les interprétations mises à disposition permettent d'apprécier la récurrence du variant dans la pathologie, les avis d'autres collègues au niveau international que ce soit pour des variations bénignes ou bien pathologiques.

Selon le type de variation des outils de prédictions bio-informatiques permettent également de compléter l'interprétation. Ainsi, pour les variations de type faux-sens, l'impact du variant sur la fonction protéique est estimé par une combinaison d'éléments tels que la conservation des acides aminés au cours de l'évolution, la différence de l'impact physicochimique, la modification d'éléments de la structure 3D des protéines (prédites ou réelles) qui sont intégrés dans des outils tels que SIFT (https://sift.bii.a-star.edu.sg/), PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/ (Ramensky et al., 2002)), Mutation Taster (https://www.mutationtaster.org/) ou Mutation Assessor (http://mutationassessor.org/r3/) et d'autres.

Parmi les variations dont l'interprétation reste difficile, les variations de type insertion/délétion en phase (inframe indel) sont assez typiques. La délétion ou la duplication d'un ou plusieurs acides aminés dans une protéine nécessite une parfaite connaissance de la fonction de ses domaines pour pouvoir correctement prédire un possible effet. Quelques outils ont été développés à cet effet tel que SIFT-indel (Hu and Ng, 2013), DDIG (Zhao et al., 2013) and Provean (Choi and Chan, 2015), mais le manque de recul actuel sur ce type de variant rend leur interprétation difficile.

Pour les variants de type « splice », l'impact du variant sur l'épissage alternatif peut également être estimé par certain logiciel comme SpiP (https://www.spip.net/fr_rubrique91.html), Splice AI et Alamut Visual (Sophia Genetics). Ces logiciels permettent par exemple de prédire les potentiels sites donneur (GU) et accepteur (AG) d'épissage permettant ainsi de proposer des hypothèses quant à des séquences de l'ADN qui peuvent être délétée ou insérée suite à l'épissage (par exemple l'insertion d'un exon cryptique).

L'interprétation et la validation des variants candidats qui n'ont pas été précédemment rapportés ou validés, appelés variants de signification incertaine (VSI, classe 3), restent un défi de taille. Il s'agit de variants identifiés dans un gène pour lequel le niveau de preuve de son implication dans la pathologie concernée est insuffisant ou bien d'un variant dans un gène déjà impliqué en pathologie mais dont le niveau de preuve n'est pas suffisant pour conclure de manière fiable. Lorsqu'un variant est assigné en classe 3 cela ne permet ni de l'utiliser dans la prise en charge éventuelle du patient et de sa famille, ni d'exclure son caractère causal dans la pathologie du patient. Le variant doit faire l'objet d'études complémentaires visant à apporter des arguments permettant de le reclasser soit en variant de classe 2 c'est-à-dire bénin, soit en varient de classe 4 (probablement pathogène). Par exemple, l'identification de ce variant chez d'autres patients indépendants présentant des caractéristiques cliniques similaires constitue un argument fort permettant d'apporter la preuve de pathogénicité (récurrence). Les

explorations fonctionnelles supplémentaires ont pour objectif d'apporter des arguments qui modifient son interprétation afin de déterminer son impact sur la structure et la fonction protéique (études fonctionnelles *in vitro*, étude de l'épissage, étude de ségrégation familiale).

	Benign		Pathogenic			
	Strong	**Supporting**	**Supporting**	**Moderate**	**Strong**	**Very strong**
Population Data	MAF is too high for disorder *BA1/BS1* **OR** observation in controls inconsistent with disease penetrance *BS2*		Absent in popiulation databases *PM2_Supporting* ^		Prevalence in affecteds statistically increased over controls *PS4*	
Computational And Predictive Data		Multiple lines of computation evidence suggest no impact on gene /gene product *BP4*	Multiple lines of computation evidence support a deleterious effect on the gene /gene product *PP3* Splicing variant at same nucleotide as established pathogenic variant *PS1_Supporting*[§]	Same predicted impact as established pathogenic variant *PM5* Protein length changing variant PM4		Predicted null variant in a gene where LoF is a known mechanism of disease *PVS1*
Functional Data	Well-established quantitative functional studies in patient derived tissue/cells show no deleterious effect *BS3* †		Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation *PM1_Supporting*		Well-established quantitative functional studies in patient derived tissue/cells show a deleterious effect *PS3*	
Segregation Data	Non-segregation with disease *BS4*		Co-segregation with disease in multiple affected family members *PP1*	Increased segregation data →		
De novo Data				*De novo* (without paternity & maternity confirmed) *PM6*	*De novo* (paternity & maternity confirmed) *PS2*	
Allelic Data		Observed *in trans* with a dominant variant *BP2* Observed *in cis* with a pathogenic variant *BP2*		For recessive disorders, detected *in trans* with a pathogenic variant *PM3*		
Other Data		Found in case with an alternative cause *BP5*	Patient's phenotype or FH highly specific for gene *PP4*			

Figure 21 : Les critères de classification des variants selon l'ACMG/AMP. Le tableau suivant organise chacun des critères en fonction du type de preuve et de la force des critères pour une affirmation bénigne (côté gauche) ou pathogène (côté droit). BS: benign strong, BP: benign supporting, FH: family history, LOF: loss-of-function, MAF: minor allele frequency, path: pathogenic, PM: pathogenic moderate, PP: pathogenic supporting, PS: pathogenic strong, PVS: pathogenic very strong (Ellingford *et al*. 2022).

E. Les tests fonctionnels pour valider l'implication des variants dans la pathologie

L'un des principaux défis de la génétique moléculaire humaine est l'interprétation des variants génétiques rares dont la signification clinique est incertaine (VSI). Un diagnostic concluant est important pour les différents acteurs impliqués dans la recherche translationnelle. Pour le patient, il s'agit d'enfin obtenir une certitude concernant la cause de sa maladie. Pour le clinicien, il s'agit d'être en mesure de fournir des soins optimaux au patient, de prédire l'évolution de la maladie, de conseiller le patient et les membres de sa famille en matière de

génétique. Le rôle du chercheur est d'apporter des preuves concluantes de la pathogénicité des variantes génétiques à savoir l'impact du variant sur la fonction de la protéine. Il existe une liste importante de tests fonctionnels qui peuvent être effectués pour répondre à ces questions de manière systématique sur tous les gènes et d'autres plus spécifiques. La preuve de pathogénicité est fondée sur des stratégies « omiques » (étude génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique) et des études de biomarqueurs. Ainsi, les tests de validations fonctionnels regroupent un ensemble d'expériences de biologie moléculaire et cellulaire permettant de faire des études *in vitro* et des expériences réalisées *in vivo* sur d'autres modèles comme les souris et les poissons zèbre (*in vivo*). Il est important de noter que la combinaison de plusieurs approches expérimentales est souvent nécessaire pour obtenir une évaluation complète des effets d'un variant génétique. De plus, la pertinence des tests dépendra du contexte spécifique du variant étudié et des connaissances actuelles sur la fonction de la protéine concernée.

Quelques exemples de ces tests sont listés ci-dessous :

1. Analyse de l'expression génique : l'étude de l'expression de l'ARNm par les techniques comme la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) ou l'analyse de l'expression génique à l'échelle du transcriptome (RNA-seq) qui permettent de déterminer les conséquences des variants génétiques identifiées sur le niveau d'expression de l'ARNm des gènes cibles, des anomalies d'épissage peuvent également être mis en évidence (Cummings et al., 2017; Kremer et al., 2017).
2. L'analyse de l'expression des protéines permet de démontrer la pathogénicité des variants génétiques dans de nombreux cas. Habituellement, elle est effectuée par les techniques de Western Blot (WB) permettant de démontrer si le variant entraîne une perte d'expression de la protéine correspondante ou pas. Si la protéine est présente en quantité normale, des tests supplémentaires de fonctionnalité de la protéine seront réalisés en fonction de la question biologique : (mesurer l'activité enzymatique si la protéine est une enzyme, vérifier l'interaction de la protéine avec d'autres protéine du complexe auquel elle appartient par Co-immunoprécipitation (Co-IP).
3. Études d'interactions : des techniques peuvent être réalisée pour vérifier si le variant modifie l'interaction d'une protéine avec son ligand ou sa protéine partenaire dans un complexe (Co-IP, système double hybride, FRET, etc) ou d'une protéine avec son ADN cible (chromatine immunoprécipitation (ChIP))
4. *Études fonctionnelles cellulaires in vitro* : les effets des variants peuvent être évalués au niveau cellulaire soit en utilisant des cellules dérivées de patients avec le défaut génétique soit en utilisant un système modèle knock-out (perte d'expression totale du gène) / knock-down (surexpression de l'allèle muté). Des expériences de complémentation ou de restauration d'un phénotype peuvent aussi être réalisées. Elles consistent à introduire la version sauvage du gène d'intérêt dans la cellule affectée et observer si, dans ce cas, le phénotype est semblable au contrôle ou pas. Les tests cellulaires peuvent inclure des tests de prolifération, de migration, d'adhérence

cellulaire ou des essais spécifiques dépendants de la fonction connue ou supposée de la protéine étudiée. Il y a une dizaine d'année, il a été découvert que les cellules somatiques peuvent être reprogrammées en cellules souches pluripotentes (iPSC, induced pluripotent stem cell) pouvant être différenciées à leur tour en de multiple types cellulaires ou aboutir à la formation d'organoïdes. Ce modèle a ouvert la possibilité d'étudier les variants dans les cellules différenciées dérivées de patients pour des tissus encore difficilement accessibles (œil, cerveau, rein). Ceci permettra d'étudier le rôle des variants dans le processus de différentiation de ces derniers (toujours en comparaison avec un modèle WT).

5. Études fonctionnelles *in vivo* : tests d'expression de variants dans des modèles animaux (comme la souris, le poisson zèbre, la drosophile, la levure et d'autres), suivis de tests fonctionnels appropriés sont souvent effectuées pour étudier les conséquences fonctionnelles de ces variants. De telles expériences peuvent fournir des preuves solides de l'effet d'un variant sur la fonction biologique dans un système d'études *in vivo*. Cela peut être réalisé en générant des animaux transgéniques ou des modèles knock-out ou knock-in.
6. Études épidémiologiques : Dans le cas des variants génétiques associées à des maladies complexes, des études épidémiologiques peuvent être menées pour évaluer l'association du variant à la maladie dans des populations humaines.

Il existe une grande diversité de tests fonctionnels qui n'a de cesse d'évoluer avec le perfectionnement continue des techniques de biologie moléculaires et cellulaires. Il est à noter que ces tests sont souvent développés par les laboratoires de recherche pour identifier des biomarqueurs et sont finalement transférés au laboratoire de diagnostic pour faciliter le diagnostic des futurs patients.

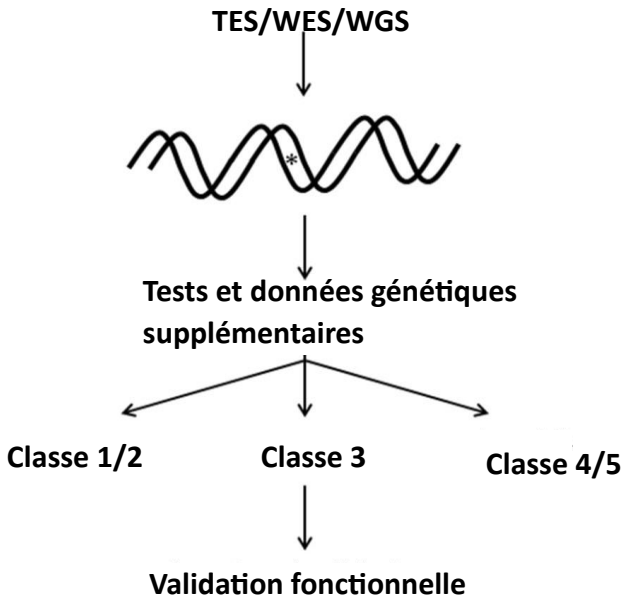


Figure 22 : Du test génétique à la validation fonctionnelle. Après le séquençage ciblé, de l'exome entier ou du génome, les variants génétiques sont analysés par des outils bio-informatiques et des tests génétiques supplémentaires (par exemple, analyse de ségrégation, études de population) sont réalisés. Sur la base de ces données, les variants sont classés comme bénins/probablement bénins (classe 1/2), signification incertaine (classe 3) ou probablement pathogènes/pathogènes (classe 4/5). Pour les variants de classe 3, les études de validation fonctionnelle sont un outil puissant pour obtenir des preuves d'une pathogénicité possible.

V. Les problématiques

Le Laboratoire de Génétique Médicale (LGM, U1112) s'est concentré sur l'identification des causes moléculaires des dystrophies rétiniennes syndromiques (SRD), et plus précisément des ciliopathies. L'hétérogénéité clinique des ciliopathies non-motiles se reflète dans leur hétérogénéité génétique et l'avènement récent des stratégies de séquençage de l'exome et du génome entiers (WES, WGS) a facilité et accéléré de manière impressionnante l'identification de nouveaux gènes de ciliopathies. À ce jour, nous connaissons plus de 150 gènes responsables de ciliopathies non-motiles et les études fonctionnelles ont pour objectif de révéler des corrélations entre le phénotype clinique des patients et la fonction du gène. Par exemple, une approche combinant Les technologies "omiques" (la génétique, la protéomique et la biologie cellulaire) a permis d'éclaircir le "paysage ciliaire", en mettant en évidence des interactions, des complexes protéiques et des voies de signalisations. Elles ont également permis d'élargir le spectre des ciliopathies pour y inclure d'autres troubles apparemment non apparentés.
Cependant, malgré les progrès majeurs réalisés ces dernières années, à ce jour, plusieurs familles restent encore négatives (par exemple 20% des familles BBS restent encore négatives) c'est-à-dire sans diagnostic moléculaire confirmé pour des raisons différentes. Dans un cas, l'exploration génétique (panel, exome) mis en place n'a pas permis d'identifier de variant pouvant expliquer le phénotype observé. Dans d'autres cas, une ou des variations de signification incertaines (VSI, classe 3) ont été découvertes dans un gène connu ou un gène dont l'implication reste encore à être démontrée (gène candidat). Dans ces 2 cas, des explorations génétiques et moléculaires plus poussées sont nécessaires pour soit 1) identifier les causes génétiques soit 2) re-classer les variants de classe 3 (en classe 2 ou classe 4) grâce aux études fonctionnelles pour finalement émettre un diagnostic génétique sûr. Il est important de souligner que seule l'identification d'un ou deux variant(s) pathogène(s) ou probablement pathogène(s) selon les critères de l'ACMG (respectivement, classe 4 et 5) permet de proposer un conseil génétique au couple ayant un nouveau projet parental incluant un DPI (Diagnostic Pré Implantatoire) ou un DPN (Diagnostic Pré Natal).

Dans un premier temps et au vu de l'importance du diagnostic moléculaire, l'objectif principal est de résoudre des familles considérées comme « négatives » pour lesquelles le diagnostic génétique n'était pas confirmé et nécessitant la mise en œuvre d'études fonctionnelles plus poussées. J'ai donc développé et appliqué « la boite à outils ciliopathie » : un panel de techniques de biologie moléculaire et cellulaire utilisée pour interpréter les impacts cellulaires et ciliaires de plusieurs variants de significations incertaines (VSI) identifiés chez les patients. L'objectif était d'infirmer ou confirmer leur impact sur la protéine considérée et finalement pouvoir les reclasser.

Une fois le diagnostic moléculaire résolu, nous cherchons à comprendre l'implication des protéines ciliaires dans la structure et la fonction du cil primaire. Nous cherchons également à identifier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents pour répondre à cette 2ème question « comment et pourquoi le variant de ce gène mène à l'apparition des phénotypes

ciliaires ? ». Une compréhension plus approfondie de ces mécanismes représente le plus grand défi à relever dans le domaine de la recherche sur les ciliopathies à l'heure actuelle.
Nombreuses sont les études qui rapportent déjà des analyses fonctionnelles de variants de gène de ciliopathies affectant la ciliogénèse (longueur du cil et son nombre), mais également le fonctionnement du cil (voies de signalisations notamment la voie SHH) ou d'autres processus cellulaires plus généraux telle que la prolifération cellulaire. Cependant, les résultats publiés sont très variables ce qui rend leur comparaison difficile. Il n'est donc pas possible d'établir un lien systématique entre la cause génétique et le phénotype ciliaire correspondant. Mon deuxième objectif de thèse était donc de déterminer les causes de la variabilité des phénotypes ciliaires en répondant aux questions suivantes :

- Existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire en fonction des conditions expérimentales (espèce, tissus…) ?
- Existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire pour des variants différents au sein du même gène ?
- Existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire pour des variants dans différents gènes BBS ?
- Existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire pour des variants dans des gènes codant des protéines BBS localisées dans les mêmes compartiments ciliaires (BBSome, IFT, Chaperonine…) ?

Dans le cadre de ce manuscrit, j'ai décidé de présenter mon sujet de thèse autour de 3 projets. Pour chaque partie, j'ai ré-introduit plus en détails le sujet, rédiger un synopsis qui résume les principaux résultats et les conclusions développées dans les articles associés à chaque fin de partie. Ce travail a permis la rédaction de 4 manuscrits dont un est déjà publié, 1 est soumis et 2 sont en cours de finalisation.

Projet 1 : **Développement de tests fonctionnels (« boite à outils ciliopathies ») pour l'identification des phénotypes cellulaires ciliaires**

Objectif : mettre au point les tests fonctionnels regroupés dans la « boite à outils ciliopathie » sur des fibroblastes cutanés dérivés de contrôles pour identifier le « phénotype ciliaire de référence ».

Projet 2 : Validation fonctionnelle de variants candidats et étude comparative du phénotype ciliaire pour différents gènes BBS : application de la « boite à outils ciliopathies ».

- **Le projet portant sur *BBS5***

Objectif : résoudre la famille par la validation de VSI, et caractériser le phénotype ciliaire des fibroblastes cutanés dérivés du patient.

L'étude de ce patient était une étude pilote qui m'a permis de faire la preuve de principe de la « boite à outils ciliopathie » et de confirmer son utilité. Dans cette partie, je présente aussi toutes les expériences non publiées que j'ai testées sur les cellules de ce patient dans le but de compléter la « boite à outils ciliopathie ».

L'article portant sur les variants dans le gène *BBS5* est d'ores et déjà publié dans International Journal of Molecular Sciences :

WGS Revealed Novel BBS5 Pathogenic Variants, Missed by WES, Causing Ciliary Structure and Function Defects. Adella Karam*, Clarisse Delvallée*, Alejandro Estrada-Cuzcano, Véronique Geoffroy, Jean-Baptiste Lamouche, Anne-Sophie Leuvrey, Elsa Nourisson, Julien Tarabeux, Corinne Stoetzel, Sophie Scheidecker, Louise Frances Porter, Emmanuelle Génin, Richard Redon, Florian Sandron, Anne Boland, Jean-François Deleuze, Nicolas Le May, Hélène Dollfus and Jean Muller

- **Le projet portant sur l'étude comparative des phénotypes ciliaires BBS**

Objectif : comparaison des phénotypes ciliaires causés par différents gènes BBS (*BBS1*, *BBS10* et *BBS20/IFT172*) appartenant à différents complexes ciliaires (BBSome, chareponine-like, IFT).

Pour établir l'état de l'art sur le phénotype ciliaire causé par les gènes BBS, une recherche bibliographique a été réalisée dans un premier temps. Les conclusions qui ressortent de ce travail, nous ont amené à appliquer la boite à outils à une sélection de patients BBS déjà résolus afin de déterminer si des variabilités du phénotype ciliaire seront observées en fonction des variants, du gène ou du compartiment ciliaire étudiés.

Le manuscrit portant sur la caractérisation du phénotype ciliaire des patients avec des variants dans les gènes *BBS1*, *BBS10* et *IFT172* est en cours de rédaction et sera soumis prochainement.

Towards a systematic cellular characterization of the ciliary phenotype of Bardet-Biedl genes. Adella Karam[1], Gaelle Hayot[1], Aurélie Gouronc, Marine Legendre, Pascal Kessler, Nicolas Le May, Hélène Dollfus, Jean Muller

Projet 3 : Application de la « boite à outil ciliopathie » pour valider des variants de gènes responsables de maladies génétique rare avec une atteinte du cil primaire.

- **Projet portant sur *PIK3C2A* et sur *CDK10***

Objectif : résoudre des familles négatives par la validation des VSI, et étudier les rôles ciliaires des protéines PIK3C2A et CDK10 par la caractérisation du phénotype ciliaire chez les patients.

Cette fois j'ai appliqué la « boite à outil ciliopathie » sur les fibroblastes cutanés de patients atteints du syndrome OCSKD (oculoskeletodental syndrome) et du syndrome d'AI Kaissi. Ces deux pathologies de descriptions récentes partagent de nombreuses caractéristiques avec les ciliopathies et sont dues à des mutations biallélіques dans deux gènes *PIK3C2A* et *CDK10* respectivement qui codent pour des protéines impliquées dans divers fonctions cellulaire et ayant un rôle au niveau du cil primaire.

Le manuscrit portant sur PIK3C2A est en cours de rédaction et sera soumis prochainement.
Refining the *PIK3C2A* related phenotype genotype charaterization and link with functional SHH primary cilia defect. Adella Karam[1]*, Clarisse Delvallée[1]*, Bénédicte Gérard, Elodie Javey, Pascal Kessler, Valérie Pelletier, Jean-Baptiste Lamouche, Nicolas Le May, Jean Muller and Hélène Dollfus

L'article portant sur *CDK10*, est rédigé et va être soumis dans les prochaines semaines.

A *CDK10* allelic series further refines the Al Kaissi syndrome.

Manon Chretien, Adella Karam, Sabine Genicot, Pascal Kessler, Benoit Arveiler, Tania Attie Bitach, Sevcan Bozdogan, Theresa Brunet, Daniel Calame, Perrine Charles, Benjamin Cogne, Claude Darcha, Anne-Catherine Dock-Bregeon, Martin Elferink, Carole Goumy, Evren Gumus, Isabella Herman, Bertrand Isidor, Béatrice Josselin, Kimia Kahrizi, Boris Keren, Fanny Laffargue, James R. Lupski, Vincent Michaud, Jeremie Mortreux, Hossein Najmabadi, Marie-Emmanuelle Naud, Renske Oegema, Davut Pehlivan, Juliette Piard, Amélie Piton, Laure Raymond, Marcia Rodrigues, Hans-Hilger Ropers, Heide Seidel, Aurélien Trimouille, Dominik Sebastian Westphal, Hélène Dollfus, Elise Schaefer, Pierre Colas, Jean Muller

II.

<u>Projet 1</u> : Développement de tests fonctionnels (« boite à outils ciliopathies ») pour l'identification des phénotypes cellulaires ciliaires

I. Synopsis

Afin de confirmer l'impact d'un variant sur la fonction de la protéine et son effet sur le cil, j'ai mis au point « la boite à outils ciliopathie » qui regroupe de tests classiquement utilisés en biologie moléculaire et applicables à tous les gènes quelques soit la pathologie et d'autres qui sont très spécifiques des ciliopathies. Ces tests incluent l'analyse qualitative et quantitative de l'ARN (RT-PCR et Sanger, RT-qPCR) et de la protéine (Western blot, Immunofluorescence) concernée. Au sein du laboratoire, nous travaillons sur des fibroblastes issus de biopsie de peau de patients ou d'individus sains utilisés comme contrôles. Il s'agit d'un bon modèle d'études des ciliopathies car il est possible d'induire la ciliogénèse *in vitro* et de finalement pouvoir étudier l'impact des variants sur le cil.

- Sélection des tests spécifiques des ciliopathies présent dans la boite à outils :

Pour étudier un défaut de ciliogénèse, il est possible d'induire la formation du cil primaire, de le marquer par immunofluorescence pour ensuite déterminer le nombre de cellules pourvues d'un cil (rapporter au nombre total de cellules) et sa longueur. Il s'agit d'une technique mise en place dans plupart des études qui portent sur la caractérisation de gène de ciliopathie et le reclassement de VSI (Geoffroy et al., 2018; Hey et al., 2021; Luo et al., 2021; Stoetzel et al., 2016).

Pour étudier le fonctionnement ciliaire, il est possible d'induire la formation du cil primaire et de stimuler *in vitro* l'activation d'une des voies de signalisation par l'ajout d'agoniste. La stimulation de la voie SHH a déjà été rapporté dans de nombreuse études et permet d'induire l'expression de gènes cibles via une cascade de signalisation décrite dans la littérature (Bangs and Anderson, 2017; Ruel and Thérond, 2009; Sigafoos et al., 2021). Il est possible d'étudier le défaut d'activation de cette voie à différents niveaux (les récepteurs membranaires, les GLI, les gènes cibles). Un défaut d'activation de cette voie reflète un dysfonctionnement ciliaire comme cela a déjà été rapporté dans la littérature (Estrada-Cuzcano et al., 2020; Luo et al., 2021; Sasai et al., 2019; Wang et al., 2021).

Les cils primaires sont des organites dynamiques dont l'assemblage et le désassemblage sont des processus étroitement régulés au cours du cycle cellulaire. L'assemblage du cil a lieu pendant la phase G0 (phase de quiescence), c'est-à-dire après la sortie de la cellule de la mitose, et le désassemblage a lieu avant la mitose donc avant que la cellule se prépare pour la division. Ceci met en évidence une coordination étroite entre le cycle cellulaire et la ciliogénèse (Goto et al., 2017; Zhao et al., 2023). Un dysfonctionnement ciliaire peut vraisemblablement altérer cette coordination comme cela a déjà été rapporté dans la littérature (Delgehyr and Spassky, 2014; Izawa et al., 2015; Kasahara and Inagaki, 2021; Pan et al., 2013). Des tests de prolifération, simplement mis en place au laboratoire U1112, grâce à l'utilisation du système d'imagerie en temps réel Incucyte (Sartorius), pourraient permettre de détecter une anomalie du cycle cellulaire (de la division des cellules) lié à une anomalie du cil.

Voici donc les 4 tests sélectionnés, mis au point et appliqués par la suite sur une sélection de 5 contrôles qui sont utilisés au laboratoire et qui nous serviront à calibrer nos expériences :

- La ciliogénèse
- La longueur du cil
- L'étude de la voie SHH
- La prolifération cellulaire

II. Mise au point de la « boite à outil ciliopathies »

But : faire la preuve du concept de la « boite à outils » et déterminer l'état de base d'un phénotype ciliaire normal dans les fibroblastes cutanés humaines.

Suite à la sélection des expériences de caractérisation du phénotype ciliaire et cellulaire, nous avons sélectionné 5 contrôles utilisés au laboratoire pour mettre au point tous les tests. J'ai commencé par caractériser des cellules contrôles (les individus dont sont dérivées les cellules ne présentent pas de symptômes cliniques typiques des ciliopathies) qui ne devraient à priori présenter aucune altération ciliaire. Le but est de voir si des cellules « wild type » présentent ou pas une variabilité phénotypique au niveau du cil et de pouvoir ainsi déterminer un standard de référence qui me permettra par la suite de mettre en évidence un phénotype anormal dans les cellules de patients.

A. Sélection des contrôles

Nous avons choisi les 5 contrôles de la liste des contrôles utilisés normalement au laboratoire. Il s'agit des apparentés de patients (père, mère, sœur) atteints du BBS, et de patients atteints du Syndrome de Cockayne (CSB) qui n'est pas une ciliopathie mais une maladie liée à des anomalies de réparation de l'ADN étudiée par un autre groupe de recherche au laboratoire. Nous avons décidé d'étudier les fibroblastes dérivés des parents de patients atteint et non de ciliopathies afin de déterminer si la présence d'un variant BBS à l'état hétérozygote peut affecter le phénotype ciliaire même si la personne ne présente pas les caractéristiques typiques du syndrome. Nous avons essayé de choisir les contrôles ayant le même sexe, la même tranche d'âge et les cellules ayant le plus bas passage disponible dans la bio-banque du laboratoire. Les contrôles ainsi que leurs caractéristiques sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Nom	Age	Sexe	Gène/pathologie	Statut familial	Nombre de passage
Ctrl1	39 ans	M	BBS7 het	Père	P6
Ctrl2	53 ans	F	CSB het	Mère	P14
Ctrl3	30 ans	F	CSB, non porteuse de la mutation	Sœur	P11
Ctrl4	37 ans	F		Mère	P9
Ctrl5	68 ans	F	*BBS8* het	Mère	P6

Tableau 3 : Liste des contrôles avec leurs caractéristiques. CSB : Cockayne syndrome group B

B. Ciliogénèse (nombre de cellules ciliées)

Pour induire la ciliogénèse (la formation du cil primaire), j'ai cultivé les fibroblastes cutanés dans un milieu DMEM déprivé en sérum (0,1% SVF +1% de PS), pendant 48H. Les sérums d'origine animale sont traditionnellement utilisés en compléments des milieux de culture, les cellules ne peuvent se diviser que sous l'influence de facteurs mitogènes apportés par ce dernier. Ainsi le fait de dépriver le milieu en sérum va empêcher les cellules de se diviser, elles vont entrer en phase de quiescence (G0) pendant laquelle elles vont générer les cils primaires. Suite au traitement les cellules sont fixées pour faire les IF, le cil primaire est marqué avec l'AC anti-ARL13B dirigé contre la membrane ciliaire et le corps basal est marqué avec l'AC anti-γ-Tubuline. J'ai obtenu les images en utilisant IncuCyte S3-Sartorius qui grâce à son système d'acquisition automatique permet de générer un grand nombre d'images en très peu de temps (génération de 16 images/ puits d'une plaque 24 puits en 30min) (Figure 23A).

Pour étudier la ciliogénèse, j'ai compté le nombre des cellules et des cils manuellement en utilisant le logiciel ImageJ (Figure 23), ensuite j'ai calculé le pourcentage de cellules ciliées en divisant le nombre de cellules ciliées par le nombre total de cellules (n = 400 cellules analysées par échantillon). Le protocole **est** détaillé dans la partie des matériels et méthodes du manuscrit. Le résultat ne montre aucune différence significative dans le nombre de cellules ciliées chez les 5 contrôles. Ils ont tous plus de ~70% de cellules ciliées. Ce pourcentage correspondra à notre ligne de référence au-dessous de laquelle une anomalie de la ciliogénèse pourra être évoqué (Figure 23C).

A. Longueur du cil

En utilisant les mêmes images générées par IncuCyte pour étudier la ciliogénèse, j'ai mesuré la longueur des cils manuellement en utilisant le logiciel d'IncuCyte (n = 400 cils sont mesurés) (Figure 24B). Une des limitations de cette technique est que tous les cils n'étaient pas dans le plan et certains étaient courbés, de ce fait pour empêcher les erreurs qui peuvent être dues à ce biais technique, je ne mesurais que la longueur des cils qui sont dans le plan dans toutes les analyses.

Une deuxième limitation est que le système IncuCyte ne possède que deux objectifs 10x et 20x, pour avoir une représentation des longueurs des cils plus résolutives j'ai réalisé des IF que j'ai analysé avec un microscope confocal à fluorescence inversé (objectif 63x). Les détails des protocoles figurent dans la partie des matériels et méthodes du manuscrit.

La longueur normale d'un cil primaire dans les fibroblastes cutanés humains est de 3-4µm (Barny et al., 2018; Halbritter et al., 2013; Hey et al., 2021; Slaats et al., 2016). Le résultat ne montre aucune différence significative dans la longueur du cil entre les 5 contrôles. Ce résultat vient confirmer ce qui est publié dans la littérature (Figure 24C).

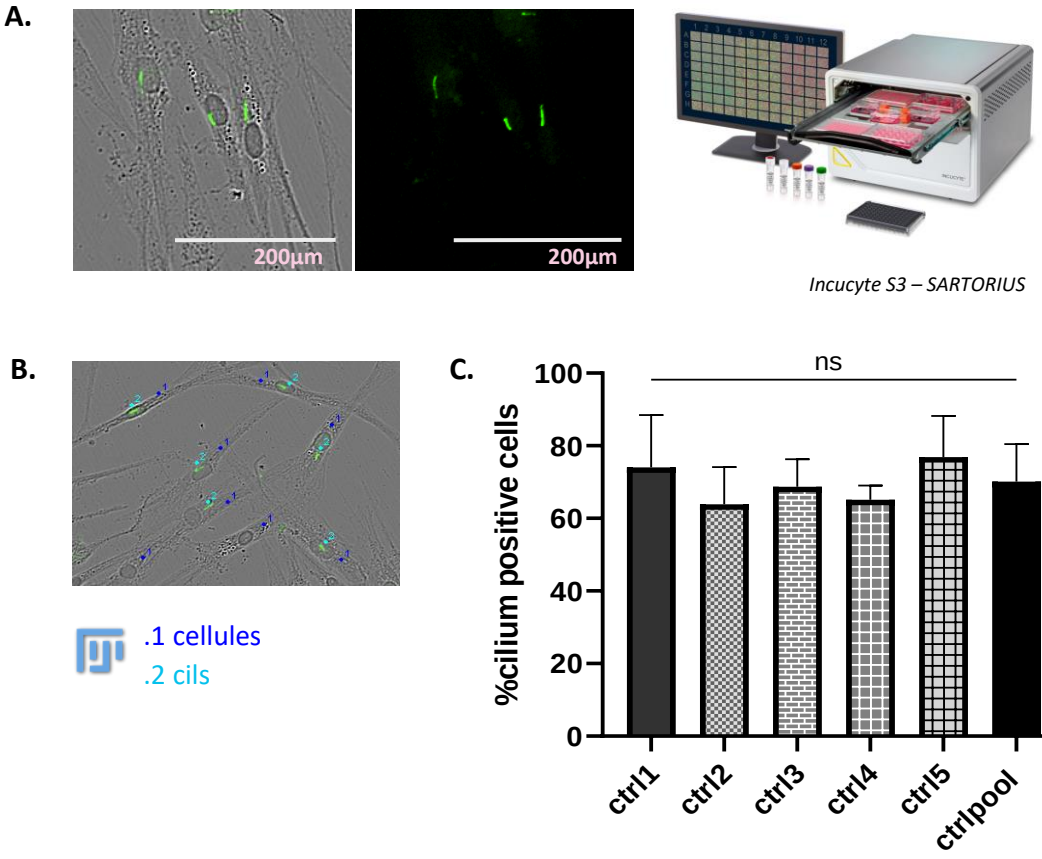


Figure 23 : Ciliogénèse des fibroblastes cutanés de contrôles. A. Images des cellules observées avec le mode phase et des cils observés avec le mode fluorescence prisent avec le système d'imagerie Incucyte S3 Sartorius (objectif 20×). Les cellules sont cultivées en conditions de ciliogénèse (déprivées en sérum (0,1%SVF) pendant 48H) et fixées par IF dans des plaques 24 puits. Le cil est marqué avec un l'anticorps anti-ARL13B (vert). **B.** Exemple d'analyse d'image : les cellules et les cils sont comptés avec le logiciel Fiji. **C.** Pourcentage de cellules ciliées chez les 5 contrôles. Le pourcentage de cellules ciliées est calculé en divisant le nombre de cellules pourvues d'un cil primaire par le nombre total de cellules (n = 400 cellules analysées pour chacun des contrôles). Les données sont collectées à partir de deux expériences distinctes réalisées sur des triplicats biologiques de chaque échantillon dans chaque expérience. Les graphes ainsi que les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel Graphpad Prism. Les valeurs *p* et la significativité sont déterminées en utilisant le test ANOVA ordinaire à sens unique, ns : non significatif.

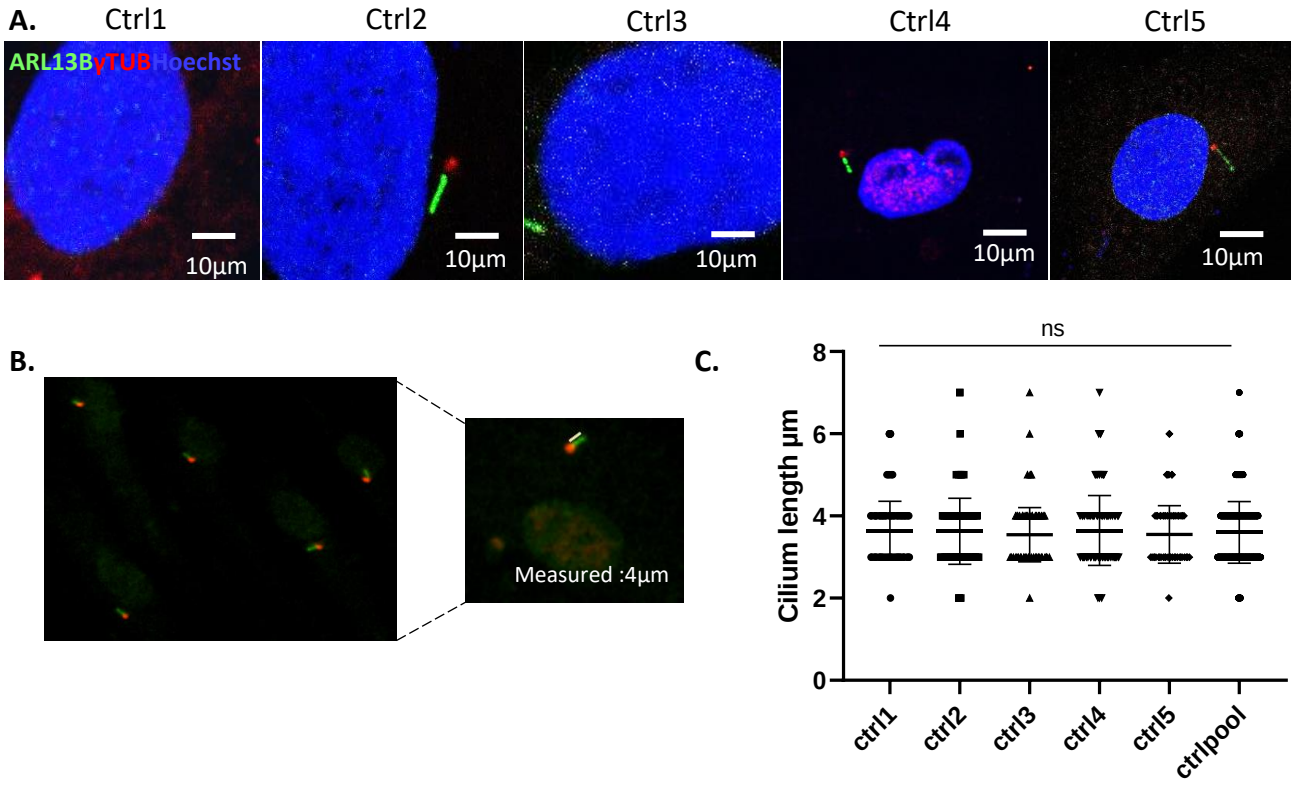


Figure 24 : Longueur du cil chez les contrôles. A. Images des cils dans les fibroblastes dérivés d'une biopsie de peau des contrôles. Les cils primaires sont marqués avec un anticorps anti-ARL13B (vert), le corps basal avec un anticorps anti-γ-Tubuline (rouge), et le noyau avec une coloration au Hoechst (bleu). Les images sont prises avec un microscope confocal à fluorescence inversé (Zeiss LSM 800, objectif l'huile d'immersion 63x). Echelle 10 µm. **B.** Images des cils avec le corps basal prise par Incucyte S3 Sartorius (objectif 20x). La longueur du cil est mesurée avec le logiciel Incucyte. **C.** Quantification de la longueur des cils primaires (n = 400 cellules analysées pour chacun des contrôles). Le nombre de cils mesurés (n) représente les données collectées à partir de deux expériences distinctes réalisées sur des triplicats biologiques de chaque échantillon dans chaque expérience. Les graphiques ainsi que les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel Graphpad Prism. Les valeurs *p* et la significativité sont déterminées à l'aide du test de Kruskal-Wallis ns : non significatif.

B. Etude de la voie SHH

Pour stimuler la voie SHH, les fibroblastes cutanés sont cultivés dans le milieu de culture supplémenté avec le SAG (Smo AGonist) à cf=100nM pendant 48H. Pour évaluer la transduction du signal SHH j'ai quantifié le niveau d'expression de deux gène cibles de la voie *PTCH1* et *GLI1* par RT-qPCR, que j'ai comparé dans 4 conditions différents avec et sans induction de la ciliogénèse (+/- SVF) et avec ou sans stimulation de la voie SHH (+/- SAG). Les données d'expression réalisées en triplicat sont normalisées par rapport au gène de référence la *GAPDH*.

Le résultat montre que l'expression des deux gènes cibles *PTCH1* et *GLI1* augmente significativement suite à la stimulation de la voie SHH avec le SAG en condition de ciliogénèse (-SVF) (

Figure 25). Cette augmentation est observée chez 4 contrôles parmi les 5, elle traduit une activation normale de la voie SHH suite à sa stimulation. La non activation de la voie chez le contrôle 2 peut être expliquée par le fait que ces cellules possèdent le plus haut passage (p14) parmi les autres, c'est un facteur qui pourra affecter la réponse cellulaire aux stimuli de la voie. C'est un exemple qui illustre la variabilité qui peut être présente même entre les cellules contrôles.

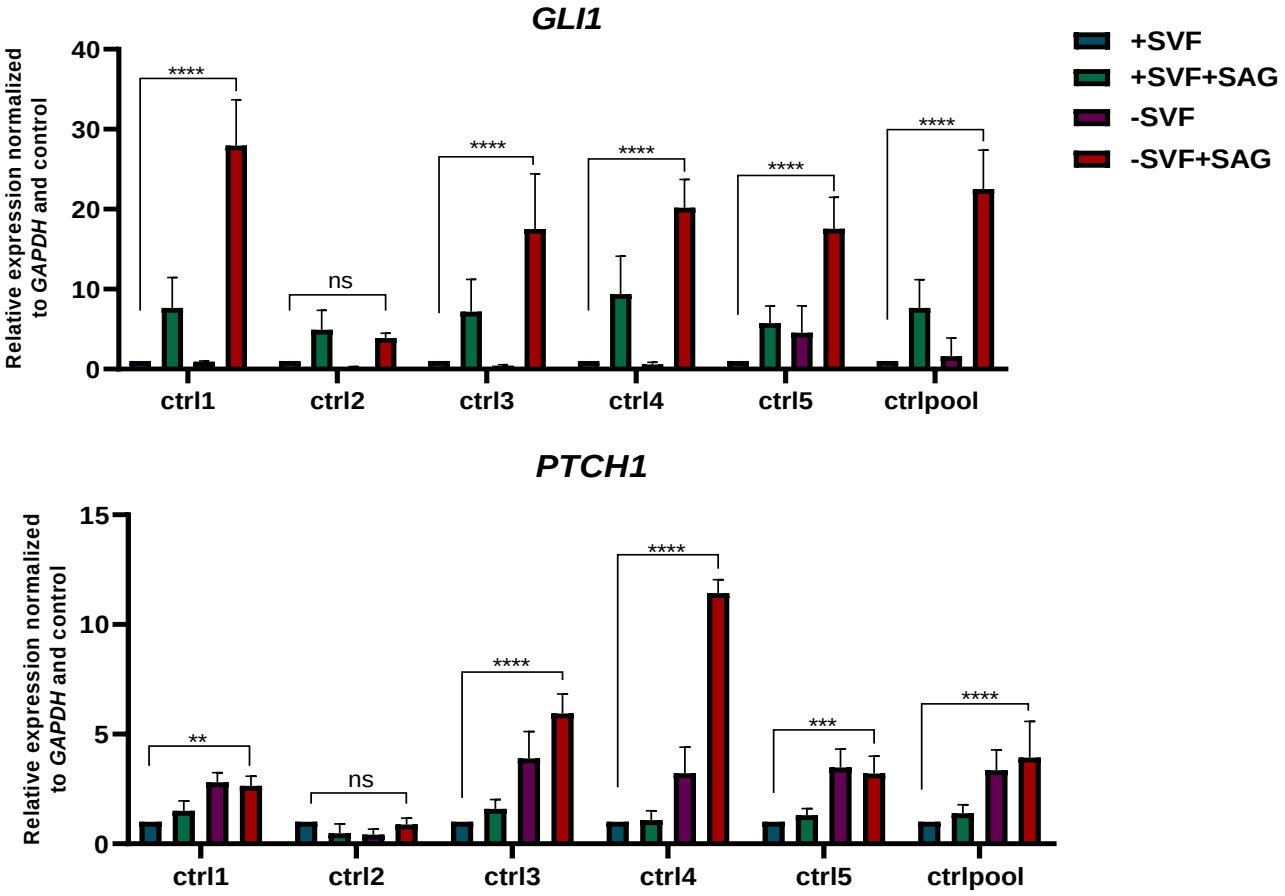


Figure 25 : Etude de la voie SHH dans les fibroblastes cutanés des contrôles. Évaluation de la transduction du signal SHH par quantification du niveau d'expression de deux gènes cibles de la voie, *PTCH1* et *GLI1*, dans les cellules provenant des contrôles cultivés dans quatre conditions différentes, avec et sans induction de la ciliogénèse (+/- SVF) et de l'activation de la voie SHH (+/- SAG). Les données d'expression réalisées avec des triplicats biologiques sont normalisées par rapport aux données d'expression de l'ARNm du gène de référence *GAPDH*, et les valeurs sont présentées comme des niveaux d'expression relative +- SEM). Les valeurs *p* et la significativité sont déterminées à l'aide d'un test ANOVA à deux voies (test de comparaison multiple de Tukey). ns : non significatif, ** p<0,01 **** p<0,000

C. Prolifération cellulaire

Le suivi au quotidien des cellules mises en cultures, nous a permis d'observer que les cellules de certains patients ne prolifèrent pas à la même vitesse que celles des contrôles. Nous avons donc émis l'hypothèse que la prolifération cellulaire pouvait être altérée chez des fibroblastes issus de biopsie de peau de patients malades en comparaison à des contrôles.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé un test de prolifération grâce à l'Incucyte qui nous permet de suivre de manière automatisée et sur une période définie la croissance de nos cellules. J'ai donc réalisé les premiers tests sur les fibroblastes cutanés des 5 contrôles afin de déterminer leur capacité proliférative sur une durée de 9 jours. Les détails de ce protocole figurent dans la partie des matériels et méthodes du manuscrit.

Le résultat du test de prolifération cellulaire réalisé sur 9 jours montre que la capacité proliférative des fibroblastes des contrôles est la même, ils prolifèrent tous à la même vitesse à l'exception du contrôle 2 qui a une capacité de prolifération un peu plus réduite par rapport aux autres (Figure 26). C'est le contrôle qui présent le nombre de passage le plus élevé parmi les autres, ceci peut expliquer le fait qu'il prolifère un peu plus lentement. Cette diminution de la vitesse de prolifération du contrôle 2 a été remarqué en culture cellulaire mais pas pour tous les aliquots décongelés. Le phénotype observé n'est donc pas très marqué permettant d'effectuer les expériences des contrôles en même temps.

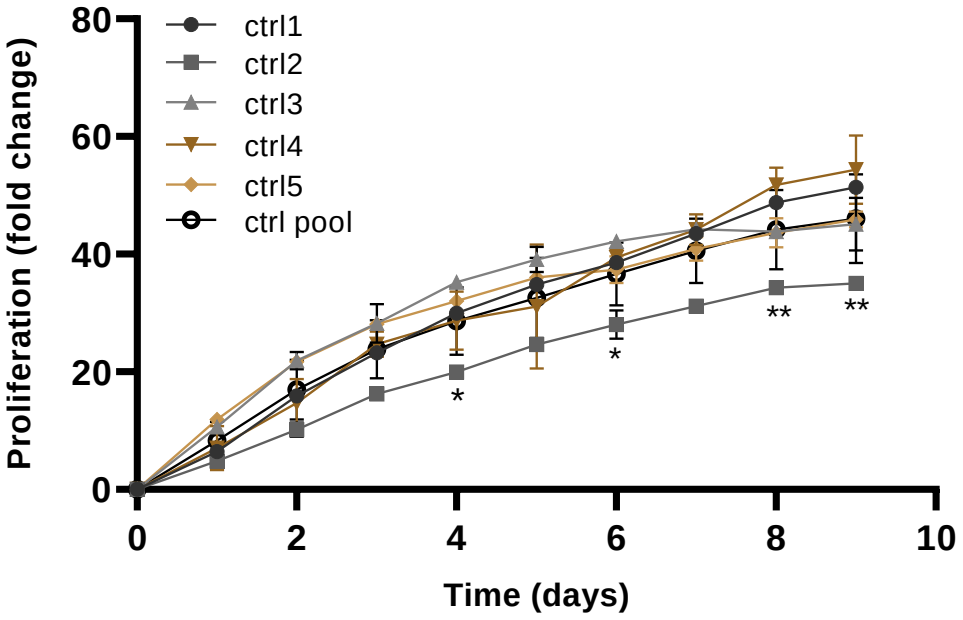


Figure 26 : Test de prolifération des fibroblastes cutanés des contrôles. Courbe de prolifération des fibroblastes cutanés provenant de contrôles sains. L'analyse est réalisée avec Incucyte S3 Sartorius (objectif 20×), permettant d'évaluer la prolifération des cellules dans des plaques à 24 puits au cours du temps (6 jours). Les valeurs sont rapportées comme la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes. Les valeurs *p* et la significativité sont déterminées en utilisant un test ANOVA à deux voies. Les statistiques représentées sur le graphe sont ceux des contrôles par rapport au contrôle pool. *p<0,1, **p<0,01.

III. Conclusion

Les résultats des 4 expériences du phénotypage cellulaire/ciliaire incluent dans la « boite à outils ciliopathie » montrent une grande homogénéité entre les 5 contrôles. L'application de ces tests sur la sélection des 5 contrôles nous a permis d'une part de valider la « boite à outils », sa mise au point et sa reproductibilité (avoir les mêmes résultats avec des réplicats technique et biologique). D'autre part, nous avons déterminé le phénotype ciliaire normal dans les fibroblastes cutanés humains, confirmer les résultats obtenus précédemment dans la littérature, permettant d'avoir ainsi une référence de base solide à laquelle nous pourrons nous rapporter pour comparer le phénotype ciliaire des fibroblastes dérivés des patients caractérisés par la suite.

III.

<u>Projet 2</u> : Validation fonctionnelle de variants candidats et étude comparative du phénotype ciliaire pour différents gènes BBS : application de la « boite à outils ciliopathies ».

Le projet portant sur *BBS5*

I. Introduction du gène *BBS5*

Le gène *BBS5* (NM_129880), situé sur le chromosome 2 (2q31.1) code pour une sous-unité périphérique du BBSome. Il contient 12 exons codant pour un transcrit de 3475 pb et une protéine de 341 AA (36kDa) (Al-Hamed et al., 2014) (Figure 27A et B). La protéine BBS5 (NP_689597.1, MIM# 615983) se compose de deux domaines d'homologie à la pleckstrine (PH1 et PH2), suivis d'un petit faisceau de 3 hélices alpha C-terminales : une structure unique (BBS5PH1, BBS5PH2 et BBS5CtH), jamais retrouvée dans d'autre protéine du BBSome. Deux groupes d'auteurs ont montré, en 1993, que des motifs analogues à ceux de la pleckstrine (segments homologues d'environ 100 acides aminés chacun, dénommés domaines homologues de la pleckstrine (PH)) étaient présents dans un nombre important de protéines, n'ayant apparemment aucun lien fonctionnel commun (Haslam et al., 1993; Mayer et al., 1993). L'extension de ces recherches a conduit à retrouver des domaines PH dans plus de 90 protéines (Hyvönen et al., 1995) dont BBS5 et la liste n'est probablement pas close. Dans chaque domaine PH, un domaine DM16 a été identifié. Sa fonction reste inconnue malgré la conservation de sa séquence au cours de l'évolution (prise en compte de dix espèces allant du Trypanosome à l'Homme) ce qui montre à priori son importance (Li et al., 2004).

BBS5 fait partie de la base large du BBSome avec BBS8, BBS9 et la région C-terminale de BBS1 (Chou et al., 2019) (Figure 27C). En effet, il a été montré que les domaines PH du BBS5 ainsi que sa partie C-terminale interagissent avec BBS9. L'un des domaines PH interagit également avec BBS8 et avec une boucle non structurée de BBS9 (Klink et al., 2020). Par rapport aux autres sous-unités, BBS5 (tout comme BBS4) n'est pas une sous unité indispensable à l'assemblage du BBSome (Zhang et al., 2012). En effet, il est arrivé que BBS5 manque parmi les protéines BBS composant certains sous-ensembles du complexes BBSome purifiés nativement (Chou et al., 2019). BBS5PH1 est un domaine du BBSome qui se lie au phosphatidylinositol-phosphate (PIP) (Nachury et al., 2007) et qui concentre cinq mutations sur une plage de 35 AA englobant le site de liaison à cette dernière (Chou et al., 2019). Mais l'étude de Klink *et al* en 2020 révèle que BBS5 n'est pas exclusivement responsable de la liaison du BBSome au phosphoinositides, d'autres sites de liaison existent au niveau de BBS4, 8, 9 ou 18 (Klink et al., 2020).

BBS5 est un contributeur mineur au BBS puisque seulement entre 0,4 et 2% des familles de diverses origines ethniques présentent des mutations de ce gène (Imani et al., 2019).

Jusqu'à présent ~34 variants pathogènes de différents types ont été identifié dans le gène *BBS5* comme cause du BBS. Ces variants incluent des mutations du site d'épissage, des faux sens, des non-sens, une perte du codon initiateur, des indels conduisant à un décalage du cadre de lecture, des anomalies du nombre de copies (délétions de plusieurs exons) et des insertions.

Quant aux phénotypes des patients *BBS5,* aucune corrélation génotype-phénotype du gène n'a pu être mise en évidence jusqu'à présent. En effet, l'analyse des données cliniques des cas *BBS5* précédemment rapportés (n = 65 pour 45 familles) met en évidence une grande variabilité dans la sévérité des patients. Parmi les 39 cas présentant des informations cliniques, l'obésité était le signe clinique le plus important (n = 29 cas), suivie par la dystrophie

rétinienne (n = 23), la polydactylie (n = 19), les troubles cognitifs (n = 18), l'hypogonadisme (n = 17) et les anomalies rénales (n = 11). L'étude de la combinaison des principales manifestations cliniques montre que neuf patients avaient un signe majeur, cinq en avaient deux, neuf en avaient trois, huit en avaient quatre, cinq en avaient cinq et trois en avaient six, ce qui met en évidence la variabilité des manifestations cliniques des cas de *BBS5* (Karam et al., 2023).

Il existe un modèle murin knock-out (KO) de *Bbs5*$^{-/-}$ qui a été généré par l'IMPC « International Mouse Phenotyping Consortium ». Les souris *Bbs5*$^{-/-}$ présentent des anomalies des membres (tibia plus court), une obésité, une anomalie rétinienne et des problèmes métaboliques (métabolisme du glucidique) : un phénotype récapitulant plusieurs traits cliniques typiques des patients BBS (Bentley-Ford et al., 2021; Meehan et al., 2017). Il existe aussi un modèle de poisson zèbre *Bb5* morpholinos qui présente des anomalies rétienne, cardiaque et rénal et qui présentent une courbure de l'embryon par rapport au modèle sauvage ou wild type (WT) (Al-Hamed et al., 2014). Ainsi, les deux modèles *BB5 in vivo* présentent la plupart des signes cliniques rapporté dans le BBS.

Des études menées sur des fibroblastes de peau de patients *BBS5* ont permis d'associer le dysfonctionnement de la protéine BBS5 à des défauts de ciliogénèse, de longueur du cil (moins de cellules ciliées et des cils plus longs) et à la dérégulation de la transduction de la voie de la voie SHH (une voie moins active) (Hey et al., 2021; Karam et al., 2023). L'altération de l'activité de signalisation SHH due aux variants ou à la déplétion de *BBS5* montre l'importance de la fonction de BBS5 et son implication dans le trafic des récepteurs importants pour la voie de signalisation SHH canonique. Il n'est pas certain que les différentes protéines du BBSome est également un rôle crucial dans la signalisation SHH ce qui suggère que chacune des protéines du BBSome a sa propre fonction, d'où l'importance d'étudier la fonction de chacune d'entre elles.

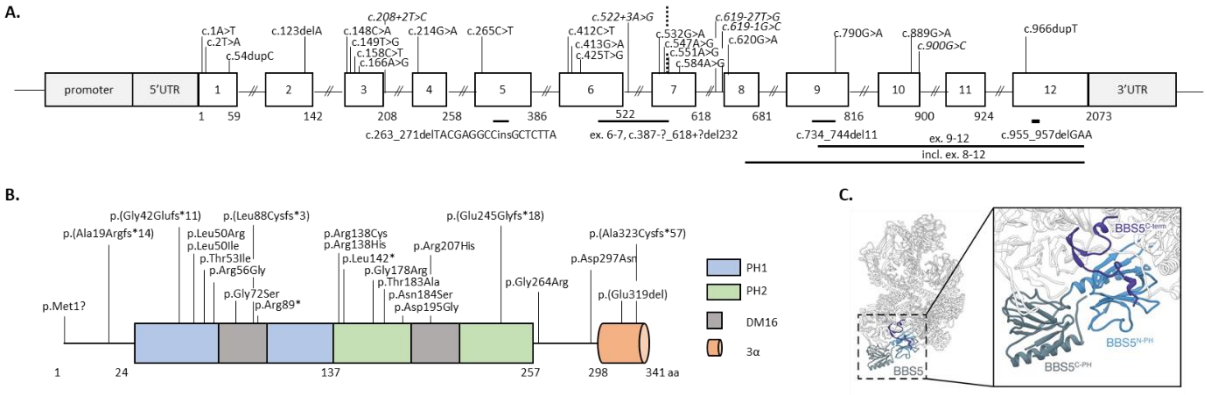


Figure 27 : BBS5. A. Représentation de l'ADNc de *BBS5* avec la position de tous les variants identifiés jusqu'à présent. **B.** Représentation de la protéine BBS5 avec les domaines PH (domaines d'homologie à la pleckstrine) le domaine DM16 et la localisation des variants. **C.** Position de BBS5 à la base du BBsome. (Singh et al., 2020).

II. Synopsis

En 2019, le laboratoire a identifié deux nouveaux variants dans le gène *BBS5* chez une patiente atteinte d'un possible syndrome de Bardet-Biedl. L'analyse fonctionnelle ayant pour objectif d'apporter la preuve de pathogénicité des deux variants a fait l'objet de mon stage de M2 et de ma thèse. La patiente (II.1), enfant d'une famille européenne non consanguine, présente les manifestations cliniques typiques du BBS, c'est-à-dire une rétinopathie pigmentaire, une obésité, une polydactylie, une insuffisance rénale, une agénésie rénale, une insuffisance intellectuelle et également une atrophie de l'utérus. La recherche des variants ainsi que toutes les expériences ont été réalisés uniquement à partir du seul matériel biologique de la patiente (prélèvements des parents non disponibles) en utilisant ces fibroblastes cutanés issue de biopsie de peau et maintenus en culture au laboratoire et de l'ADN extrait des cellules sanguines. Pour ce cas, seul l'ADN de la patiente a été analysé.

La recherche de mutation a été réalisée à la fois aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) dans le laboratoire de diagnostic génétique et dans le laboratoire de recherche UMR_S 1112 (laboratoire de génétique médicale). La recherche a débuté avec un séquençage ciblé (Sanger) des mutations récurrentes du BBS (*BBS1*, *BBS10*) qui s'est révélé négatif. Puis un panel de gènes (TES) par séquençage haut débit incluant 58 gènes (BBS et diagnostics différentiels) a été réalisé aux HUS. Une duplication du triplet AAT (c.550_552dupAAT), à l'état hétérozygote, a été observé par panel dans le gène *BBS5*. Ce variant est de signification inconnue (VUS ou VSI, classe 3) et aucune autre variation hétérozygote au sein du même gène n'avait été mise en évidence : il avait été alors impossible de conclure. Ainsi, un séquençage de l'exome complet (WES) a ensuite été mis en œuvre au sein du laboratoire de recherche (UMR_S1112). Seule la même duplication à l'état hétérozygote du triplet AAT (c.550_552dupAAT) dans l'exon 6 de *BBS5* conduisant à la duplication de l'asparagine 184 (p.Asn184dup) a été identifiée à nouveau. Néanmoins, en raison de la faible probabilité que cet allèle soit pathogène et en l'absence de second variant dans le même gène, un séquençage du génome complet (WGS) a été réalisé. Le génome a permis de mettre en évidence une large délétion de 5920 pb englobant les exons 1 et 2 de *BBS5* (chr2: g.170333792_170339709del). Puisque la délétion englobe également le promoteur, aucune expression de l'allèle en question n'est attendue. Les deux variations n'ayant jamais été rapportées auparavant et au vu de leur pathogénicité incertaine un travail de confirmation a été entrepris. L'analyse génomique ayant déjà été réalisée auparavant, j'ai déterminé le statut biallélique des variants, la co-ségrégation familiale et la pathogénicité des variants permettant ainsi de reclasser les variants de signification incertaine (classe 3) en variants pathogène (classe 4). Une fois le premier objectif atteint à savoir déterminer les variant responsables du BBS dans cette famille, mon deuxième objectif était de caractériser le phénotype ciliaire pour cette patiente. Pour ce faire, j'ai appliqué les tests cellulaires de la boite à outils ciliopathies (cf projet 1), aux fibroblastes de peau dérivés de la patiente, et démontré une baisse du nombre de cellules ciliées, une augmentation de la taille des cils et une voie SHH moins active. C'était le premier cas index sur lequel j'ai appliqué les tests ciliaires que j'ai pu comparer avec les résultats des cinq contrôles caractérisés au préalable afin de pouvoir

identifier les anomalies ciliaires. Ce travail a été publié en 2023 dans la revue International Journal of Molecular Sciences.

Ce cas constitue un projet pilote sur lequel j'ai appliqué pour la première fois les tests ciliaires à des fibroblastes dérivés de patients. J'ai réalisé les mises au point de plusieurs expériences qui complètent et consolident la boite à outils et qui n'ont pas encore été publié. Ces expériences non publiées ainsi que l'article sont présentées par la suite.

III. Article

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

WGS Revealed Novel *BBS5* Pathogenic Variants, Missed by WES, Causing Ciliary Structure and Function Defects

Adella Karam [1,†], Clarisse Delvallée [1,†], Alejandro Estrada-Cuzcano [1], Véronique Geoffroy [1], Jean-Baptiste Lamouche [1], Anne-Sophie Leuvrey [2], Elsa Nourisson [2], Julien Tarabeux [2], Corinne Stoetzel [1], Sophie Scheidecker [1,2], Louise Frances Porter [1,3], Emmanuelle Génin [4], Richard Redon [5], Florian Sandron [6], Anne Boland [6], Jean-François Deleuze [6], Nicolas Le May [1], Hélène Dollfus [1,3,7] and Jean Muller [1,2,8,*]

1 Laboratoire de Génétique Médicale, UMR_S INSERM U1112, Institut de Génétique Médicale d'Alsace (IGMA), Faculté de Médecine FMTS, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; adella.karam@unistra.fr (A.K.)
2 Laboratoires de Diagnostic Génétique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; elsa.nourisson@chru-strasbourg.fr (E.N.)
3 Centre de Référence Pour les Affections Rares en Génétique Ophtalmologique (CARGO), Institut de Génétique Médicale d'Alsace (IGMA), Filière SENSGENE, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France
4 Inserm, Université de Brest, EFS, UMR 1078, GGB, F-29200 Brest, France
5 CHU Nantes, CNRS, INSERM, L'institut du Thorax, Nantes Université, 44000 Nantes, France
6 CEA, Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France
7 Service de Génétique Médicale, Institut de Génétique Médicale d'Alsace (IGMA), Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France
8 Unité Fonctionnelle de Bioinformatique Médicale Appliquée au Diagnostic (UF7363), Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France
* Correspondence: jeanmuller@unistra.fr
† These authors contributed equally to this work.

check for updates

Citation: Karam, A.; Delvallée, C.; Estrada-Cuzcano, A.; Geoffroy, V.; Lamouche, J.-B.; Leuvrey, A.-S.; Nourisson, E.; Tarabeux, J.; Stoetzel, C.; Scheidecker, S.; et al. WGS Revealed Novel *BBS5* Pathogenic Variants, Missed by WES, Causing Ciliary Structure and Function Defects. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8729. https://doi.org/10.3390/ijms24108729

Academic Editors: Luigi Donato and Simona Alibrandi

Received: 31 March 2023
Revised: 18 April 2023
Accepted: 24 April 2023
Published: 13 May 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract: Bardet–Biedl syndrome (BBS) is an autosomal recessive ciliopathy that affects multiple organs, leading to retinitis pigmentosa, polydactyly, obesity, renal anomalies, cognitive impairment, and hypogonadism. Until now, biallelic pathogenic variants have been identified in at least 24 genes delineating the genetic heterogeneity of BBS. Among those, *BBS5* is a minor contributor to the mutation load and is one of the eight subunits forming the BBSome, a protein complex implied in protein trafficking within the cilia. This study reports on a European *BBS5* patient with a severe BBS phenotype. Genetic analysis was performed using multiple next-generation sequencing (NGS) tests (targeted exome, TES and whole exome, WES), and biallelic pathogenic variants could only be identified using whole-genome sequencing (WGS), including a previously missed large deletion of the first exons. Despite the absence of family samples, the biallelic status of the variants was confirmed. The BBS5 protein's impact was confirmed on the patient's cells (presence/absence and size of the cilium) and ciliary function (Sonic Hedgehog pathway). This study highlights the importance of WGS and the challenge of reliable structural variant detection in patients' genetic explorations as well as functional tests to assess a variant's pathogenicity.

Keywords: *BBS5* gene; Bardet–Biedl syndrome; whole-genome sequencing; structural variation; primary cilium

1. Introduction

Bardet–Biedl syndrome (BBS; MIM# 209900) is a rare autosomal recessive ciliopathy affecting 1/160,000 live births in Northern European populations [1] or at a higher rate in highly consanguineous populations [2,3]. The primary clinical features are retinitis pigmentosa (RP), polydactyly, renal anomalies, obesity, cognitive impairment, and hypogonadism with high levels of phenotypic heterogeneity. To date, 24 genes and a few candidates

have been identified as responsible for BBS, contributing to high levels of heterogeneity in this disorder [4]. BBS is a part of a group of ciliopathies caused by a dysfunction of the primary cilia. Primary cilia are microtubule-based membrane organelles that protrude apically from the surface of nearly all quiescence mammalian cell types [5,6]. Primary cilia are considered as separate organelles as their membrane is enriched in a unique set of proteins and signaling components [7]. They function as sensory organelles that coordinate a variety of signaling transduction pathways that regulate diverse cellular processes (cell polarity, differentiation, migration, and proliferation) during embryonic development and that maintain tissue homeostasis, such as Hedgehog (Hh), transforming growth factor Beta (TGF-β), and WNT signaling [8]. The vast range of symptoms caused by the defect of the cilium underscores the broad physiological importance of cilium-based signaling.

In vertebrates, Hh signaling is one of the most studied pathways connected and strictly dependent on an intact primary cilium. The Hh pathway is activated when the glycoprotein Sonic Hedgehog (SHH) binds to its receptor PTCH1 (Patched 1), a 12-transmembrane protein. This inactivates PTCH1 and releases SMO (Smoothened), a 7-transmembrane GPCR-like (G protein-coupled receptor) protein [9]. SMO translocates and accumulates into the cilia membrane, leading to the release of GLI proteins from their negative regulator SUFU (SUppressor of FUsed). Activation of the GLI family proteins initiates the Hh downstream signaling cascade [10]. Indeed, the three members of this zinc-finger transcription factors family (GLI1, GLI2, and GLI3) share partially redundant domains and different functions. GLI1 acts as a full-length transcriptional activator, while GLI2 and GLI3 may be subject to post-transcriptional and post-translational processing that will determine their function as either positive or negative regulators. Studies have demonstrated that GLI2 acts mainly as an activator, while GLI3 as a repressor of transcriptional behavior. In response to SHH ligand binding, activated SMO will prevent the proteolytic cleavage of GLI, the full-length activated GLI proteins (predominantly GLI2A) translocate to the nucleus, turn on transcription of target genes, including *Ptch1* and *Gli1* [5], and guarantee proper primary cilium functioning.

Primary cilium assembly, resorption, and function as a sensory organelle requires the cooperation of several macromolecular machines, one of which is the BBSome. The BBSome is an octameric protein complex consisting of BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8 (TTC8), BBS9 (PTHB1), and BBS18 (BBIP1) [11,12]. It is recruited to the ciliary base and is mainly involved in ciliary protein trafficking by delivering protein cargoes transported by IFT trains and in the exit of activated GPCRs and peripheral membrane proteins from the cilium [13]. As the BBSome is involved in the exit of GPCRs from the primary cilium such as PTCH1, SMO, and others, studies suggest that this complex may have an impact on the regulation of the Hh signaling pathway [14]. Among those, BBS5 (NP_689597.1, MIM# 615983) is a 341 amino-acid peripheral sub-unit of the BBSome encoded by 12 exons (NM_129880). Since its discovery in 2004 [15], *BBS5* has been only a minor contributor to BBS, with only 2% of families from various ethnic backgrounds [16]. Comprehensive bioinformatics analysis on BBS5 revealed two novel domains in the BBS5 protein similar to the pleckstrin homology (PH) domains never found in any other BBS protein. These domains can bind to phosphoinositides and allow BBS5 to interact directly with the membrane [11]. This makes it a unique protein both structurally and functionally among BBSome components. Despite these predictions, the functional role of BBS5 and its importance in the BBSome remains poorly understood.

Given that pathogenic variants in BBS genes are known to cause ciliogenesis and Hh signaling anomalies [17], it was interesting to study BBS5 function and the impact of its variants on the structure and function of the primary cilium. This study reports on the genetic analyses undergone by a patient with a severe BBS phenotype. Interestingly, the pathogenic variants could only be revealed by WGS. Specific functional tests revealed the pathogenicity of the variants and shed light on the BBS5 cellular phenotype. Furthermore, the short list of *BBS5* pathogenic alleles was expanded with a novel structural variant and an amino acid duplication.

2. Results

2.1. Index Patient Case History

Individual AII.2 (the second child in a family of three children) born to non-consanguineous healthy parents with healthy siblings. At birth, a weight of 4.1 kg, height of 51.5 cm, and lower limb polydactyly were noted. Early onset visual impairment caused by pigmentary retinopathy was stated early in childhood with associated obesity, mild intellectual disability (ID), atrophy of the uterus, *situs inversus*, renal agenesis and insufficiency. A clinical diagnosis of Bardet–Biedl syndrome was made. End-stage renal failure, hypertension, and subsequent dialysis was instituted at the age of 40. On clinical examination, weight was 113 kg, having peaked at 240 kg in her late twenties. Visual acuity was reduced to perception of light in both eyes with posterior subcapsular cataract and advanced retinal degeneration. Parents and siblings are not available for biological sampling, so only the DNA of the patient was analyzed with the proband's fibroblasts.

2.2. Identification and Characterization of Biallelic Variants in BBS5

The patient was referred for in-depth genetic investigations as she remained unsolved following routine genetic diagnostic testing (recurrent *BBS1* and *BBS10* pathogenic variants screening, TES, and WES) [18,19]. This led ultimately to solo whole-genome sequencing since no other family member was available. Out of 4,851,744 SNVs and indels and several thousand structural variants, two interesting variations could be identified in the *BBS5* gene.

The first variation corresponds to a large heterozygous deletion of 5918 bp (chr2:g.170,333,792_170,339,709del) encompassing the first two exons of *BBS5* (NM_152384.2:c.1-2272_142+879del) (Figure 1A). The variation was confirmed using a specific duplex PCR and breakpoints sequencing performed on genomic DNA (Figure 1B and Supplementary Figure S1A,B). Interestingly, this large deletion was missed by other NGS assays encompassing the *BBS5* gene, and only WGS identified the deletion (Supplementary Figure S2). To better understand this, eight copy number callers were applied on the WES and/or WGS (Supplementary Methods and Table S5). The callers systematically failed to detect the deletion on the WES unless the number of control samples for CANOES was raised (Supplementary Table S5). Using the WGS as input data, the detection was much better, with five out of seven programs able to detect the deletion. Investigation of the *BBS5* genomic loci revealed higher GC content in the first exons that prevented its detection using enriched NGS libraries (TES, WES) compared to the more homogeneous depth of coverage observed in WGS data (Supplementary Figure S3). As the deletion encompassed the promoter, no expression of the allele harboring this variant was expected. To confirm this hypothesis, the RNA expression of *BBS5* extracted from the patient's skin fibroblasts was evaluated by RTqPCR (Figure 1B). The results showed significantly reduced *BBS5* expression in the patient compared with that in controls, suggesting that only a single allele was expressed. This variant is absent from control populations and is classified as pathogenic (class 5).

The second variation was a heterozygous duplication of one AAT triplet (NM_152384.2:c.550_552dup, p.(Asn184dup)) in exon 7 of *BBS5*. This variant is absent from control populations and is classified a priori as a variant of uncertain significance (class 3) without further investigation. In order to determine the biallelic status of the variants and given the likely non-expressed allele carrier of the deletion of exons 1 and 2, examine the patient's RNA. It was hypothesized that if both variants were *in trans*, one should observe the AAT duplication at the homozygous state on the Sanger sequence (only the allele carrying the AAT duplication is expressed), or if both variants were *in cis*, one should not be able to detect the duplication at all (the only allele expressed is the one carrying no variant). Sanger sequencing of the patient's RNA revealed the duplication at the homozygous state, confirming the biallelic status of both variations (Figure 1C) and the fact that the allele harboring the deletion of exons 1 and 2 was not expressed. Localized in the PH2 domain (Figure 2A,B), the asparagine at position 184 is highly conserved across eukaryotes (Figure 2C). Bioinformatics predictions considered this amino acid (AA) duplication deleterious (Supplementary Table

S6). Interestingly, this position has already been involved (p.Asn184Ser) in a patient with BBS (Supplementary Table S7). In order to see whether the Asn184 duplication might affect the secondary structure of the BBS5 protein, PSIPRED [20] was applied to the wildtype and mutated sequence of BBS5 but could not find any significant difference (Supplementary Figure S4). Localization of the AA 184 in the BBSome 3D structure revealed a buried position within the PH2 domain (Figure 2C). However, this position is localized in a loop between two beta sheets. A Western blot was performed on the patient's skin-derived fibroblast lysate and three controls using an anti-BBS5 antibody to determine the impact of the duplication at the protein level. The Western blot revealed undetectable levels of BBS5 in the patient's fibroblasts (Figure 1D), suggesting that the duplication was likely destabilizing the BBS5 protein. This result modified the variant classification from class 3 to class 5 (pathogenic).

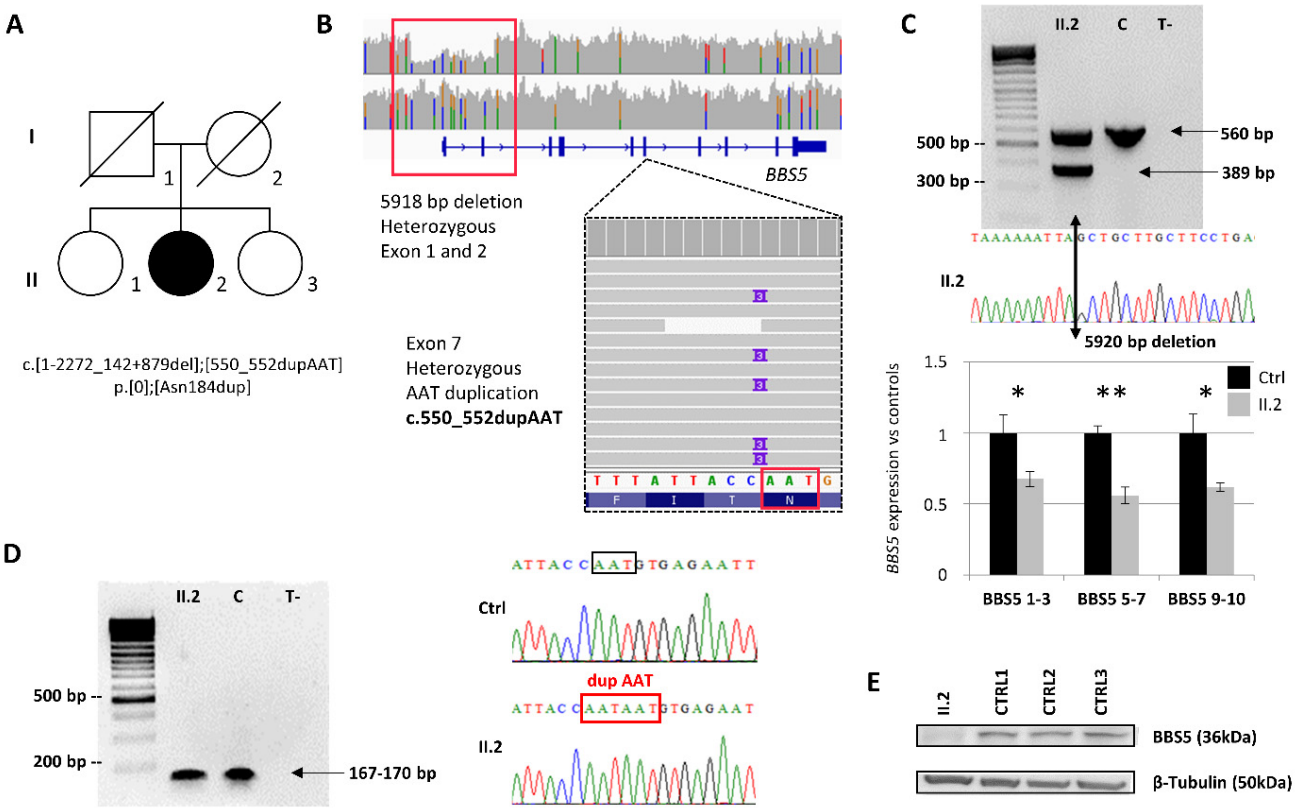


Figure 1. Identification of two variants in *BBS5* for a family explored by WGS. (**A**) Pedigree of the family including one affected daughter (II.2). (**B**) IGV visualization of the two identified pathogenic variants; a large heterozygous deletion overlapping exons 1 and 2 (upper panel) and the heterozygous AAT duplication in exon 7 (lower panel). (**C**) Large deletion analysis and confirmation including Sanger sequencing of the breakpoint and a duplex PCR (genomic DNA). Quantitative real-time PCR was performed on RNA extracted from fibroblasts of the patient and a healthy unrelated control, using three pairs of primers amplifying between exons 1–3, exons 5–7, and exons 9–10. *BBS5* expression data were performed in triplicate. The normalized fold expression of the target genes was calculated using the comparative cycle threshold (C_t) method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) by normalizing target mRNA C_t to those of two reference genes (*GAPDH* and *HPRT*). Data are presented as relative expressions ± SEM (ANOVA, *: $p < 0.1$, ** $p < 0.01$). (**D**) AAT duplication confirmation and segregation analysis. PCR and Sanger sequencing were performed on cDNA to confirm the duplication and to assess the biallelic status of the variants. The AAT duplication appeared homozygous on the sole expressed allele. (**E**) BBS5 protein expression in skin-derived fibroblasts was revealed by Western blot using an anti-BBS5 antibody.

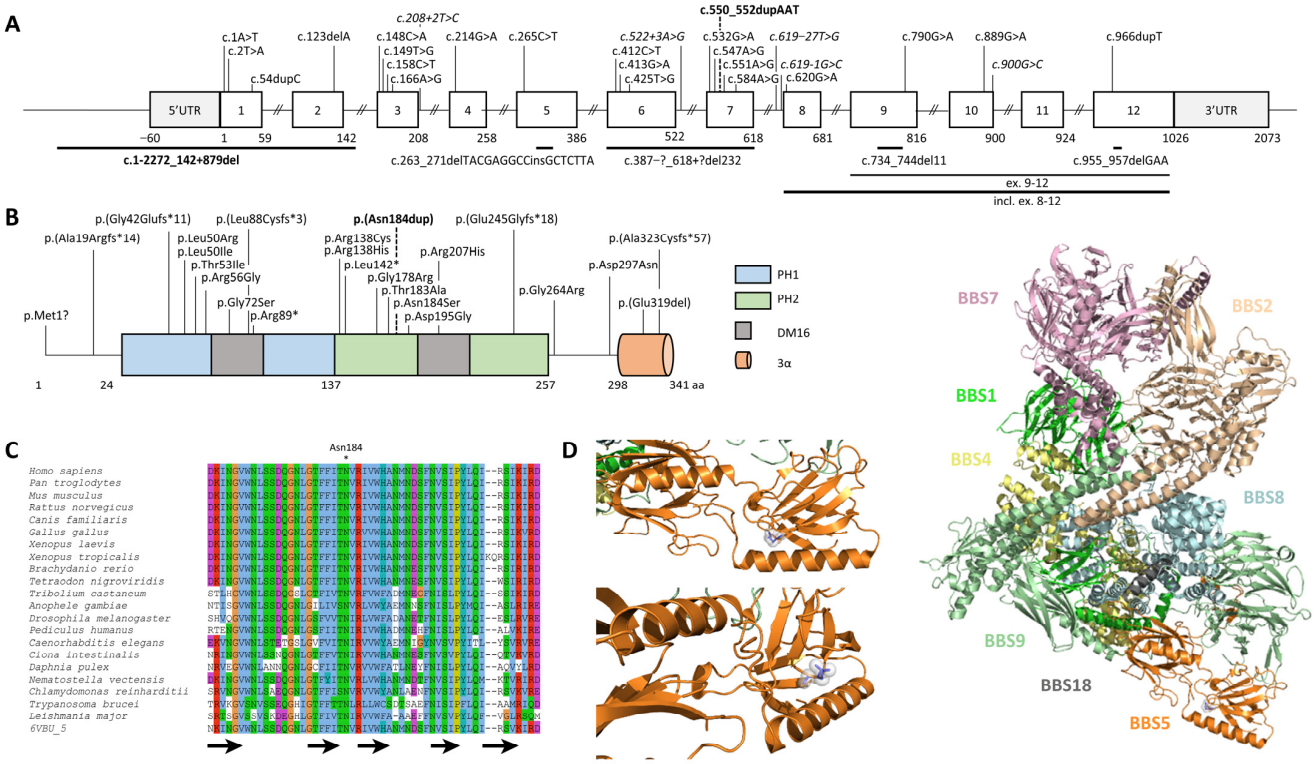


Figure 2. *BBS5* gene and protein structure. (**A**) Schematic view of the *BBS5* gene and (**B**) protein together with known pathogenic variations. The two variations from family AII.2 are indicated in bold, and variations with an effect on splicing are in italic. Large deletions are displayed as horizontal lines. (**C**) Multiple sequence alignments of BBS5 proteins from different metazoan species showing high conservation of the amino acid at position 184. Asn184 position is highlighted by a "*". Black arrows indicate β-sheets. (**D**) Structure of BBSome complex indicating the positioning of BBS5 regarding the other subunits (right part). BBSome subunits have been colored according to the corresponding scheme: BBS1 (pale blue), BBS2 (wheat), BBS4 (pale yellow), BBS7 (light pink), BBS8 (alecyan), BBS9 (pale green), BBS18 (gray), and BBS5 is shown in orange (PDB: 6VBU). Specific focus on the AA at position 184 (shown in blue sticks/spheres tone) localizing the AA in a loop within the second PH domain (left part).

2.3. BBS5 Exons 1 and 2 Deletion Screening in a Large Cohort

Owing to the difficulty of detecting exons' 1 and 2 deletion by standard techniques, it was hypothesized that other unsolved patients with a suspected phenotype related to *BBS5* in our cohort may also carry this deletion. Therefore, duplex PCR was carried out (Supplementary Figure S1C) on 440 inconclusive samples from the cohort including 284 BBS patients and 156 patients with non-syndromic RP. No other patients carrying the deletion could be identified.

In order to determine the frequency of this deletion in the general population, bioinformatics screening was also performed in 863 genomes from a French cohort of healthy individuals (FranceGenRef consortium dataset) for whom visual inspections of the bam files (IGV batch scripting) did not reveal any corresponding alleles. These data are consistent with the screening of the 2504 controls from 1000 Genomes and from the gnomAD SV 2.1 dataset comprising 14,891 controls from various origins. Thus, the found deletion and duplication are two novel extremely rare variants that will be added to the list of 32 pathogenic alleles found so far in *BBS5* (Supplementary Table S7).

2.4. Non-functional BBS5 Affects Primary Ciliogenesis and Ciliary Length

To analyze primary cilia assembly in cells of the patient harboring bi-allelic *BBS5* variants, ciliogenesis was induced by using serum-starvation-mediated cell-cycle arrest

in confluent fibroblasts from the patient and controls and visualized primary cilium by immunostaining with antibodies raised against ARL13B and acetylated γ tubulin for the basal body. To determine the normal state of ciliogenesis, five anonymous control samples were investigated. No significant differences were observed between them, and all had more than 60% of their cells ciliated. The controls were thus pooled for comparison with the BBS patient's fibroblasts. Immunofluorescence analysis in the patients' skin-derived fibroblasts revealed that these cells had cilia anomalies. Indeed, when grown in ciliary conditions (0.1% FCS), the patient's cells developed significantly fewer primary cilia compared to controls (51% vs. 77%) (Figure 3C). Moreover, a significant difference in cilia length could be observed. The patient's cells harbored cilia significantly longer than those of controls (6–8 µm vs. 3–4 µm) (Figure 3D). *BBS5* variants identified in our patient led to a significant decrease of cilium formation and a longer cilia length. These results indicate that a functional BBS5 protein is important for normal ciliogenesis and cilium length in fibroblast cells.

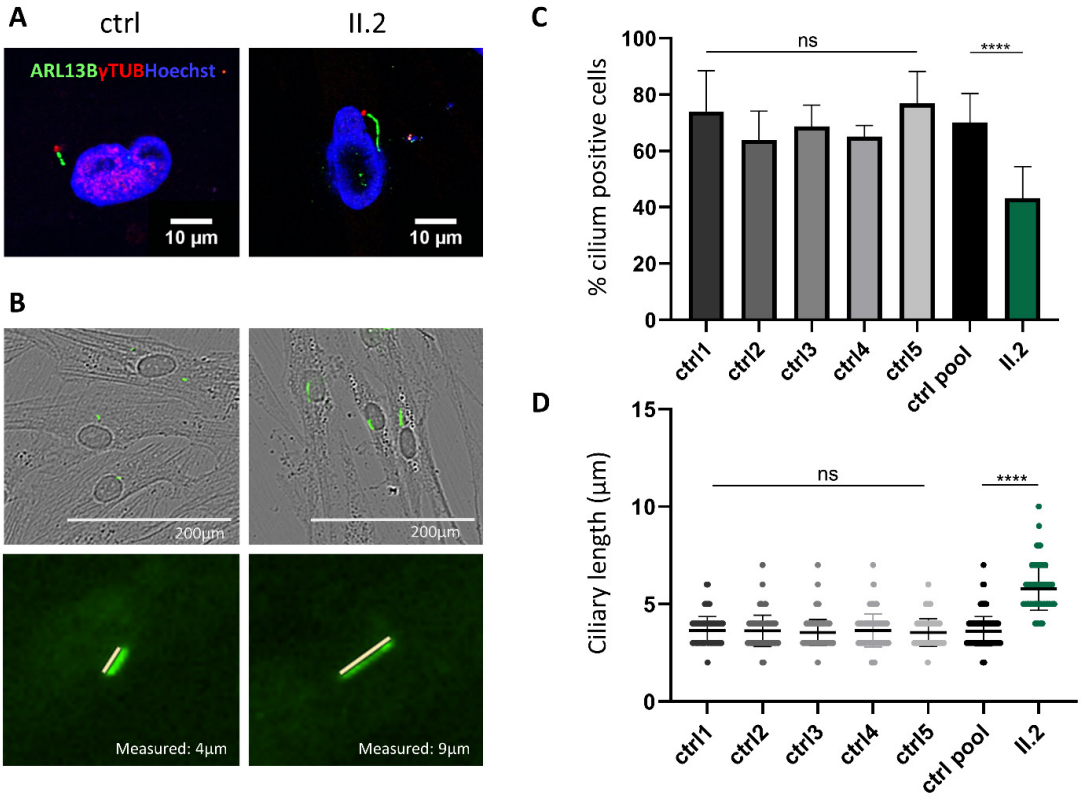


Figure 3. Functional assessment of *BBS5* variations. (**A**) Representative images of ciliogenesis in skin-derived fibroblasts from controls and the patient. Primary cilia were labeled with an anti-ARL13B antibody (green), the basal body with anti-γ-Tubulin antibody (red), and the nucleus was visualized with Hoechst staining (blue). Images were taken with an inverted fluorescence microscope (Olympus spinning disk, 60× water immersion objective). Scale bars 10 µm. (**B**) Ciliated cells were counted on serum-deprived (48 h) controls and the patient's skin-derived fibroblasts fixed for immunofluorescence and stained with an anti-ARL13B (green) antibody. Images were taken with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing a combined visualization of phase (cells) and fluorescence (cilia). (**C**) Percentage of patient's skin fibroblasts with cilia. The percentage of ciliated cells was calculated by dividing PC counts by cellular counts (n = 400 cells analyzed for each of the controls and the patient). p-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA, ns: non-significant, ****: $p < 0.0001$. (**D**) Quantification of primary cilia length (n = 400 cells analyzed for each of the controls and patient). p-values and significance were determined using the Kruskal–Wallis test ****: $p < 0.0001$. In (**C**,**D**), the measured number of cilia (n) represents pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment.

2.5. Alteration of Canonical Hh Signalling in Patient's Cells Lacking BBS5

To test the effect of BBS5 on the function of the primary cilium, the Hh pathway's activity in patient and control cells was questioned using a smoothened agonist (SAG) to activate Hh signaling with and without inducing ciliogenesis (Supplementary Figure S5). The expression levels of GLI1 and PTCH1 (two Hh target genes) in response to Hh pathway activation were evaluated as a marker of Hh activity. Five controls were used—four of them showed a robust significant induction of Hh target genes GLI1 and PTCH1 in response to SMO ligand stimulation in ciliogenesis conditions (0.1% FCS). By contrast, a strongly reduced response to the SMO ligand was observed in patient cells, revealed by a reduction of the Hh target genes' expression under the same conditions (Figure 4). As almost no signal was detected in the patient's fibroblasts, Hh pathway activation was significantly less important in the patient's cells. These data indicated an alteration of the transduction of the Hh pathway in the patient's cells that was probably due to the primary cilia alteration caused by the absence of the BBS5 protein.

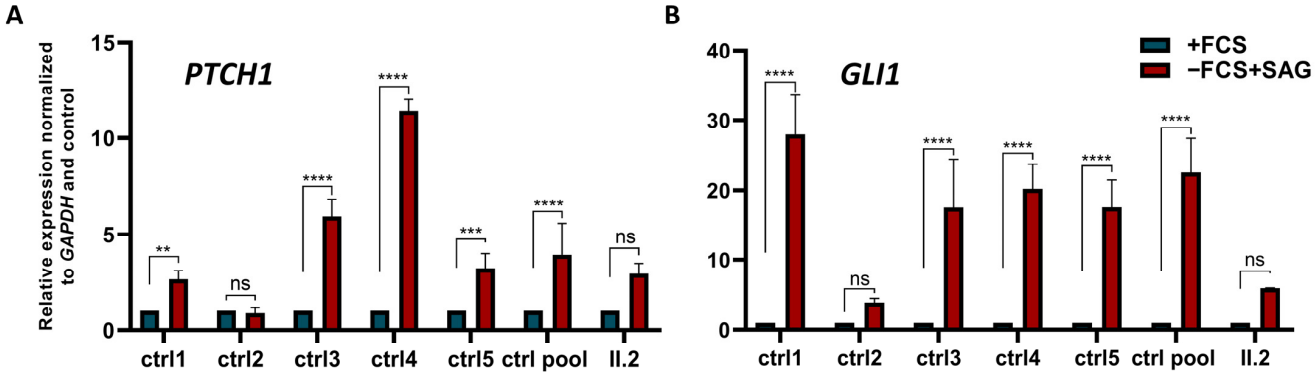


Figure 4. Assessment of Hh-signal transduction by quantification of the expression levels on Hh-stimulated cells (+SAG) from controls and the patient with (−FCS) and without (+FCS) inducing ciliogenesis. Results for two Hh target genes are represented (**A**) *PTCH1* and (**B**) *GLI1.* The expression of both genes was normally induced in controls except in control 2, whereas no induction was found in the patient. The expression data performed with biological triplicates were normalized to the reference gene *GAPDH* mRNA expression data, and the values were presented as relative expression levels ± SEM. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ns: non-significant, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ ****: $p < 0.0001$.

3. Discussion

Bardet–Biedl syndrome is an autosomal recessive ciliopathy characterized by clinical and genetic heterogeneity. Twenty-four BBS genes and a few additional candidate genes have been identified so far, and pathogenic variations are found in a large fraction of them (ranging from 80 to 100%). In such heterogeneous diseases, next-generation sequencing (TES, WES, and WGS) has made the diagnosis for many individuals possible [6,21] but also revealed more complex cases [22,23]. Each of these assays requires a different sample preparation and numerous and diverse bioinformatics programs to analyze the data, revealing sometimes variants by another method, which makes them complementary in solving certain cases. For example, only 25% to 50% of patients have a molecular diagnosis by WES depending on the disease, leaving many cases still unsolved [24]. WGS is now largely used with the advantage of covering the non-coding part of the human genome [25] but requires careful analysis [26] and novel tools [27].

In this study, two compound heterozygous variants in *BBS5* were identified, a duplication of the triplet AAT in exon 7 (NM_152384.2:c.550_552dup) leading to the duplication of asparagine 184 (p.Asn184dup) and a large deletion of the 2 first exons (c.1-2272_142+879del) encompassing the promotor region of the gene. The patient's exploration included TES, WES, and finally WGS. The Asn184 duplication was identified by all three methods but

was initially overlooked (class 3) with the absence of a second variant, although manual inspection of the TES and WES data using IGV was performed to search for a possible CNV. Previous studies have already shown that certain types of variations might not be detected by some approaches (TES vs. WES vs. WGS) [28,29]. This was the case for the 5918 bp deletion that was only detected by WGS in a region less prone to TES and WES. This shows how WGS is an appropriate strategy for the exploration of patients with rare diseases and that the nature of the collected data (i.e., homogeneous depth of coverage compared to WES) can improve detection of variations even when using the same bioinformatics program.

BBS5 is a minor contributor to the BBS mutation load as only 2% of the families from various ethnic backgrounds harbor *BBS5* variants [16]. So far, 32 variants have been reported, including missense, nonsense, splicing, deletion or insertion, and some structural variants (Supplementary Table S7). Analysis of the clinical data of previously reported *BBS5* cases (n = 65 for 45 families) highlights high variability in the severity the patients experience (Supplementary Table S8). Among the 39 cases with clinical information, obesity was the most prominent clinical sign (n = 29), followed by retinal dystrophy (n = 23), polydactyly (n = 19), cognitive impairment (n = 18), hypogonadism (n = 17), and renal anomalies (n = 11). Considering the combination of major clinical manifestations, nine had one major sign, five had two, nine had three, eight had four, five had five, and three had six, delineating the variability in clinical manifestations of *BBS5* cases.

Trio analysis using either WES or WGS generally has a rate of diagnostic success higher than that of singleton analysis [30,31]. Nevertheless, thanks to cDNA analysis that proved that only one allele was expressed, it was possible to demonstrate the biallelic status of variations. Since the parents' samples were not available, it was not possible to rule out that one or even both variants were of de novo appearance. However, this was less likely given the extremely rare report of such cases [32,33], although underestimated in ciliopathies (Gouronc et al., manuscript accepted).

Given the difficulty in identifying this variation and the genomic context surrounding the breakpoints, it was speculated that other genetic screenings might have missed this variation and that several other families might carry it. However, despite screening 440 samples, no other cases harboring this deletion could be identified as underlying the burden of private pathogenic variations in BBS [18]. The AAT duplication was initially considered as a variant of uncertain significance. Indeed, non-frameshifting indels are a type of variant that are difficult to handle as only a few programs and cases are available to reliably predict any effect. Asn 184 is located in the second DM16 region within the PH2 domain of the protein. This domain's function is still unknown, but the sequence is very well conserved in evolution [15]. This high level of conservation and the bioinformatics predictions (e.g., deleterious) suggest that the variant should be considered pathogenic. Analysis of the proteins extracted from the cultured skin-derived fibroblasts of the patient did not succeed in revealing any BBS5 protein compared to controls. It was hypothesized that the protein was not stable enough to maintain its 3D structure with a single AA in addition.

Multiple studies have already shown the implication of BBS genes in regulating ciliogenesis and cilium length with inconsistent conclusions due to various conditions and models [34,35]. In particular, BBS5 is a protein of 341 amino acids (NP_689597.1) and also one of the eight subunits forming the BBSome complex [16]. The BBSome is a 438 KDa complex located at the base of the cilium. It is required for ciliary localization, assembly, and function, as it functions as a cargo adaptor that maintains, stabilizes, and assembles IFT particles; thus, it supports protein and signaling receptors' trafficking across the cilium [11,36,37]. As the BBSome assists traffic at the base of the cilium, pathogenic variations in BBS proteins might disrupt cilia assembly and cilia function. BBS5 is the only component of the BBSome that contains two PH domains, making its structure unique. These PH domains bind to phosphoinositides, which is critical for ciliogenesis. Even if its function is not well understood, BBS5 was recently associated with ciliogenesis defects (less ciliated cells and shorter cells) and the regulation of the transduction of the

Hh signaling pathway [38]. In this study, similar results were obtained, strengthening the observed effect. On the contrary, a similar investigation on different models or cell types showed mixed effects. Depletion of the *BBS5* gene in retinal pigment epithelial (RPE) cells shows a reduction in the number of ciliated cells [12]. However, other studies demonstrated no effect such as in a BBS5 knockdown (KO) in mouse embryonic fibroblast cells (MEFs cells) [39] or in hTERT-RPE-1 knockdown cells [40]. These differences might indicate different effects depending either on the cell type or on the pathogenic variants in consideration. Demonstrating consistency in how BBS genes affect the patients' cells is important to assess future variants of uncertain significance.

It is well-established that a functional primary cilium is particularly important for the development of the body through the activation of signaling pathways such as the one mediated by SHH [41]. In the same way, investigation of the Hh signaling pathway showed that a defective BBS5 leads to inactivation of the pathway. Another study observed similar results in other *BBS5* patient's fibroblasts and in *BBS5*-RPE1 KO cells [38]. On the contrary, $BBS5^{-/-}$ mouse models do not exhibit classical Hh signaling defects (e.g., dorsal ventral neural tube patterning defects, polydactyly). Still, they identified developmental and homeostatic effects and novel pituitary abnormalities [39]. The observed impairment of the Hh signaling activity due to *BBS5* variants or *BBS5*-depletion shows the importance of BBS5 function in the BBSome and its implication in the trafficking of receptors important for the canonical Hh signaling pathway. It is not certain that the different BBS proteins in the BBSome are equally crucial for Hh signaling; they may have protein-specific functions. Alteration of the Hh pathway has been associated with polydactyly in several studies [42]. This is indeed a typical phenotype present in patient AII.2. Results such as these call for a more systematic analysis of cells for various conditions including different types of variants and different genes. To understand if the BBS5 effect on the Hh pathway is cell-type-specific or species-specific, further studies on different cell lines and *BBS5* mice models are needed.

Accessing a definitive molecular diagnostics in the case of rare genetic diseases is essential for providing proper genetic counselling to the affected family and access to existing treatments [43,44]. Reporting additional cases associated with this gene should help identifying genotype–phenotype correlations and lead to novel clinical trials in the future.

4. Materials and Methods

4.1. Molecular Genetics Investigation

Several genetics assays were used to investigate the affected member from family A (II.2), including TES of BBS genes and WES (see Supplementary Methods and Table S1). In particular, WGS was performed for the index case (II.2) by the Centre National de Recherche en Génomique Humaine (Institut de Génomique, CEA). Genomic DNA was used to prepare a library for WGS using an Illumina TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit according to the manufacturer's instructions. After normalization and quality control, qualified libraries were sequenced on a HiSeqX5 platform from Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) as paired-end 150 bp reads. Sequence quality parameters were assessed throughout the sequencing run, and standard bioinformatics analysis of the sequencing data was based on the Illumina pipeline to generate FASTQ files for each sample. The sequence reads were aligned to the reference sequence of the human genome (GRCh37) using the Burrows–Wheeler Aligner (BWA V7.12) [45]. The UnifiedGenotyper and HaplotypeCaller modules of the Genome Analysis ToolKit (GATK) [46], Platypus [47], and Samtools [48] were used for calling both single nucleotide variations (SNV) and small insertions/deletions (indels). An average sequencing depth of 37× was achieved for 91.6% of the genome. Annotation and ranking of SNVs and indels were performed by VaRank 1.4.3 [49] in combination with Alamut Batch software 1.11 (Interactive Biosoftware, Rouen, France). Very stringent criteria were applied to filter out non-pathogenic variants (Supplementary Table S2): (i) variants represented with an allele frequency of more than 1% in public variation databases, including 1000 Genomes [50], the gnomAD database [51], the DGV database [52], or our internal database; (ii) variants in 5′ and 3′ UTR, downstream, upstream,

or intronic locations and synonymous without pathogenic prediction of local splice effects; (iii) variants not in the ciliary genes [53]. Structural variants were predicted using CANOES with a bed restricted to the WES [54] and Lumpy 0.2.13 [55] including mobile element insertion using Mobster [56] and annotated by AnnotSV 2.3 [57]. The analysis focused on compound heterozygous and homozygous variants consistent with a recessive mode of transmission. Each candidate variation was also checked using Integrative Genomics Viewer (IGV 2.16.0) software [58].

4.2. Cell Culture

Primary dermal derived fibroblasts from a BBS case (II.2) and control individuals were obtained by skin biopsy according to [59]. The fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glutamax (21885-025 Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin–streptomycin (PS) (all from Gibco). To induce ciliogenesis, the fibroblasts were grown in serum-reduced media (0.1% FCS) for 48 h. To induce SHH pathway stimulation, the fibroblasts were stimulated with smoothened agonist (SAG, ab145866 Abcam, Cambridge, UK) at a final concentration of 100 nM for 48 h with and without serum starvation.

4.3. Genomic DNA Extraction, PCRs

DNA was extracted from blood cells using a DNeasy Blood & Tissue Kit (ref 69504, Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentration was evaluated by spectrophotometry (Eppendorf Bio Photometer Plus). Genotyping PCRs were carried out with diluted DNA to 10 ng/reaction, diluted Tag DNA polymerase (2U/reaction), and PCR mix 5× to 1×. A duplex PCR was designed to detect the deletion specifically. PCR protocol variations were applied to optimize the amplification of the fragments of interest (PCR touchdown). Under these conditions, the duplex PCR was carried out using two pairs of primers. The confirmation of the duplication was carried out by a classic PCR on cDNA. PCR was carried out using 10 ng of cDNA/reaction. Primers for both PCRs were designed using Ensembl [60], Primer3 "https://github.com/primer3-org" (accessed on 1 February 2020), the UCSC "in silico PCR" [61], and NCBI primers [62]. Primers are available in Supplementary Table S3. PCR conditions are available upon request.

4.4. Sanger Sequencing and Segregation

Variant confirmation or cDNA sequences were obtained using Sanger sequencing after PCR amplification and fragments' purification (membrane placed under vacuum for 10 min). Bidirectional sequencing of the purified PCR products (with the appropriate primers) was performed by GATC Sequencing Facilities (Konstanz, Germany). The used primers are summarized in Supplementary Table S3.

4.5. Cohort Screening

Two duplex PCRs were designed to detect specifically the deletion of exons 1 and 2. Primers and example conditions are provided in Supplementary Table S3 and Figure S1.

4.6. RNA Extraction, Reverse-Transcription, and Quantitative Real-Time PCR

RNA was extracted from skin-derived fibroblasts via QiaShredder (Qiagen, ref 79654) and RNeasy Minikit (Qiagen, ref 74104) kits. RNA concentration was evaluated by spectrophotometry (Eppendorf Bio Photometer Plus). cDNA was synthesized via an "iScript ™ c Synthesis Kit" (170-889, Bio-Rad, Hercules, USA) according to the manufacturer's instructions with 500 ng of RNA. Quantitative real-time PCR was carried out with a iQTM SYBR Green Supermix (#170-8886, Bio-Rad) in a Bio-Rad CFX96/384^{TM} Real-Time System in triplicate. cDNA was diluted to 1/10, and *BBS5*, *GLI1*, *PTCH1*, *GAPDH*, and *HPRT* (two house-keeping genes) primers were used at a concentration of 0.25 µM. The primers are available in Supplementary Table S3. The normalized fold expression of the target genes was calculated using the comparative cycle threshold (C_t) method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method)

by normalizing target messenger RNA (mRNA) C_t to those for both *GAPDH* and *HPRT* reference gene using CFX Manager Software Version 1.5 and Microsoft Excel calculations. Data are presented as relative expressions ± SEM. Statistical analyses were done using the GraphPad Prism software. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

4.7. Protein Extraction and Western Blot

Protein was extracted from skin-derived fibroblasts with a radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) containing Protease Inhibitor Cocktail (25×, Complete EDTA free, 05056489001, Roche, Basel, Switzerland). Protein quantification was performed with the Bradford test using an Eppendorf BioPhotometer Plus spectrophotometer. A total of 40 µg of protein was separated on 10% SDS-PAGE polyacrylamide gel (Mini-PROTEAN TGXTM Gels cat.#456-1034, Bio-Rad) or homemade gel and transferred onto a PVDF membrane (0.2 µM, Trans-Blot Turbo, Transfer Pack, Bio-Rad, 1704156) using the TransblotR TurboTM Transfer System (Bio-Rad). After blocking in 5% milk–TBS1X–Tween 0.1% for 1 h at room temperature, the membrane was probed with the primary antibody overnight at 4 °C, followed by HRP-conjugated secondary antibody incubation for 1 h at room temperature. Chemiluminescent detection was performed using a ChemidocTM MP Imaging System (Bio-Rad) with PierceTM ECL Western (ref 32209, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and SuperSignal R West Femto Maximum Sensitivity Substrate (prod #34095, Thermo Fisher Scientific) solutions. Stripping was done using the RestoreTMWestern Blot Stripping BufferTM (prod #21059). Quantification of bands was performed using Image Lab software 6.0.1 (Bio-Rad). BBS5 quantification data performed in triplicate were normalized to the reference cytoplasmic protein β-Tubulin. Antibodies used in this experiment are available in Supplementary Table S4.

4.8. Immunofluorescence Analysis

To induce primary cilia formation, the fibroblasts were grown in serum-reduced media (0.1% FCS) for 48 h. Skin-derived fibroblasts were grown on 24-well plates (Falcon, 3226) and Lab-Tek8-well chamber slides (Thermo Fisher Scientific Nunc 15411). The fibroblasts were subsequently fixed in ice-cold methanol at −20 °C for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS 1×, and blocked in 10% FCS in PBS 1× for 1 h at room temperature. Incubation with primary antibodies diluted in 2% FCS was done for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C. Secondary antibody incubation was carried out for 1 h at room temperature. For those realized in Lab-Tek8-well, nuclei were visualized using Hoechst, and images were obtained using an inverted fluorescence microscope (Olympus spinning disk, 60× water immersion objective). For those realized on 24-well plates, images were obtained using an IncuCyte S3-Sartorius and were analyzed using ImageJ. Cilia frequency was calculated from the number of cells with a primary cilium divided by the total number of cells (n = 400 cells analyzed). *p*-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA ****: $p < 0.0001$. Primary cilia length was measured via IncuCyte software irrespective of the angle of orientation (n = 400 cilia). *p*-values and significance were determined using Kruskal–Wallis test ****: $p < 0.0001$. The number of cilia (n) measured consisted of pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment. Statistical analysis was done using GraphPad Prism software. Antibodies used in this experiment are available in Supplementary Table S4.

5. Conclusions

In this study, two novel variations in *BBS5* (c.550_552dup, and c.1-2272_142+879del) were identified in a non-consanguineous European BBS patient that broadened the *BBS5* mutation spectrum. The pathogenicity of both variations was confirmed. The duplication likely destabilizes the protein and is now classified as a class 5 variant. Furthermore, it was demonstrated that BBS5 affected ciliogenesis and primary cilium length. The Hh signaling pathway was impaired in the patient's fibroblasts, indicating a defective primary cilium and

that BBS5 also affected primary cilia function. This report illustrated the usefulness of WGS sequencing in identifying pathogenic variations, especially CNVs in highly heterogeneous genetic disorders. Despite robust ACMG guidelines for variant interpretation, this study shows how functional tests are essential to providing a definitive answer to patients.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24108729/s1. References [63–74] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: S.S., L.F.P. and H.D. collected the clinical information; A.-S.L., E.N., J.T., S.S., E.G., R.R., F.S., A.B. and J.-F.D. performed and collected the NGS analysis; V.G. and J.-B.L. conducted the bioinformatics analysis; A.K., C.D. and C.S. performed molecular biology experiments; A.K. and C.D. performed the cellular experiment; A.K., C.D., A.E.-C. and J.M. analyzed the data; N.L.M. supervised part of the experimental data; A.K., H.D. and J.M. drafted the manuscript, and H.D. and J.M. supervised the entire study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: C.D. is supported by a FRM grant (ECO20170637509). A.E.-C. is supported by Fondation JED-Belgique. This work was supported by the following grants: EJP RD Solve-RET EJPRD19-234 and Agence de la biomédecine "AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique 2022" and the following institutions: University of Strasbourg and Strasbourg University Hospital. Whole-genome sequencing was performed by the CNRGH, and whole-exome sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the 'France Génomique' consortium (ANR-10-INBS-0009). All sequencing was funded by "La Fondation Maladie Rare" through the program "High throughput sequencing and rare diseases".

Institutional Review Board Statement: Study protocols used in this study have been approved by the corresponding Institutional Review Board of the University of Strasbourg and Strasbourg University Hospitals ("Comité Protection des Personnes" EST IV, N°DC-20142222). Written informed consent was provided for each participant. This research complies with the Declaration of Helsinki. Skin fibroblasts were obtained for the proband.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: Data generated or analyzed during this study are included in the published article and the corresponding supplementary data. The raw sequencing data generated in the course of this study are not publicly available due to the protocol and the corresponding consent used that did not include such information. All variants have been submitted to ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) and are accessible using the following accessions numbers: SCV003838996, SCV003838997.

Acknowledgments: We would like to thank the patient for her participation. We would like also to acknowledge the members of the diagnostic laboratories at the University Hospital in Strasbourg for technical assistance. We also thank Pierre Lindenbaum for giving us access to the genome dataset from the FREX project and Steven McGinn for careful proofreading of the manuscript. The authors would like to thank the BiGEst-ICube Platform for assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Waters, A.M.; Beales, P.L. Ciliopathies: An Expanding Disease Spectrum. *Pediatr. Nephrol.* **2011**, *26*, 1039–1056. [CrossRef] [PubMed]
2. Forsythe, E.; Beales, P.L. Bardet-Biedl Syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **2013**, *21*, 8–13. [CrossRef]
3. Gouronc, A.; Zilliox, V.; Jacquemont, M.-L.; Darcel, F.; Leuvrey, A.-S.; Nourisson, E.; Antin, M.; Alessandri, J.-L.; Doray, B.; Gueguen, P.; et al. High Prevalence of Bardet-Biedl Syndrome in La Réunion Island Is Due to a Founder Variant in ARL6/BBS3. *Clin. Genet.* **2020**, *98*, 166–171. [CrossRef]
4. Florea, L.; Caba, L.; Gorduza, E.V. Bardet-Biedl Syndrome-Multiple Kaleidoscope Images: Insight into Mechanisms of Genotype-Phenotype Correlations. *Genes* **2021**, *12*, 1353. [CrossRef]
5. Anvarian, Z.; Mykytyn, K.; Mukhopadhyay, S.; Pedersen, L.B.; Christensen, S.T. Cellular Signalling by Primary Cilia in Development, Organ Function and Disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 199–219. [CrossRef]

6. Shamseldin, H.E.; Shaheen, R.; Ewida, N.; Bubshait, D.K.; Alkuraya, H.; Almardawi, E.; Howaidi, A.; Sabr, Y.; Abdalla, E.M.; Alfaifi, A.Y.; et al. The Morbid Genome of Ciliopathies: An Update. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **2020**, *22*, 1051–1060. [CrossRef] [PubMed]
7. Garcia, G.; Raleigh, D.R.; Reiter, J.F. How the Ciliary Membrane Is Organized Inside-out to Communicate Outside-in. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, R421–R434. [CrossRef] [PubMed]
8. Rosengren, T.; Larsen, L.J.; Pedersen, L.B.; Christensen, S.T.; Møller, L.B. TSC1 and TSC2 Regulate Cilia Length and Canonical Hedgehog Signaling via Different Mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 2663–2680. [CrossRef]
9. Rimkus, T.K.; Carpenter, R.L.; Qasem, S.; Chan, M.; Lo, H.-W. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothened and GLI Inhibitors. *Cancers* **2016**, *8*, 22. [CrossRef]
10. Denef, N.; Neubüser, D.; Perez, L.; Cohen, S.M. Hedgehog Induces Opposite Changes in Turnover and Subcellular Localization of Patched and Smoothened. *Cell* **2000**, *102*, 521–531. [CrossRef] [PubMed]
11. Nachury, M.V.; Loktev, A.V.; Zhang, Q.; Westlake, C.J.; Peränen, J.; Merdes, A.; Slusarski, D.C.; Scheller, R.H.; Bazan, J.F.; Sheffield, V.C.; et al. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell* **2007**, *129*, 1201–1213. [CrossRef] [PubMed]
12. Loktev, A.V.; Zhang, Q.; Beck, J.S.; Searby, C.C.; Scheetz, T.E.; Bazan, J.F.; Slusarski, D.C.; Sheffield, V.C.; Jackson, P.K.; Nachury, M.V. A BBSome Subunit Links Ciliogenesis, Microtubule Stability, and Acetylation. *Dev. Cell* **2008**, *15*, 854–865. [CrossRef] [PubMed]
13. Wingfield, J.L.; Lechtreck, K.-F.; Lorentzen, E. Trafficking of Ciliary Membrane Proteins by the Intraflagellar Transport/BBSome Machinery. *Essays Biochem.* **2018**, *62*, 753–763. [CrossRef] [PubMed]
14. Nachury, M.V.; Mick, D.U. Establishing and Regulating the Composition of Cilia for Signal Transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 389–405. [CrossRef] [PubMed]
15. Li, J.B.; Gerdes, J.M.; Haycraft, C.J.; Fan, Y.; Teslovich, T.M.; May-Simera, H.; Li, H.; Blacque, O.E.; Li, L.; Leitch, C.C.; et al. Comparative Genomics Identifies a Flagellar and Basal Body Proteome That Includes the BBS5 Human Disease Gene. *Cell* **2004**, *117*, 541–552. [CrossRef]
16. Imani, S.; Cheng, J.; Fu, J.; Mobasher-Jannat, A.; Wei, C.; Mohazzab-Torabi, S.; Jadidi, K.; Khosravi, M.H.; Shasaltaneh, M.D.; Yang, L.; et al. Novel Splicing Variant c. 208+2T>C in BBS5 Segregates with Bardet-Biedl Syndrome in an Iranian Family by Targeted Exome Sequencing. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20181544. [CrossRef] [PubMed]
17. Zhang, Q.; Seo, S.; Bugge, K.; Stone, E.M.; Sheffield, V.C. BBS Proteins Interact Genetically with the IFT Pathway to Influence SHH-Related Phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 1945–1953. [CrossRef] [PubMed]
18. Muller, J.; Stoetzel, C.; Vincent, M.C.; Leitch, C.C.; Laurier, V.; Danse, J.M.; Hellé, S.; Marion, V.; Bennouna-Greene, V.; Vicaire, S.; et al. Identification of 28 Novel Mutations in the Bardet–Biedl Syndrome Genes: The Burden of Private Mutations in an Extensively Heterogeneous Disease. *Hum. Genet.* **2010**, *127*, 583–593. [CrossRef]
19. Redin, C.; Le Gras, S.; Mhamdi, O.; Geoffroy, V.; Stoetzel, C.; Vincent, M.-C.; Chiurazzi, P.; Lacombe, D.; Ouertani, I.; Petit, F.; et al. Targeted High-Throughput Sequencing for Diagnosis of Genetically Heterogeneous Diseases: Efficient Mutation Detection in Bardet-Biedl and Alström Syndromes. *J Med Genet* **2012**, *49*, 502–512. [CrossRef]
20. Buchan, D.W.A.; Jones, D.T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 Years On. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W402–W407. [CrossRef]
21. Shaheen, R.; Szymanska, K.; Basu, B.; Patel, N.; Ewida, N.; Faqeih, E.; Al Hashem, A.; Derar, N.; Alsharif, H.; Aldahmesh, M.A.; et al. Characterizing the Morbid Genome of Ciliopathies. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 242. [CrossRef] [PubMed]
22. Delvallée, C.; Nicaise, S.; Antin, M.; Leuvrey, A.-S.; Nourisson, E.; Leitch, C.C.; Kellaris, G.; Stoetzel, C.; Geoffroy, V.; Scheidecker, S.; et al. A BBS1 SVA F Retrotransposon Insertion Is a Frequent Cause of Bardet-Biedl Syndrome. *Clin. Genet.* **2021**, *99*, 318–324. [CrossRef] [PubMed]
23. Fadaie, Z.; Whelan, L.; Dockery, A.; Li, C.H.Z.; van den Born, L.I.; Hoyng, C.B.; Gilissen, C.; Corominas, J.; Rowlands, C.; Megaw, R.; et al. BBS1 Branchpoint Variant Is Associated with Non-Syndromic Retinitis Pigmentosa. *J. Med. Genet.* **2022**, *59*, 438–444. [CrossRef]
24. Taylor, J.C.; Martin, H.C.; Lise, S.; Broxholme, J.; Cazier, J.-B.; Rimmer, A.; Kanapin, A.; Lunter, G.; Fiddy, S.; Allan, C.; et al. Factors Influencing Success of Clinical Genome Sequencing across a Broad Spectrum of Disorders. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 717–726. [CrossRef]
25. Gilissen, C.; Hehir-Kwa, J.Y.; Thung, D.T.; van de Vorst, M.; van Bon, B.W.M.; Willemsen, M.H.; Kwint, M.; Janssen, I.M.; Hoischen, A.; Schenck, A.; et al. Genome Sequencing Identifies Major Causes of Severe Intellectual Disability. *Nature* **2014**, *511*, 344–347. [CrossRef]
26. Austin-Tse, C.A.; Jobanputra, V.; Perry, D.L.; Bick, D.; Taft, R.J.; Venner, E.; Gibbs, R.A.; Young, T.; Barnett, S.; Belmont, J.W.; et al. Best Practices for the Interpretation and Reporting of Clinical Whole Genome Sequencing. *NPJ Genom. Med.* **2022**, *7*, 27. [CrossRef]
27. Tabarini, N.; Biagi, E.; Uva, P.; Iovino, E.; Pippucci, T.; Seri, M.; Cavalli, A.; Ceccherini, I.; Rusmini, M.; Viti, F. Exploration of Tools for the Interpretation of Human Non-Coding Variants. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12977. [CrossRef]
28. Belkadi, A.; Bolze, A.; Itan, Y.; Cobat, A.; Vincent, Q.B.; Antipenko, A.; Shang, L.; Boisson, B.; Casanova, J.-L.; Abel, L. Whole-Genome Sequencing Is More Powerful Than Whole-Exome Sequencing for Detecting Exome Variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5473–5478. [CrossRef] [PubMed]

29. Geoffroy, V.; Stoetzel, C.; Scheidecker, S.; Schaefer, E.; Perrault, I.; Bär, S.; Kröll, A.; Delbarre, M.; Antin, M.; Leuvrey, A.-S.; et al. Whole-Genome Sequencing in Patients with Ciliopathies Uncovers a Novel Recurrent Tandem Duplication in IFT140. *Hum. Mutat.* **2018**, *39*, 983–992. [CrossRef] [PubMed]
30. Clark, M.M.; Stark, Z.; Farnaes, L.; Tan, T.Y.; White, S.M.; Dimmock, D.; Kingsmore, S.F. Meta-Analysis of the Diagnostic and Clinical Utility of Genome and Exome Sequencing and Chromosomal Microarray in Children with Suspected Genetic Diseases. *NPJ Genom. Med.* **2018**, *3*, 16. [CrossRef] [PubMed]
31. Wright, C.F.; Fitzgerald, T.W.; Jones, W.D.; Clayton, S.; McRae, J.F.; van Kogelenberg, M.; King, D.A.; Ambridge, K.; Barrett, D.M.; Bayzetinova, T.; et al. Genetic Diagnosis of Developmental Disorders in the DDD Study: A Scalable Analysis of Genome-Wide Research Data. *Lancet* **2015**, *385*, 1305–1314. [CrossRef] [PubMed]
32. Retterer, K.; Juusola, J.; Cho, M.T.; Vitazka, P.; Millan, F.; Gibellini, F.; Vertino-Bell, A.; Smaoui, N.; Neidich, J.; Monaghan, K.G.; et al. Clinical Application of Whole-Exome Sequencing across Clinical Indications. *Genet. Med.* **2016**, *18*, 696–704. [CrossRef] [PubMed]
33. Yang, Y.; Muzny, D.M.; Xia, F.; Niu, Z.; Person, R.; Ding, Y.; Ward, P.; Braxton, A.; Wang, M.; Buhay, C.; et al. Molecular Findings among Patients Referred for Clinical Whole-Exome Sequencing. *JAMA* **2014**, *312*, 1870. [CrossRef] [PubMed]
34. Hernandez-Hernandez, V.; Pravincumar, P.; Diaz-Font, A.; May-Simera, H.; Jenkins, D.; Knight, M.; Beales, P.L. Bardet-Biedl Syndrome Proteins Control the Cilia Length through Regulation of Actin Polymerization. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 3858–3868. [CrossRef]
35. Patnaik, S.R.; Kretschmer, V.; Brücker, L.; Schneider, S.; Volz, A.-K.; Oancea-Castillo, L.d.R.; May-Simera, H.L. Bardet–Biedl Syndrome Proteins Regulate Cilia Disassembly during Tissue Maturation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 757–775. [CrossRef]
36. Liu, P.; Lechtreck, K.F. The Bardet-Biedl Syndrome Protein Complex Is an Adapter Expanding the Cargo Range of Intraflagellar Transport Trains for Ciliary Export. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E934–E943. [CrossRef]
37. McConnachie, D.J.; Stow, J.L.; Mallett, A.J. Ciliopathies and the Kidney: A Review. *Am. J. Kidney Dis.* **2021**, *77*, 410–419. [CrossRef]
38. Hey, C.A.B.; Larsen, L.J.; Tümer, Z.; Brøndum-Nielsen, K.; Grønskov, K.; Hjortshøj, T.D.; Møller, L.B. BBS Proteins Affect Ciliogenesis and Are Essential for Hedgehog Signaling, but Not for Formation of iPSC-Derived RPE-65 Expressing RPE-like Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1345. [CrossRef]
39. Bentley-Ford, M.R.; Engle, S.E.; Clearman, K.R.; Haycraft, C.J.; Andersen, R.S.; Croyle, M.J.; Rains, A.B.; Berbari, N.F.; Yoder, B.K. A Mouse Model of BBS Identifies Developmental and Homeostatic Effects of BBS5 Mutation and Identifies Novel Pituitary Abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* **2021**, *30*, 234–246. [CrossRef]
40. Xu, Q.; Zhang, Y.; Wei, Q.; Huang, Y.; Li, Y.; Ling, K.; Hu, J. BBS4 and BBS5 Show Functional Redundancy in the BBSome to Regulate the Degradative Sorting of Ciliary Sensory Receptors. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11855. [CrossRef]
41. Eguether, T.; Cordelieres, F.P.; Pazour, G.J. Intraflagellar Transport Is Deeply Integrated in Hedgehog Signaling. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 1178–1189. [CrossRef] [PubMed]
42. Xu, C.; Yang, X.; Zhou, H.; Li, Y.; Xing, C.; Zhou, T.; Zhong, D.; Lian, C.; Yan, M.; Chen, T.; et al. A Novel ZRS Variant Causes Preaxial Polydactyly Type I by Increased Sonic Hedgehog Expression in the Developing Limb Bud. *Genet. Med.* **2020**, *22*, 189–198. [CrossRef]
43. Forsythe, E.; Haws, R.M.; Argente, J.; Beales, P.; Martos-Moreno, G.Á.; Dollfus, H.; Chirila, C.; Gnanasakthy, A.; Buckley, B.C.; Mallya, U.G.; et al. Quality of Life Improvements Following One Year of Setmelanotide in Children and Adult Patients with Bardet-Biedl Syndrome: Phase 3 Trial Results. *Orphanet J. Rare Dis.* **2023**, *18*, 12. [CrossRef]
44. Haqq, A.M.; Chung, W.K.; Dollfus, H.; Haws, R.M.; Martos-Moreno, G.Á.; Poitou, C.; Yanovski, J.A.; Mittleman, R.S.; Yuan, G.; Forsythe, E.; et al. Efficacy and Safety of Setmelanotide, a Melanocortin-4 Receptor Agonist, in Patients with Bardet-Biedl Syndrome and Alström Syndrome: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial with an Open-Label Period. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2022**, *10*, 859–868. [CrossRef] [PubMed]
45. Li, H.; Durbin, R. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows–Wheeler Transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760. [CrossRef]
46. 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. A Framework for Variation Discovery and Genotyping Using Next-Generation DNA Sequencing Data. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 491–498. [CrossRef] [PubMed]
47. Rimmer, A.; Phan, H.; Mathieson, I.; Iqbal, Z.; Twigg, S.R.F.; Wilkie, A.O.M.; McVean, G.; Lunter, G.; WGS500 Consortium. Integrating Mapping-, Assembly- and Haplotype-Based Approaches for Calling Variants in Clinical Sequencing Applications. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 912–918. [CrossRef]
48. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [CrossRef]
49. Geoffroy, V.; Pizot, C.; Redin, C.; Piton, A.; Vasli, N.; Stoetzel, C.; Blavier, A.; Laporte, J.; Muller, J. VaRank: A Simple and Powerful Tool for Ranking Genetic Variants. *PeerJ* **2015**, *3*, e796. [CrossRef]
50. The 1000 Genomes Project Consortium; Gibbs, R.A.; Boerwinkle, E.; Doddapaneni, H.; Han, Y.; Korchina, V.; Kovar, C.; Lee, S.; Muzny, D.; Reid, J.G.; et al. A Global Reference for Human Genetic Variation. *Nature* **2015**, *526*, 68–74. [CrossRef]
51. Lek, M.; Karczewski, K.J.; Minikel, E.V.; Samocha, K.E.; Banks, E.; Fennell, T.; O'Donnell-Luria, A.H.; Ware, J.S.; Hill, A.J.; Cummings, B.B.; et al. Analysis of Protein-Coding Genetic Variation in 60,706 Humans. *Nature* **2016**, *536*, 285–291. [CrossRef]

52. MacDonald, J.R.; Ziman, R.; Yuen, R.K.C.; Feuk, L.; Scherer, S.W. The Database of Genomic Variants: A Curated Collection of Structural Variation in the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D986–D992. [CrossRef] [PubMed]
53. Nevers, Y.; Prasad, M.K.; Poidevin, L.; Chennen, K.; Allot, A.; Kress, A.; Ripp, R.; Thompson, J.D.; Dollfus, H.; Poch, O.; et al. Insights into Ciliary Genes and Evolution from Multi-Level Phylogenetic Profiling. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 2016–2034. [CrossRef] [PubMed]
54. Backenroth, D.; Homsy, J.; Murillo, L.R.; Glessner, J.; Lin, E.; Brueckner, M.; Lifton, R.; Goldmuntz, E.; Chung, W.K.; Shen, Y.F. CANOES: Detecting Rare Copy Number Variants from Whole Exome Sequencing Data. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e97. [CrossRef] [PubMed]
55. Layer, R.M.; Chiang, C.; Quinlan, A.R.; Hall, I.M. LUMPY: A Probabilistic Framework for Structural Variant Discovery. *Genome Biol.* **2014**, *15*, R84. [CrossRef] [PubMed]
56. Thung, D.T.; de Ligt, J.; Vissers, L.E.; Steehouwer, M.; Kroon, M.; de Vries, P.; Slagboom, E.P.; Ye, K.; Veltman, J.A.; Hehir-Kwa, J.Y. Mobster: Accurate Detection of Mobile Element Insertions in Next Generation Sequencing Data. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 488. [CrossRef]
57. Geoffroy, V.; Herenger, Y.; Kress, A.; Stoetzel, C.; Piton, A.; Dollfus, H.; Muller, J. AnnotSV: An Integrated Tool for Structural Variations Annotation. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 3572–3574. [CrossRef]
58. Thorvaldsdóttir, H.; Robinson, J.T.; Mesirov, J.P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-Performance Genomics Data Visualization and Exploration. *Brief. Bioinform.* **2012**, *14*, 178–192. [CrossRef]
59. Scheidecker, S.; Etard, C.; Pierce, N.W.; Geoffroy, V.; Schaefer, E.; Muller, J.; Chennen, K.; Flori, E.; Pelletier, V.; Poch, O.; et al. Exome Sequencing of Bardet–Biedl Syndrome Patient Identifies a Null Mutation in the BBSome Subunit BBIP1 (BBS18). *J. Med. Genet.* **2014**, *51*, 132–136. [CrossRef]
60. Martin, F.J.; Amode, M.R.; Aneja, A.; Austine-Orimoloye, O.; Azov, A.G.; Barnes, I.; Becker, A.; Bennett, R.; Berry, A.; Bhai, J.; et al. Ensembl 2023. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D933–D941. [CrossRef]
61. Nassar, L.R.; Barber, G.P.; Benet-Pagès, A.; Casper, J.; Clawson, H.; Diekhans, M.; Fischer, C.; Gonzalez, J.N.; Hinrichs, A.S.; Lee, B.T.; et al. The UCSC Genome Browser Database: 2023 Update. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D1188–D1195. [CrossRef]
62. Sayers, E.W.; Bolton, E.E.; Brister, J.R.; Canese, K.; Chan, J.; Comeau, D.C.; Connor, R.; Funk, K.; Kelly, C.; Kim, S.; et al. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D20–D26. [CrossRef] [PubMed]
63. Talevich, E.; Shain, A.H.; Botton, T.; Bastian, B.C. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Comput. Biol.* **2016**, *12*, e1004873. [CrossRef]
64. Suvakov, M.; Panda, A.; Diesh, C.; Holmes, I.; Abyzov, A. CNVpytor: A Tool for Copy Number Variation Detection and Analysis from Read Depth and Allele Imbalance in Whole-Genome Sequencing. *Gigascience* **2021**, *10*, giab074. [CrossRef]
65. Rausch, T.; Zichner, T.; Schlattl, A.; Stütz, A.M.; Benes, V.; Korbel, J.O. DELLY: Structural Variant Discovery by Integrated Paired-End and Split-Read Analysis. *Bioinformatics* **2012**, *28*, i333–i339. [CrossRef] [PubMed]
66. Chen, X.; Schulz-Trieglaff, O.; Shaw, R.; Barnes, B.; Schlesinger, F.; Källberg, M.; Cox, A.J.; Kruglyak, S.; Saunders, C.T. Manta: Rapid Detection of Structural Variants and Indels for Germline and Cancer Sequencing Applications. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 1220–1222. [CrossRef] [PubMed]
67. Bartenhagen, C.; Dugas, M. Robust and Exact Structural Variation Detection with Paired-End and Soft-Clipped Alignments: SoftSV Compared with Eight Algorithms. *Brief. Bioinform.* **2016**, *17*, 51–62. [CrossRef] [PubMed]
68. Huerta-Cepas, J.; Szklarczyk, D.; Forslund, K.; Cook, H.; Heller, D.; Walter, M.C.; Rattei, T.; Mende, D.R.; Sunagawa, S.; Kuhn, M.; et al. EggNOG 4.5: A Hierarchical Orthology Framework with Improved Functional Annotations for Eukaryotic, Prokaryotic and Viral Sequences. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *44*, D286–D293. [CrossRef]
69. Singh, S.K.; Gui, M.; Koh, F.; Yip, M.C.; Brown, A. Structure and Activation Mechanism of the BBSome Membrane Protein Trafficking Complex. *Elife* **2020**, *9*, e53322. [CrossRef]
70. Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.A.; Clamp, M.; Barton, G.J. Jalview Version 2–a Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1189–1191. [CrossRef]
71. Schrödinger, LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8*; Schrödinger, LLC.: New York, NY, USA, 2015.
72. Hu, J.; Ng, P.C. SIFT Indel: Predictions for the Functional Effects of Amino Acid Insertions/Deletions in Proteins. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77940. [CrossRef] [PubMed]
73. Zhao, H.; Yang, Y.; Lin, H.; Zhang, X.; Mort, M.; Cooper, D.N.; Liu, Y.; Zhou, Y. DDIG-in: Discriminating between Disease-Associated and Neutral Non-Frameshifting Micro-Indels. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R23. [CrossRef] [PubMed]
74. Choi, Y.; Chan, A.P. PROVEAN Web Server: A Tool to Predict the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2745–2747. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

SUPPLEMENTARY DATA

BBS panel sequencing

Next-generation sequencing of the patient's sample was performed on the Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocols. DNA libraries were constructed using the HaloPlex Target Enrichment system (Agilent Technologies, version D.5). The design targeted 30 genes of which 17 were BBS genes (*BBS1-BBS17*) for a total of 10,156 amplicons (134.04 kbp). The libraries were barcoded using HaloPlex ION Barcodes (Agilent Technologies) and then pooled by four samples. Emulsion PCR was performed on the Ion One Touch 2 system (Life Technologies) and the emulsion PCR products were enriched on the One Touch 2 Enrichment System using the Ion PGM Template OT2-200 kit (Life Technologies). Ion sphere particles (ISP) were enriched using the E/S module, charged on one Ion PGM 318 v2 chips and sequenced with an Ion Torrent PGM in a 200-bp configuration run. With an ISP loading of 73%, 481 Mb were produced in total out of 2,951,659 reads, with a median length of 166 bp, of which 130.6 Mb could be used for our patient (795,763 reads, median length of 164 bp). Sequencing data were analyzed by the Torrent Suite Software v4.4.2 with alignment to the reference human genome (GRCh37/hg19) (788,342 mapped reads, 48.61% on target) and base calling (SNV/indel). Variant annotation and ranking was performed as for the WGS methods. No specific CNV calling was achieved but depth of coverage comparison was manually checked using the Integrative Genomics Viewer (IGV) software [1].

Whole-Exome Sequencing

Whole exome sequencing (WES) was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform. Genomic DNA (2 mg) was sheared to obtain a mean fragment size of 150 bp using the Covaris E210 (KBioscience, Herts, United Kingdom) followed by library preparation using the Agilent SureSelect XT Human all exon V6 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States PN G7530-90000, protocol B4). Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, United States) to generate 100-bp paired-end reads following the manufacturer's protocols. Bioinformatics Analysis Image analysis and base calling were performed using CASAVA v1.8.2 (Illumina), and the 181,329,380 reads were mapped to the reference human genome (GRCh37/hg19) using BWA v0.7.5a [2] leading to 97.26% of the bases covered at least by 20x. GATK UG v3.2-2 was used to call SNV and indel variations [3]. Annotation and ranking of SNV and indel were performed by VaRank 1.4.3 [4] in combination with the Alamut Batch software 1.11 (Interactive Biosoftware, Rouen, France). Very stringent filtering criteria were applied to filter out non-pathogenic variants (Supplementary Table S1): (i) variants represented with an allele frequency of more than 1% in public variation databases including the 1000Genomes [5], the gnomAD database [6], the DGV database [7] or our internal database, (ii) variants in 5' and 3' UTR, downstream, upstream or intronic locations and synonymous without pathogenic prediction of local splice effect, (iii) variants not in the ciliary genes [8]. Structural variants were predicted using CANOES, including mobile element insertion using Mobster [9] and annotated by AnnotSV 2.3 [10]. The analysis was focused on compound heterozygous and homozygous variants consistent with a recessive mode of transmission. Each candidate variations were also checked using the Integrative Genomics Viewer (IGV) software [1].

Copy number variants calling

Copy number variants have been called using 7 different tools either on the WES data with CNVkit 0.9.9 [11], on the WGS data using CNVpytor 1.2.1 [12], Delly 1.1.5 [13], Lumpy 0.2.13 [14], Smoove 0.2.6 (https://github.com/brentp/smoove) based on Lumpy [14], or on both using CANOES v2 [15], Manta 1.6.0 [16] and SoftSV 1.4.2 [17]. Detection results and type of methods are summarized in Supplementary Table S5.

BBS5 Multiple Sequence Alignment and structure

Protein sequence alignment was built based on the protein sequences extracted from the metazoan orthologous group from the eggNOG database (4.5) [18] including the sequence from the 3D structure of ARL6/BBS3 (PDB: 6VBU, chain A) [19]. The alignment was visualized in Jalview (2.11.0) [20] and the 3D structure in PyMOL (1.3) [21].

			SV	
	SNV	**indel**	**CANOES**	**Mobster**
Total number of variants	94,460	15,592	10	229
After exclusion of variants with an allele frequency >1% (gnomAD, 1000G, internal exome database or DGV)	10,178	1,635	6	229
After exclusion of SNV/indel found at the homozygous state in gnomAD	4,669	695		
After exclusion of SNV/indel found at the homozygous state in our internal exome database	1,486	261		
After exclusion of SNV/indel in 5' and 3'UTR, downstream, upstream, intron and synonymous locations without local splice effect prediction	520	88		
After exclusion of missense without SIFT, PPH2 or PhastCons deleterious effect	456	88		
SV overlapping a morbid gene (OMIM)			0	57

Supplementary Table S1. Summary of the whole exome sequencing results. SNV: single nucleotide variation, indel: gain or loss of up to 50 nucleotides at a single locus, SV: structural variation. Exclusion of SV with a DGV frequency >1% is done only with studies of more than 1000 individuals.

		SV			
	SNV/Indel	**CANOES**	**SoftSV**	**Lumpy**	**Mobster**
Total number of variants	4,851,744	10	15,518	14,441	1,472
After exclusion of variant with an allele frequency >1% (gnomAD)	468,570	5	13,882	10,720	1,401
After exclusion of SNV/indel found at the homozygous state in gnomAD	240,450				
After exclusion of SNV/indel in 5' and 3'UTR, downstream, upstream, intron and synonymous locations without local splice effect prediction	837				
After exclusion of missense without SIFT, PPH2 or PhastCons deleterious effect	18				
SV overlapping a morbid gene (OMIM)		0	1348	980	116

Supplementary Table S2. Summary of the whole genome sequencing results. SNV: single nucleotide variation, indel: gain or loss of up to *50* nucleotides at a single locus, SV: structural variation. A SV with a DGV frequency >1% is excluded only with studies of more than 1000 individuals.

Application	Gene name (HGVS)	Exon	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Size (bp)
Duplex 1	*BBS5*	F1 and R1	GGCACCAGGATTCTCATACC	TGGGTCACTTGAAGTCAGGA	389/6309
	PSMC3	7 to 8	GGCGTGTCCCTGAGTTAGAG	AGGAACCACAATTTAGCACAA	603
Duplex 2	*BBS5*	F2 and R2	TGTACACTCACGTTCCTTTGTC	CAGAGAAGCAGGCTTACAACAG	663/6580
	DISC1	10	ACCCTGTACTTGGAGGTATGTG	ACCCCTGCCCTCCAATATTTGT	925
cDNA	*BBS5*	6-7 to 8	TCCAGTGATCAGGGCAATTT	TGAGAGCTTTCTATGACAAGAGC	167
	BBS5	1 to 3	ATGCCAAAGAGTGCCAGAGA	TCCGTTTCGACCTGTCCG	153
	BBS5	5-6 to 6-7	TGGCAGTACACGAGCTTATGA	TGATCAGGGCAATTTAGGAACC	164
	BBS5	9 to 9-10	GTGGTGGATATGTTCTTGGCT	CTGGGGCTTTTCTTCCATCTC	140
	GLI1	7 to 9	CTGCAGCCAGGAATTTGACT	CGAGGCGTGAGTATGACTTCC	224
	GLI2	2 to 3	AAGCAAGAAGCCAAAAGTGG	TGGTACCTTCCTTCCTGGTG	188
	GLI3	2 to 3	GGCATTTTTGGTCGAAGAGA	GGACATTCTGTGGCTGCATA	238
	SUFU	2-3 to 3	ACAGAGTCCATGAGTTTACAGG	CGTATCGTGCCAAGCCCT	138
	PTCH1	2-3 to 3	GTGGAAGTTGGAGGACGAGT	AGTCCAGGTGTTGTAGGAGC	154
	SMO	2 to 3	TGCCCAAGTGTGAGAATGAC	TACCAGCTCTTGGGGTTGTC	229
	GAPDH	4-5 to 6	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197
	HPRT	1-2 to 2-3	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	AGACGTTCAGTCCTGTCCATAA	131

Supplementary Table S3. List of primers used in this study. Two duplex PCR have been setup with 2 primers set and different control genes (i.e. *PSMC3* and *DISC1*). Size of the PCR product for the duplex depends on the presence or not of the deletion.

Application	Antibody	Species	Dilution	Reference
Western blot	Anti-β-Tubulin	Mouse	1/2500	TUB-2A2, Euromedex
	Anti-BBS5	Rabbit	1/500	14569-1-AP, Proteintech
	Anti-mouse (HRP linked) II^{ary}	Horse	1/2000	7076, Cell signaling
	Anti-rabbit (HRP linked) II^{ary}	Donkey	1/2000	7074, Cell signaling
Immunofluorescence	Anti-ARL13B	Mouse	1/500	Sc-515784, Santa cruz biotechnology
	Anti-SMO	Mouse	1/500	Sc-166685, Santa cruz biotechnology
	Anti-γ-Tubulin	Rabbit	1/500	PA5-34815, Invitrogen
	Anti-mouse (Alexa Fluor^{TM} 488) II^{ary}	Goat	1/500	A11001, Invitrogen
	Anti-rabbit (Alexa Fluor^{TM} 594) II^{ary}	Donkey	1/500	A21207, Invitrogen

Supplementary Table S4. List of antibodies used in this study.

Program	Version	Method	Analysis	Detected	Nb Events	Samples
CANOES	v2	Read depth	WES	No	4	11
CANOES	v2	Read depth	WES	Yes	8	38
CNVkit	0.9.9	Read depth	WES	No	76	38
Manta	1.6.0	Paired end/Split read	WES	No	17	38
SoftSV	1.4.2	Read depth/Split read	WES	No	2,784	38
Delly	1.1.5	Paired end/Split read	WGS	Yes	11,447	18
CANOES	v2	Read depth	WGS	No	10	18
CNVpytor	1.2.1	Read depth	WGS	No	578	18
Lumpy	0.2.13	Paired end/Split read	WGS	Yes	14,441	18
Manta	1.6.0	Paired end/Split read	WGS	Yes	11,953	18
Smoove	0.2.6	Paired end/Split read	WGS	Yes	7,195	18
SoftSV	1.4.2	Read depth/Split read	WGS	Yes	15,718	18

Supplementary Table S5. Summary of bioinformatics CNV calling on either the WES or the WGS from AII.2. Programs used for the default pipeline are highlighted in bold. Number of samples have been indicated but are relevant only regarding the read depth methods using a comparative approach including the other samples in the run.

***BBS5* variant**	**SIFT-indel**	**DDIG**	**Provean**
c.550_552dup, p.Asn184dup	Damaging (0.894)	Disease causing (83.8)	Deleterious (-9.466)

Supplementary Table S6. Prediction of the BBS5 AA duplication. The indel inframe effect was assessed using SIFT [22], DDIG [23] and Provean [24].

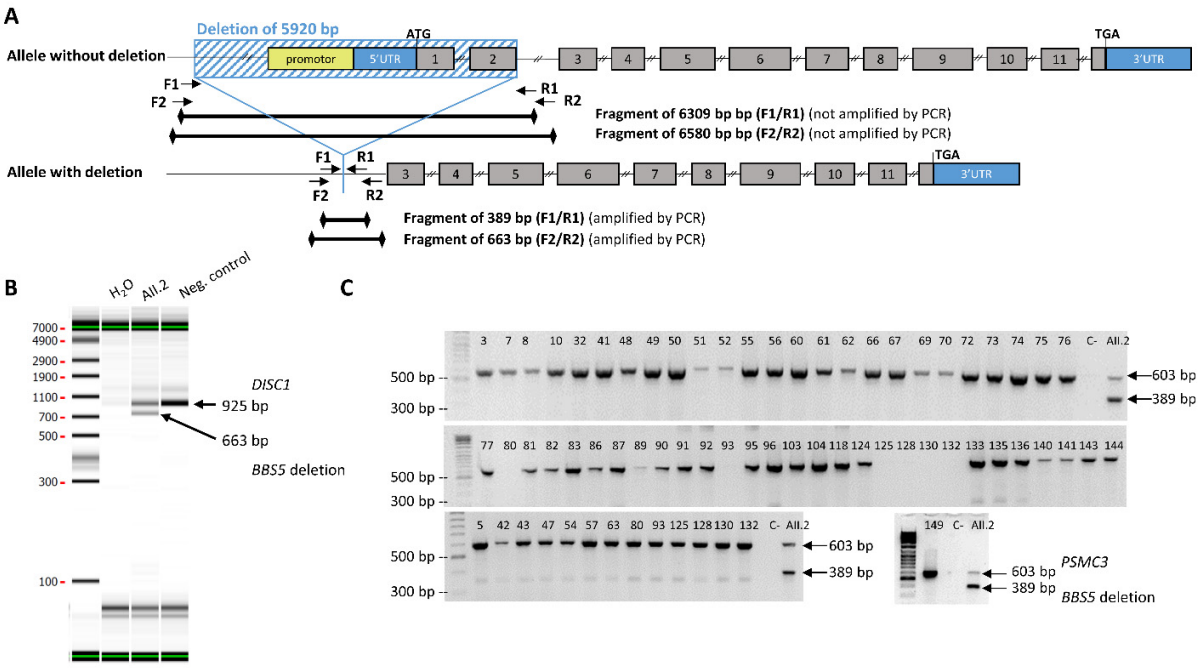
HGVS (cDNA)	HGVS (protein)	HGMD	Type	Reference
c.1A>T	p.Met1?	DM	Start loss	Muller (2010) Hum Genet
c.2T>A	p.Met1?	DM	Start loss	Harville (2010) J Med Genet
c.149T>G	p.Leu50Arg	DM	Missense	Chen (2011) Invest Ophthalmol Vis Sci
c.148C>A	p.Leu50Ile	DM?	Missense	Wang (2014) Hum Genet
c.158C>T	p.Thr53Ile	DM	Missense	Abu-Safieh (2012) Eur J Hum Genet
c.166A>G	p.Arg56Gly	DM	Missense	Muller (2010) Hum Genet
c.214G>A	p.Gly72Ser	DM	Missense	Hjortshoj (2008) Am J Med Genet A
c.412C>T	p.Arg138Cys	DM	Missense	Carss (2017) Am J Hum Genet
c.413G>A	p.Arg138His	DM	Missense	Redin (2012) J Med Genet
c.532G>A	p.Gly178Arg	DM	Missense	Shaheen (2016) Genome Biol
c.547A>G	p.Ths183Ala	DM	Missense	Hjortshoj (2008) Am J Med Genet A
c.551A>G	p.Asn184Ser	DM?	Missense	Li (2004) Cell, Carss (2017) Am J Hum Genet
c.584A>G	p.Asp195Gly	DM	Missense	Lindstrand (2016) Am J Hum Genet
c.620G>A	p.Arg207His	DM?	Missense	Li (2004) Cell
c.790G>A	p.Gly264Arg	DM	Missense	Weisschuh (2016) PLoS One
c.889G>A	p.Asp297Asn	DM?	Missense	Feuillan (2011) J Clin Endocrinol Metab
c.265C>T	p.Arg89*	DM	Nonsense	Hirano (2015) PLoS One
c.425T>G	p.Leu142*	DM	Nonsense	Chandrasekar (2018) Indian J Med Res
c.208+2T>C	p.?	DM	Splice	Imani (2019) Biosci Rep
c.522+3A>G		DM	Splice	Li (2004) Cell
c.619-27T>G		DM	Splice	Hirano (2015) PLoS One
c.619-1G>C		DM?	Splice	Feuillan (2011) J Clin Endocrinol Metab
c.900G>C	(p.Val300=)	DM	Splice	Carss (2017) Am J Hum Genet
c.123delA	p.(Gly42Glufs*11)	DM	Frameshift	Smaoui (2006) Invest Ophthalmol Vis Sci
c.734_744del11	p.(Glu245Glyfs*18)	DM	Frameshift	Maria (2016) Sci Rep
c.955_957delGAA	p.(Glu319del)	DM	Indel inframe	
c.54dupC	p.(Ala19Argfs*14)	DM	Frameshift	Feuillan (2011) J Clin Endocrinol Metab
c.966dupT	p.(Ala323Cysfs*57)	DM	Frameshift	Al-Hamed (2014) Cilia
c.263_271delTACGAGGCCinsGCTCTTA	p.(Leu88Cysfs*3)	DM	Frameshift	Li (2004) Cell
ex. 6-7, c.387-?_618+?del232		DM	CNV	Deveault (2011) Hum Mutat
ex. 9-12		DM	CNV	Nishimura (2005) Am J Hum Genet
incl. ex. 8-12		DM	CNV	Lindstrand (2016) Am J Hum Genet

Supplementary Table S7. List of known *BBS5* pathogenic variants according to the HGMD pro (2021.1). The *BBS5* reference sequence used is NM_152384.3. CNV: Copy Number Variant, DM: disease-causing mutation, "DM?": likely disease-causing mutation.

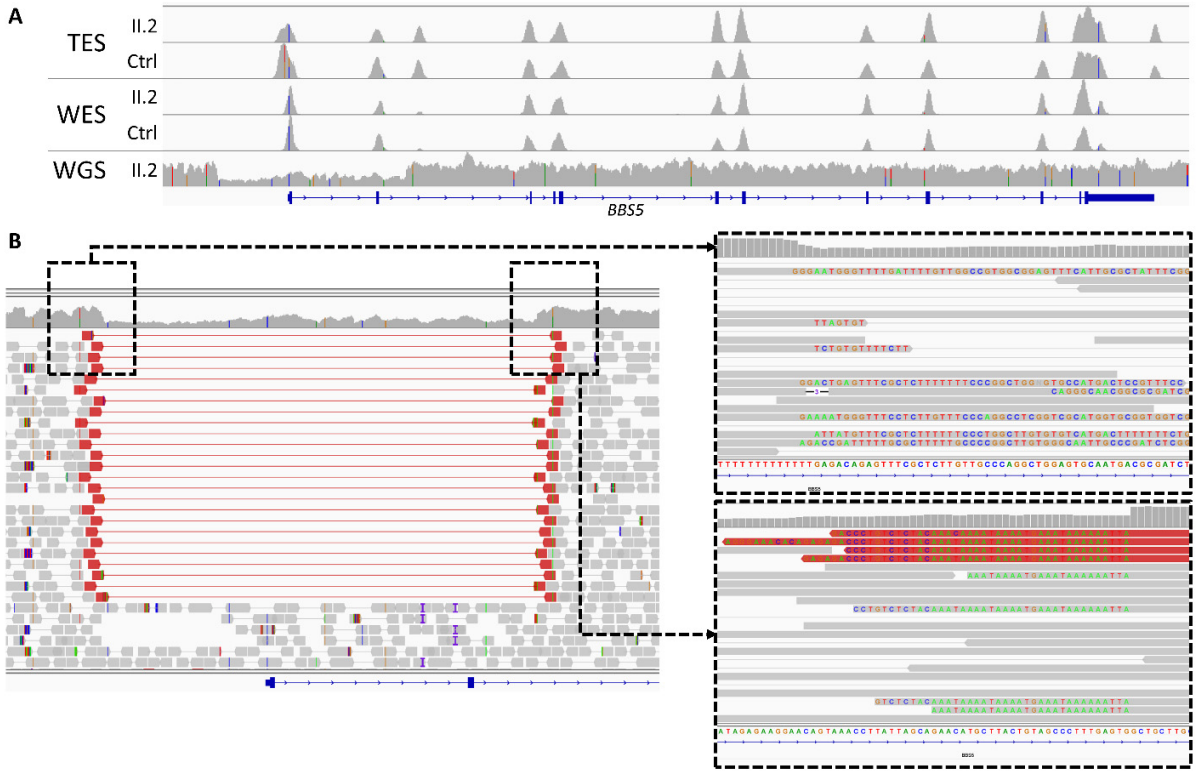
Family	#Patient	Sex	Ethnicity	Cons.	Disease	Gene	HGVS nomenclature	Type	Zygosity	RP	OB	PD	HG	RD	ID	DD	Other features	Reference	PMID
1	1	F	European	N	BBS	*BBS1*, *BBS5*	*BBS1*: c.1169TG (p.Met390Arg), del ex. 10-17, *BBS5*: c.551A>G (p.Asn184Ser) (modifier)	Missense, CNV, Missense	Het	Y	Y	Y		N	Y	N	Scoliosis, otitis media	Li (2004) Cell Lindstrand (2016) AJHG	15137946 27486776
2	1		European		BBS	*BBS5*	c.620G>A, p.(Arg207His)	Missense	Het									Li (2004) Cell	15137946
3	2		New founland		BBS	*BBS5*	c.522+3A>G	Splice										Li (2004) Cell Hjortshoj (2008) AJMG A	15137946 18203199
			New founland		BBS	*BBS5*	c.522+3A>G	Splice										Li (2004) Cell Hjortshoj (2008) AJMG A	15137946 18203199
4	1		Turkey		BBS	*BBS5*	c.263_271delins, p.(Leu88Cysfs*3)	Frameshift	Hom									Li (2004) Cell	15137946
5	1		Kurdish		BBS	*BBS5*	c.176G>A, p.(Trp59*)		Hom									Li (2004) Cell Hjortshoj (2008) AJMG A	15137946 18203199
6	3		Saudi Arabia		BBS	*BBS5*	c.181T>A/G, p.(Leu142*)		Hom									Li (2004) Cell Hjortshoj (2008) AJMG A	15137946 18203199
			Saudi Arabia		BBS	*BBS5*	c.181T>A/G, p.(Leu142*)		Hom									Li (2004) Cell Hjortshoj (2008) AJMG A	15137946 18203199
			Saudi Arabia		BBS	*BBS5*	c.181T>A/G, p.(Leu142*)		Hom									Li (2004) Cell Hjortshoj (2008) AJMG A	15137946 18203199
7	1		Turkey	Y	BBS	*BBS5*	Del ex. 9-12	CNV	Hom		Y	Y		Y				Nishimura (2005) AJHG	16380913
8	1	M	Tunisian	Y	BBS	*BBS5*	c.123delA, p.(Gly42Glufs*11)	Frameshift	Hom									Smaoui (2006) IOVS	16877420
9	4	M	Somalia	N	BBS	*BBS5*	c.214G>A, p.(Gly72Ser)	Missense	Hom									Hjortshoj (2008) AJMG A	18203199
		M	Somalia	N	BBS	*BBS5*	c.214G>A, p.(Gly72Ser)	Missense	Hom									Hjortshoj (2008) AJMG A	18203199
		M	Somalia	N	BBS	*BBS5*	c.214G>A, p.(Gly72Ser)	Missense	Hom									Hjortshoj (2008) AJMG A	18203199
		M	Somalia	N	BBS	*BBS5*	c.214G>A, p.(Gly72Ser)	Missense	Hom									Hjortshoj (2008) AJMG A	18203199
10	1	M	Sri Lanka	N	BBS	*BBS5*	c.547A>G, p.(Thr183Ala)	Missense	Hom									Hjortshoj (2008) AJMG A	18203199
11	2		North Africa		BBS	*BBS5*	c.1A>T, p.(Met1?)	Start loss	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
			North Africa		BBS	*BBS5*	c.1A>T, p.(Met1?)	Start loss	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
12	2		North Africa		BBS	*BBS5*	c.166A>G, p.(Arg56Gly)	Missense	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
			North Africa		BBS	*BBS5*	c.166A>G, p.(Arg56Gly)	Missense	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
13	5		Algeria		BBS	*BBS5*	c.123delA, p.(Lys41fs*52)	Frameshift	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
			Algeria		BBS	*BBS5*	c.123delA, p.(Lys41fs*52)	Frameshift	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
			Algeria		BBS	*BBS5*	c.123delA, p.(Lys41fs*52)	Frameshift	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
			Algeria		BBS	*BBS5*	c.123delA, p.(Lys41fs*52)	Frameshift	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
			Algeria		BBS	*BBS5*	c.123delA, p.(Lys41fs*52)	Frameshift	Hom									Muller (2010) Hum Genet	20177705
14	1		Pakistan	Y	BBS	*BBS5*	c.2T>A, p.(Met1?)	Start loss	Hom	Y	Y	Y	Y	N				Harville (2010) JMG	19797195
15	1		Pakistan	Y	BBS	*BBS5*	c.2T>A, p.(Met1?)	Start loss	Hom	Y	N	Y	Y	N				Harville (2010) JMG	19797195
16	1		Tunisian		BBS	*BBS5*	c.149T>G, p.(Leu50Arg)	Missense	Hom									Chen (2011) IOVS	21642631
17	1		European		BBS	*BBS5*	c.619–1G>C	Splice	Hom									Chen (2011) IOVS	21642631
18	1				BBS	*BBS5*	c.889G>A, p.(Asp297Asn)	Missense	Het		Y						Hyperleptinemia	Feuillan (2011) JCEM	21209035
19	1				BBS	*BBS5*	c.619-1G>C	Splice	Het		Y						Hyperleptinemia	Feuillan (2011) JCEM	21209035
20	1				BBS	*BBS5*	c.54dupC (p.Ala19Argfs*14)), c.619-1G>C	Frameshift, splice	Comp. Het		Y						Hyperleptinemia	Feuillan (2011) JCEM	21209035
21	1	F	Jordanian	Y	BBS	*BBS5*	Del ex. 6-7	CNV	Hom	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Asthma, dislipidemia, teeth crowding, sleep apnea	Deveault (2011) Hum Mutat	21344540
22	1	M	Somalia	Y	BBS	*BBS5*	c.214G>A, p.(Gly72Ser)	Missense	Hom	Y	Y	Y		N	N	Y	Liver structure anomaly, psychosis, teeth crowding, small genitalia	Deveault (2011) Hum Mutat	21344540
23	1		Arabe	Y	BBS	*BBS5*, *BBS1*, *BBS9*	BBS5: c.158C>T, p.(Thr53Ile) BBS1: c.1684G>A, p.(Asp562Asn) BBS9: c.1693+102G>A	Missense Missense Splice?	Hom	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Atopy, Typical facies	Abu-Safieh (2012) EJHG	22353939
24	1		Arabe	Y	BBS	*BBS1*, *BBS5*, *BBS4*, *CEP290*	BBS1:c.124+1G>A (p.(Leu43Glyfs*44)), c.951+58C>T BBS5: c.132T>G, p.(Asn44Lys) (modifier) BBS4: c.221-37G>A CEP290: c.6271-113T>C	Splice Missense	Het	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Typical facies	Abu-Safieh (2010) JMG Abu-Safieh (2012) EJHG	19858128 22353939
25	1		France	N	BBS	*BBS5*	c.413G>A, (p.(Arg138His))	Missense		Y	N	Y	Y	N	Y	N	Atopy, typical facies	Redin (2012) JMG	22773737
26	1				RP	*BBS5*	c.148C>A, p.(Leu50Ile)	Missense	Hom	Y	N	N	N	N	N	N		Wang (2014) Hum Genet	24154662
27	3		Saudi Arabia	Y	BBS	*BBS5*	c.966dupT, p.(Ala323Cysfs*57)	Frameshift	Hom	Y	Y	Y	N	Y	Y	N	Hydronephrosis, enlarged fatty liver, typical facies	Al-Hamed (2014) Cilia Shaheen (2016) Genome Biol	24559376 27894351

			Saudi Arabia	Y	BBS	*BBS5*	c.966dupT, p.(Ala323Cysfs*57)	Frameshift	Hom	N	Y	Y	N	Y	Y	N	Fatty liver, typical facies, atopy	Al-Hamed (2014) Cilia Shaheen (2016) Genome Biol	24559376 27894351
			Saudi Arabia	Y	BBS	*BBS5*	c.966dupT, p.(Ala323Cysfs*57)	Frameshift	Hom	N	Y	N	N	Y	Y	N	Hydronephrosis, fatty liver, typical facies, atopy	Al-Hamed (2014) Cilia Shaheen (2016) Genome Biol	24559376 27894351
28	2	M	Japenese	N	BBS	*BBS5*	c.265C>T (p.Arg89*), c.619-27T>G	Nonsense, Splice	Comp. Het	N	Y	N	Y	N	Y	N	Esophageal, gastric and rectal varices, liver fibrosis	Hirano (2015) PLoS One	26325687
		M	Japenese	N	BBS	*BBS5*	c.265C>T (p.Arg89*), c.619-27T>G	Nonsense, Splice	Comp. Het	N	Y	Y	Y	N	Y	N		Hirano (2015) PLoS One	26325687
29	1	M	European	N	BBS	*BBS1, BBS5*	BBS1: c.1645G>T (p.Glu549*), del ex. 1-11, *BBS5*: c.584A>G (p.Asp195Gly) (modifier)	CNV, frameshift Missense	Het	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Scoliosis, otitis media	Lindstrand (2016) AJHG	27486776
30	1	M	European	N	BBS	*BBS10, BBS5*	*BBS10*:c.2119_2120delGT (p.Val707*) hom *BBS5*: incl. ex. 8-12	CNV CNV	Het	Y	Y	Y		Y	Y		Seizures, sleep apnea	Lindstrand (2016) AJHG	27486776
31	1			Y	BBS	*BBS5*	c.966dupT, p.(Ala323Cysfs*57)	Frameshift	Hom	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Grade 4 bilateral hydronephrosis, small trabeculated bladder	Shaheen (2016) Genome Biol	27894351
32	1			Y	BBS	*BBS5*	c.966dupT, p.(Ala323Cysfs*57)	Frameshift	Hom	Y	Y	N	N	N	N	N	Brachydactyly, atopy, asthma, hypogenitalism, typical facies	Shaheen (2016) Genome Biol	27894351
33	2			Y	BBS	*BBS5*	c.966dupT, p.(Ala323Cysfs*57)	Frameshift	Hom	N	Y	N	N	N	Y	N	Acanthosis nigricans, macrocephaly, poor vision	Shaheen (2016) Genome Biol	27894351
				Y	BBS	*BBS5*	c.966dupT, p.(Ala323Cysfs*57)	Frameshift	Hom	N	Y	N	N	N	Y	N	Acanthosis nigricans, macrocephaly, poor vision	Shaheen (2016) Genome Biol	27894351
34	1			Y	BBS	*BBS5*	c.966dupT, p.(Ala323Cysfs*57)	Frameshift	Hom	N	Y	N	Y	N	Y	N		Shaheen (2016) Genome Biol	27894351
35	2	M	Pakistani	Y	BBS	*BBS5*	c.734_744del11, p.(Glu245Glyfs*18)	Frameshift	Hom	Y	N	Y	Y	Y	Y	N	Hypodontia, syndactyly, brachydactyly, ataxia, speech disability, gall bladder calculi, mild spleno- and hepatomegaly, elevated liver enzymes, abnormally high cholesterol level	Maria (2016) Sci Rep	27708425
		M	Pakistani	Y	BBS	*BBS5*	c.734_744del11, p.(Glu245Glyfs*18)	Frameshift	Hom	Y	N	N	Y	Y	Y	N	Speech disability	Maria (2016) Sci Rep	27708425
36	1	F	Pakistani	Y	BBS	*BBS5*	c.734_744del11, p.(Glu245Glyfs*18)	Frameshift	Hom	Y	N	Y	Y	N	N	Y	Irregular menstruation, low progesterone levels, diabetes, borderline hepatomegaly with fatty infiltration, abnormally high cholesterol level, elevated liver enzymes	Maria (2016) Sci Rep	27708425
37	2				BBS	*BBS5*	c.790G>A, p.(Gly264Arg)	Missense	Hom	N	Y	N	N	N	N		Achromatopsia in childhood	Weisschuh (2016) PLoS One	26766544
					BBS	*BBS5*	c.790G>A, p.(Gly264Arg)	Missense	Hom	N	Y	N	N	N	N		Achromatopsia in childhood	Weisschuh (2016) PLoS One	26766544
38	2			Y		*BBS5*	c.532G>A, p.(Gly178Arg)	Missense	Hom	Y	Y	N	N	N	N	Y		Shaheen (2016) Genome Biol	27894351
				Y		*BBS5*	c.532G>A, p.(Gly178Arg)	Missense	Hom	N	Y	N	N	N	N	Y	Nystagmus, poor vision, sleep apnea, delayed myelination	Shaheen (2016) Genome Biol	27894351
39	1			Y		*BBS5*	c.1A>T, p.?	Start loss	Hom	N	Y	Y	N	Y	N	N		Shaheen (2016) Genome Biol	27894351
40	1				BBS	*BBS5*	c.955_957delGAA, p.(Glu319del)	Indel inframe	Hom			Y				Y	Small testis, CHD, ADHD, dysmorphic facies, echogenic kidneys, cleft lip, normal brain MRI, echogenic kidney	Patel (2016) Genet Med Shaheen (2016) Genome Biol	26355662 27894351
41	1	F			CD	*BBS5*	c.900G>C, p.(Val300=)	Splice	Het	Y	N	N	N	N	N	N		Carss (2017) AJHG	28041643
42	1	F			CD	*BBS5*	c.412C>T, p.(Arg138Cys)	Missense	Het	Y	N	N	N	N	N	N		Carss (2017) AJHG	28041643
43	1	F			CD	*BBS5*	c.551A>G, p.(Asn184Ser)	Missense	Het	Y	N	N	N	N	N	N		Carss (2017) AJHG	28041643
44	1	M	Indian	N	BBS	*BBS5*	c.425T>G, p.(Leu142*)	Nonsense	Hom									Chandrasekar (2018) IJMR	29806606
45	2	M	Iranian	N	BBS	*BBS5*	c.208+2T>C	Splice	Hom	Y	Y	N	Y	N	N	N	Speech disability, dental anomaly, attenuated arterioles, pale optic disc, night blindness	Imani (2019) Biosci Rep	30850397
		F	Iranian	N	BBS	*BBS5*	c.208+2T>C	Splice	Hom	Y	Y	N	N	Y	N	N	Posterior subcapsular cataract, digestion problem, attenuated arterioles, pale optic disc, bone spicules, macular atrophy, night blindness	Imani (2019) Biosci Rep	30850397

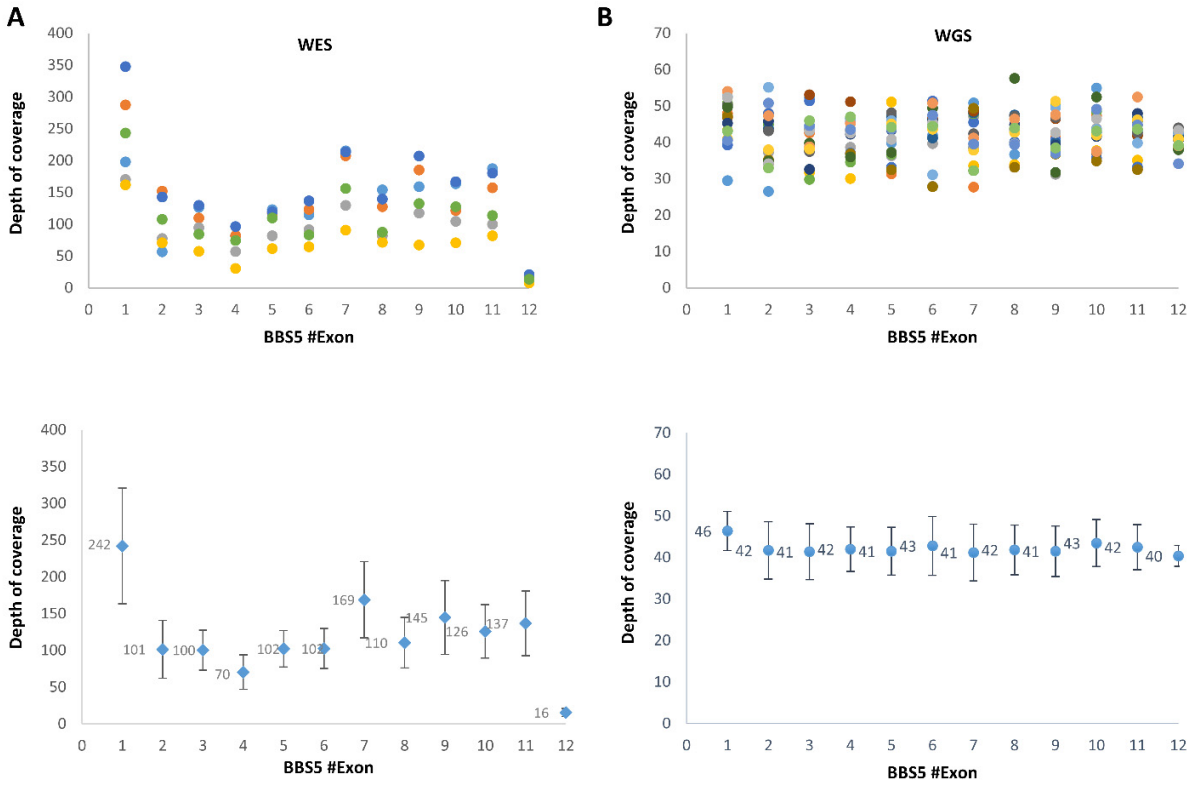
Supplementary Table S8. List of known *BBS5* cases with pathogenic variants organized as case according to the HGMD pro (2021.1). The *BBS5* reference sequence used is NM_152384.3. When multiple gene are indicated in the gene column, the first one is considered as the primary driver gene. CNV: Copy Number Variant, Hom: homozygous, Het: heterozygous, Comp. het: compound heterozygous, CD: Cone dystrophy, RP: Retinitis pigmentosa, Ob: Obesity, PD: Polydactyly,HG: Hypogonadism, RD: Renal disease, ID: Intellectual disability DD: Developmental delay, CHD: Congenital heart disease, ADHD: Attention deficit hyperactivity disorder.



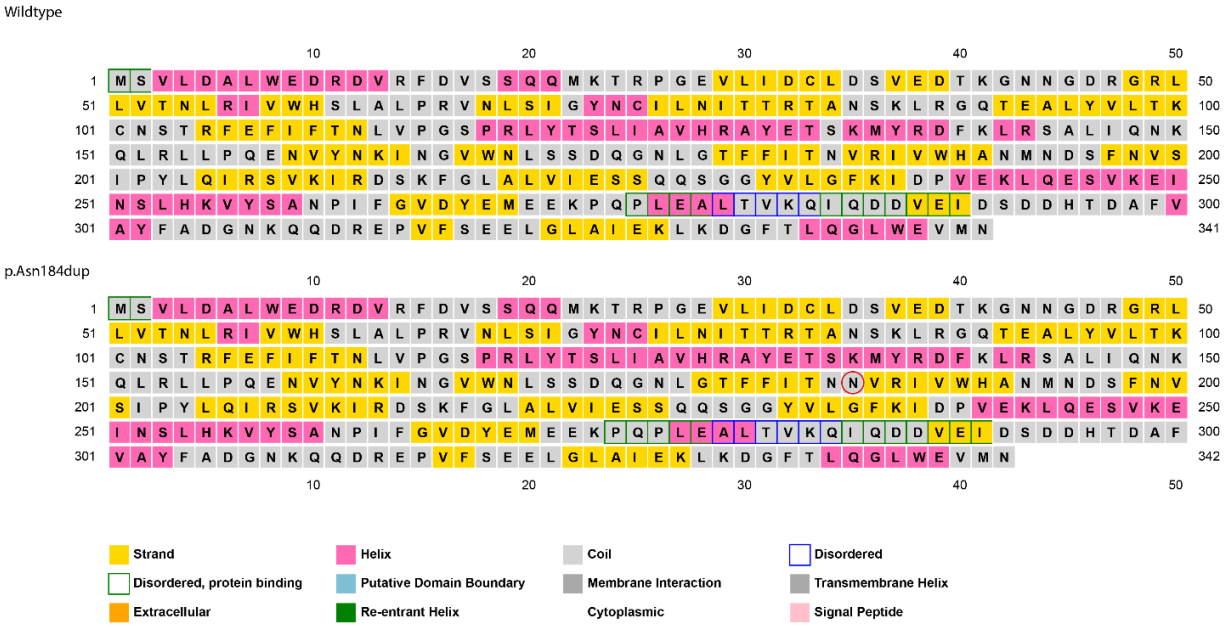
Supplementary Figure S1. Cohort screening for the *BBS5* deletion. **A.** Presentation of the primers positions on *BBS5* for Duplex 1 and 2 designed for the detection of the deletion of exons 1 and 2. **B.** Example of PCR profiles for Duplex 2 on a LabChip GX (Perkin Elmer) for a rapid detection of the *BBS5* deletion (see for primers details). Normal samples harbour a single band (*DISC1*) whereas homozygous or heterozygous carriers for the tandem duplication show an additional band specific for the duplication breakpoint. **C.** Results of the Duplex 1 PCR performed on 62 BBS negative samples out of 284. Except for the index case, the deletion was not found in any other patient.



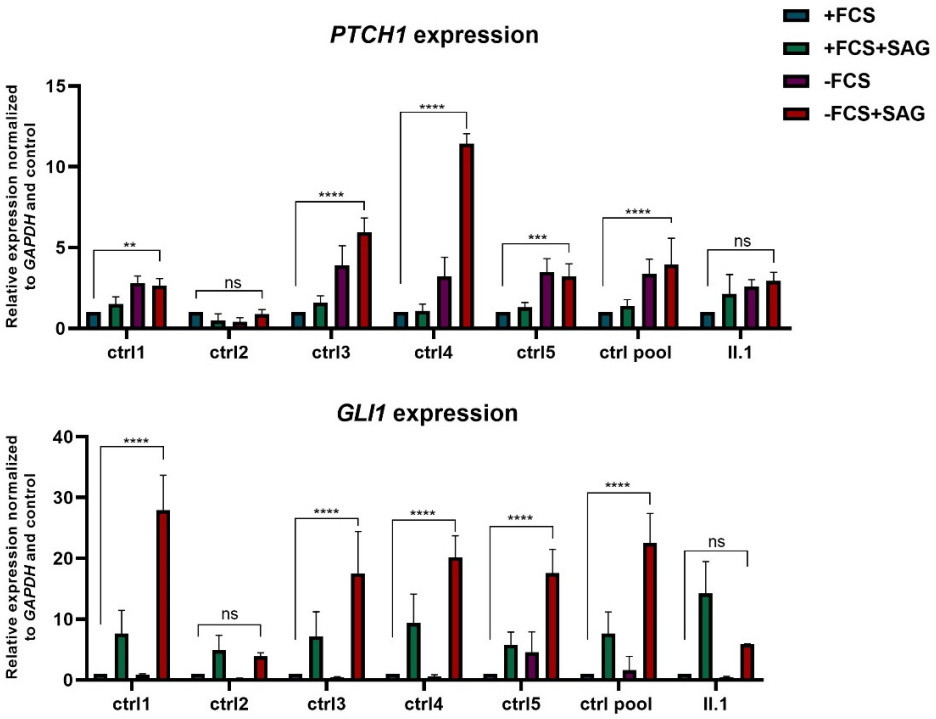
Supplementary Figure S2. *BBS5* large heterozygous deletion. **A.** Comparison of the *BBS5* depth of coverage for patient II.2 and a control using either the BBS gene panel (TES), whole exome sequencing (WES) or whole genome sequencing (WGS) using IGV. **B.** Highlight of the split reads on each side of the deletion displaying the breakpoint of the 5,918 bp heterozygous deletion of exons 1 and 2 of *BBS5*.



Supplementary Figure S3. Distribution of the depth of coverage (upper panels) and the mean and its standard deviation (lower panels) for each exon of *BBS5* for 6 WES from the same sequencing run (A.) and for 18 WGS (B.). Depth of coverage was computed using the DepthOfCoverage command from GenomeAnalysisTK-3.4-46 and the GRCh37 reference coordinates for the *BBS5* gene (NM_152384.3).



Supplementary Figure S4. Secondary structure prediction. PSIPRED [25] was applied to assess whether the p.Asn184dup (panel below, duplication is highlighted by a red circle) might affect the secondary structure of BBS5.



Supplementary Figure S5. Assessment of Hh-signal transduction by quantification of the induction of two Hh target genes *PTCH1* and *GLI1* on Hh-stimulated cells from controls and the patient in four different conditions, with and without inducing ciliogenesis (+/- FCS) and Hh activation (+/- SAG). The expression of both genes is normally induced in controls except in control 2, whereas no induction is found in the patient test. The expression data performed with biological triplicates were normalized to the reference gene *GAPDH* mRNA expression data, and the values were presented as relative expression levels +- SEM). *p*-values and significance were determined using 2-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ns: non significant, **p<0.01 ****p<0.0001.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Thorvaldsdóttir, H.; Robinson, J.T.; Mesirov, J.P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-Performance Genomics Data Visualization and Exploration. *Briefings in Bioinformatics* **2012**, *14*, 178–192, doi:10.1093/bib/bbs017.
2. Li, H.; Durbin, R. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows–Wheeler Transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760, doi:10.1093/bioinformatics/btp324.
3. 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. A Framework for Variation Discovery and Genotyping Using Next-Generation DNA Sequencing Data. *Nature Genetics* **2011**, *43*, 491–498, doi:10.1038/ng.806.
4. Geoffroy, V.; Pizot, C.; Redin, C.; Piton, A.; Vasli, N.; Stoetzel, C.; Blavier, A.; Laporte, J.; Muller, J. VaRank: A Simple and Powerful Tool for Ranking Genetic Variants. *PeerJ* **2015**, *3*, e796, doi:10.7717/peerj.796.
5. The 1000 Genomes Project Consortium; Gibbs, R.A.; Boerwinkle, E.; Doddapaneni, H.; Han, Y.; Korchina, V.; Kovar, C.; Lee, S.; Muzny, D.; Reid, J.G.; et al. A Global Reference for Human Genetic Variation. *Nature* **2015**, *526*, 68–74, doi:10.1038/nature15393.
6. Lek, M.; Karczewski, K.J.; Minikel, E.V.; Samocha, K.E.; Banks, E.; Fennell, T.; O'Donnell-Luria, A.H.; Ware, J.S.; Hill, A.J.; Cummings, B.B.; et al. Analysis of Protein-Coding Genetic Variation in 60,706 Humans. *Nature* **2016**, *536*, 285-+, doi:10.1038/nature19057.
7. MacDonald, J.R.; Ziman, R.; Yuen, R.K.C.; Feuk, L.; Scherer, S.W. The Database of Genomic Variants: A Curated Collection of Structural Variation in the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D986-992, doi:10.1093/nar/gkt958.
8. Nevers, Y.; Prasad, M.K.; Poidevin, L.; Chennen, K.; Allot, A.; Kress, A.; Ripp, R.; Thompson, J.D.; Dollfus, H.; Poch, O.; et al. Insights into Ciliary Genes and Evolution from Multi-Level Phylogenetic Profiling. *Molecular Biology and Evolution* **2017**, *34*, 2016–2034, doi:10.1093/molbev/msx146.
9. Thung, D.T.; de Ligt, J.; Vissers, L.E.; Steehouwer, M.; Kroon, M.; de Vries, P.; Slagboom, E.P.; Ye, K.; Veltman, J.A.; Hehir-Kwa, J.Y. Mobster: Accurate Detection of Mobile Element Insertions in next Generation Sequencing Data. *Genome Biology* **2014**, *15*, 488, doi:10.1186/s13059-014-0488-x.
10. Geoffroy, V.; Herenger, Y.; Kress, A.; Stoetzel, C.; Piton, A.; Dollfus, H.; Muller, J. AnnotSV: An Integrated Tool for Structural Variations Annotation. *Bioinformatics* **2018**, doi:10.1093/bioinformatics/bty304.
11. Talevich, E.; Shain, A.H.; Botton, T.; Bastian, B.C. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLOS Computational Biology* **2016**, *12*, e1004873, doi:10.1371/journal.pcbi.1004873.
12. Suvakov, M.; Panda, A.; Diesh, C.; Holmes, I.; Abyzov, A. CNVpytor: A Tool for Copy Number Variation Detection and Analysis from Read Depth and Allele Imbalance in Whole-Genome Sequencing. *Gigascience* **2021**, *10*, giab074, doi:10.1093/gigascience/giab074.
13. Rausch, T.; Zichner, T.; Schlattl, A.; Stütz, A.M.; Benes, V.; Korbel, J.O. DELLY: Structural Variant Discovery by Integrated Paired-End and Split-Read Analysis. *Bioinformatics* **2012**, *28*, i333–i339, doi:10.1093/bioinformatics/bts378.
14. Layer, R.M.; Chiang, C.; Quinlan, A.R.; Hall, I.M. LUMPY: A Probabilistic Framework for Structural Variant Discovery. *Genome Biol* **2014**, *15*, R84, doi:10.1186/gb-2014-15-6-r84.
15. Backenroth, D.; Homsy, J.; Murillo, L.R.; Glessner, J.; Lin, E.; Brueckner, M.; Lifton, R.; Goldmuntz, E.; Chung, W.K.; Shen, Y.F. CANOES: Detecting Rare Copy Number Variants from Whole Exome Sequencing Data. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, doi:10.1093/nar/gku345.

16. Chen, X.; Schulz-Trieglaff, O.; Shaw, R.; Barnes, B.; Schlesinger, F.; Källberg, M.; Cox, A.J.; Kruglyak, S.; Saunders, C.T. Manta: Rapid Detection of Structural Variants and Indels for Germline and Cancer Sequencing Applications. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 1220–1222, doi:10.1093/bioinformatics/btv710.
17. Bartenhagen, C.; Dugas, M. Robust and Exact Structural Variation Detection with Paired-End and Soft-Clipped Alignments: SoftSV Compared with Eight Algorithms. *Briefings in Bioinformatics* **2016**, *17*, 51–62, doi:10.1093/bib/bbv028.
18. Huerta-Cepas, J.; Szklarczyk, D.; Forslund, K.; Cook, H.; Heller, D.; Walter, M.C.; Rattei, T.; Mende, D.R.; Sunagawa, S.; Kuhn, M.; et al. EggNOG 4.5: A Hierarchical Orthology Framework with Improved Functional Annotations for Eukaryotic, Prokaryotic and Viral Sequences. *Nucleic Acids Research* **2015**, *44*, D286–D293, doi:10.1093/nar/gkv1248.
19. Singh, S.K.; Gui, M.; Koh, F.; Yip, M.C.; Brown, A. Structure and Activation Mechanism of the BBSome Membrane Protein Trafficking Complex. *Elife* **2020**, *9*, doi:10.7554/eLife.53322.
20. Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.A.; Clamp, M.; Barton, G.J. Jalview Version 2--a Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1189–1191, doi:10.1093/bioinformatics/btp033.
21. Schrödinger, LLC The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 2015.
22. Hu, J.; Ng, P.C. SIFT Indel: Predictions for the Functional Effects of Amino Acid Insertions/Deletions in Proteins. *PLoS One* **2013**, *8*, e77940, doi:10.1371/journal.pone.0077940.
23. Zhao, H.; Yang, Y.; Lin, H.; Zhang, X.; Mort, M.; Cooper, D.N.; Liu, Y.; Zhou, Y. DDIG-in: Discriminating between Disease-Associated and Neutral Non-Frameshifting Micro-Indels. *Genome Biology* **2013**, *14*, R23, doi:10.1186/gb-2013-14-3-r23.
24. Choi, Y.; Chan, A.P. PROVEAN Web Server: A Tool to Predict the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2745–2747, doi:10.1093/bioinformatics/btv195.
25. Buchan, D.W.A.; Jones, D.T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 Years On. *Nucleic Acids Research* **2019**, *47*, W402–W407, doi:10.1093/nar/gkz297.

IV. Données supplémentaires non publiées

A. Etude de la voie SHH au niveau protéique

1. Quantification de GLI2 et PTCH1 par WB

Pour étudier la voie SHH au niveau protéique je me suis intéressée à la quantification des deux protéines GLI2 et PTCH1. GLI2 est un facteur de transcription activateur qui suite à la stimulation de la voie subit une translocation nucléaire pour activer la transcription des gènes cibles de la voie SHH. PTCH1 est un récepteur transmembranaire qui est recruté à la membrane plasmique permettant la fixation du ligand SHH pour activer la voie SHH (Figure 28A). Etant donné que les deux protéines subissent des translocations d'un compartiment cellulaire vers un autre, PTCH1 du cytoplasme à la membrane plasmique et GLI2 du cytoplasme au noyau, nous avons cherché à quantifier leur présence dans chacun de ses compartiments séparément en appliquant un protocole d'extraction différentielle de protéines. J'ai testé 4 protocoles avant de pourvoir identifier celui qui a permis l'obtention des fractions suivantes : cytoplasmique, membranaire et nucléaire pures (Figure 28B).

- GLI2

Le but est de quantifier cette protéine dans le cytoplasme (GLI2C) et le noyau (GLI2N) pour établir le rapport GLI2C/GLI2N avec et sans activation de la voie SHH pour évaluer ainsi la translocation nucléaire de GLI2 suite à la stimulation de la voie dans des cellules contrôles et ceux de patients. Normalement, GLI2C>GLI2N en condition -SVF/+SAG. On notera que GLI2 possède plusieurs isoformes, c'est une protéine qui s'active par clivage protéolytique et seul la forme active subit la translocation nucléaire. Plus précisément, elle possède un domaine répresseur en N-terminal qui doit être clivé pour qu'elle puisse jouer le rôle d'activateur et un domaine activateur en C-terminal qui doit être clivé pour qu'elle puisse jouer le rôle de répresseur.

Le résultat du WB avec le dépôt de 100µg montre plusieurs bandes cytoplasmiques de GLI2 et une seule bande nucléaire confirmant ainsi cette information. C'est un résultat préliminaire qui a été obtenu après avoir testé trois anticorps différents afin d'avoir un marquage spécifique de GLI2. En plus le marquage de GLI2 n'est observé qu'avec un dépôt important de protéine qui est de 100µg (Figure 28C).

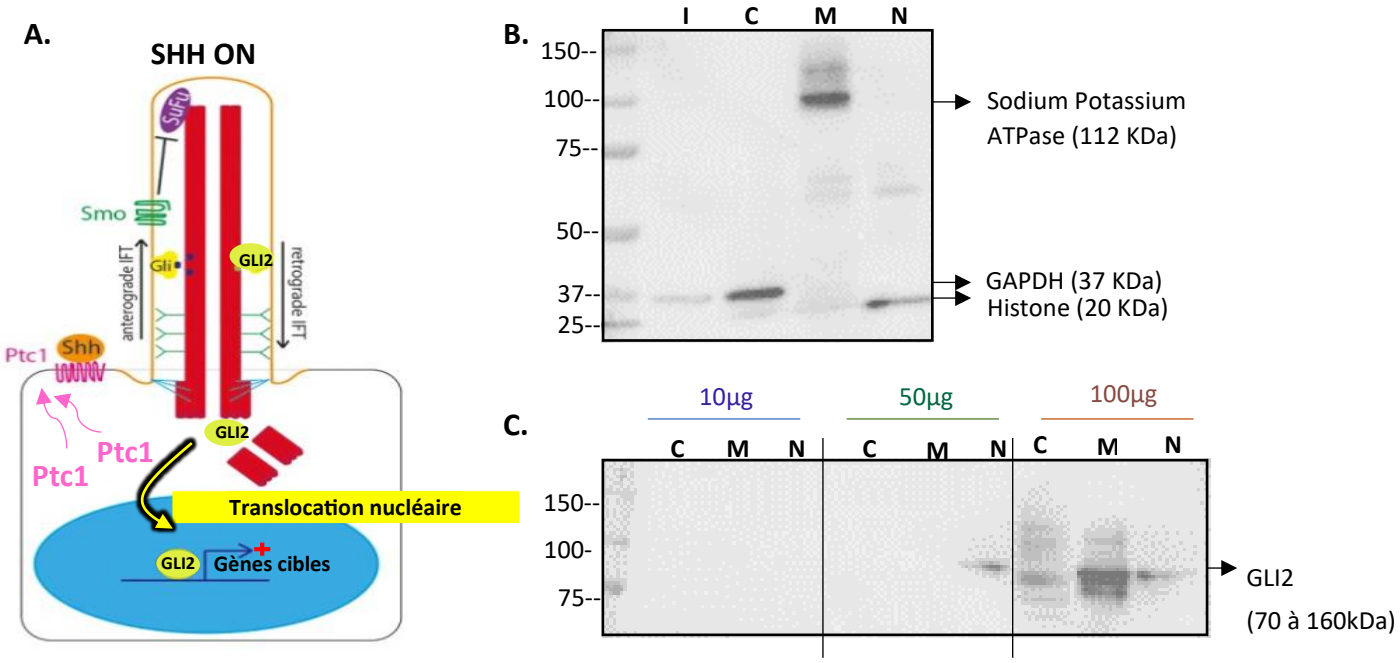


Figure 28 : Extraction différentielle de protéines et quantification de GLI2. A. Représentation schématique du recrutement membranaire de PTCH1 et de la translocation nucléaire de GLI2 quand la voie SHH et « ON ». **B.** Membrane d'un western blot présentant les dépôts protéiques de chaque compartiment séparément (I : input, C : cytoplasme, M : membrane, N : noyau). Un cocktail d'anticorps a été utilisé pour marquer une protéine spécifique à chacune des fractions cellulaires. **C.** Membrane d'un WB présentant un dépôt croissant de protéines (10, 50 et 100µg) dans les trois compartiments extraits à partir de cellules cultivées en conditions (-SVF+SAG).

Cette grande quantité de protéines (100µg) nécessaire pour observer GLI2 est facile à obtenir à partir des cellules HEK qui prolifèrent très rapidement et en grande quantité, ce qui n'est pas le cas des fibroblastes de peau qui prolifèrent plus lentement. Cette expérience nécessitera des tests supplémentaires afin de pouvoir l'appliquer de manière robuste et routinière sur les fibroblastes cutanés humains.

- <u>PTCH1</u>

PCTH1 est un récepteur transmembranaire qui est recruté à la membrane plasmique pour permettre la fixation du ligand SHH, l'activateur de la voie SHH. Le but de cette expérience est de quantifier la fraction de PTCH1 membranaire dans deux conditions +SVF et -SVF/+SAG pour voir d'abord si le recrutement membranaire augmente en activant la voie SHH et par la suite comparer ce recrutement entre des cellules normales et des cellules où la voie SHH est beaucoup moins active comme c'est le cas chez la patiente *BBS5*. Dans ce cas l'hypothèse posée est que la fraction membranaire de PTCH1 chez les contrôles doit être supérieure à celle chez la patiente BBS5 (ctrl PTCH1(M) -/+ > BBS5 (M) PTCH1 -/+).

Le résultat de la quantification de PTCH1 en normalisant par rapport à la protéine de référence ubiquitaire (du dépôt) la béta-tubuline ne montre aucune différence significative des fractions

membranaires de PTCH1 entre le contrôle et la patiente. Le résultat de la quantification de PTCH1 après normalisation par rapport à la protéine de référence membranaire, à savoir l'ATPase, montre une légère diminution du recrutement de PCTH1 membranaire chez la patiente par rapport aux deux contrôles (Figure 29B).

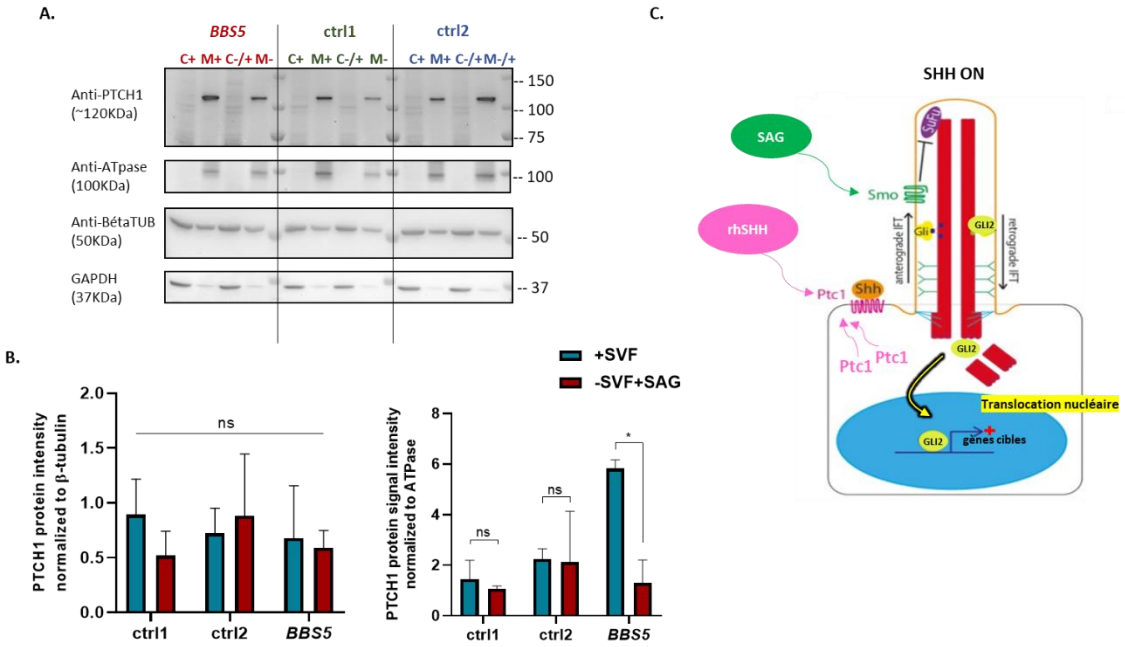


Figure 29 : Quantification de PTCH1. A. Membrane d'un WB présentant les dépôts des protéiques cytoplasmiques (C) et membranaires (M) extraites à partir des fibroblastes cutanés de la patiente *BBS5* et de deux contrôles en deux conditions de culture +SVF et –SVF/+SAG. **B.** Graphique présentant la quantification des bandes de la protéines PTCH1 normalisé par rapport à une protéine cytoplasmique la béta-tubuline et une protéine membranaire l'ATPase. La quantification du WB est réalisée avec ImageJ, les graphiques et les tests statistiques avec le logiciel Graphpad Prism. Les valeurs *p* sont déterminées à l'aide d'un test ANOVA à deux voies (test de comparaison multiple de Tukey). ns : non significatif, *p<0,1. **C.** Représentation du mode d'action du SAG et de rhSHH dans l'activation de la voie SHH.

Il est normalement attendu une augmentation significative du recrutement de PTCH1 à la membrane chez les contrôles en condition d'activation de la voie SHH (-SVF/+SAG), ce qui n'est pas le cas.

En cherchant à comprendre le résultat, je me suis rendue compte que l'activation de la voie avec le ligand SAG (qui est un SMO Agoniste) se fait en se fixant directement sur SMO sans passer par PCTH1. Avec ce réactif nous allons donc court-circuiter le rôle de PCTH1, ce qui explique nos résultats à priori discordant.

Nous pouvons en conclure que pour étudier le changement du recrutement membranaire de PCTH1 il ne faut pas utiliser SMO mais un autre ligand tel que le rhSHH qui vas se fixer

directement sur PCTH1 et activer la voie dès le début de la cascade de signalisation (Figure 29C).

Cet exemple montre l'intérêt de la bonne compréhension des différentes étapes d'une voie de signalisation et du mode d'action d'un réactif activateur ou répresseur, c'est-à-dire à quelle étape de la cascade va-t-il intervenir pour stimuler l'activation ou la répression de la voie.

2. Translocation de SMO dans le cil

Une des expériences permettant d'étudier la voie SHH au niveau protéique est d'évaluer la translocation de SMO dans le cil par immunofluorescence. Pour le faire il faut stimuler la voie par un traitement des cellules avec le ligand rhSHH qui active la voie dès le début de la cascade de signalisation en se fixant sur PTCH1 qui va libérer SMO qui à son tour va subir une translocation ciliaire.

D'abord, j'ai testé le ligand en traitant les fibroblastes contrôle avec 3 concentrations différentes de rhSHH (10, 50 et 100ng/ml) et j'ai réalisé des RT-qPCR pour quantifier les deux gène cibles de la voie *PTCH1* et *GLI1* afin de déterminer la concentration minimale qui permettra d'activer la voie. Les résultats montrent qu'avec les deux concentrations 100 et 50ng/ml le niveau d'expression de PTCH1 et GLI1 augmente significativement après le traitement, ce qui n'est pas le cas avec la concentration la plus faible (10ng/ml) (Figure 30A). Le ligand est ainsi validé et la concentration minimale suffisante pour activer la voie SHH est de 50ng/ml.

Ensuite j'ai testé le ligand pour les expériences d'IF pour étudier la translocation de SMO. J'ai réalisé les IF dans des plaques 24 puits, sur des fibroblastes cultivés en condition -SVF seulement et d'autres en condition -SVF/+rhSHH (50 et 100ng/ml) pendant 48H. Le résultat montre la translocation de SMO dans le cil suite au traitement par rhSHH (Figure 30B).

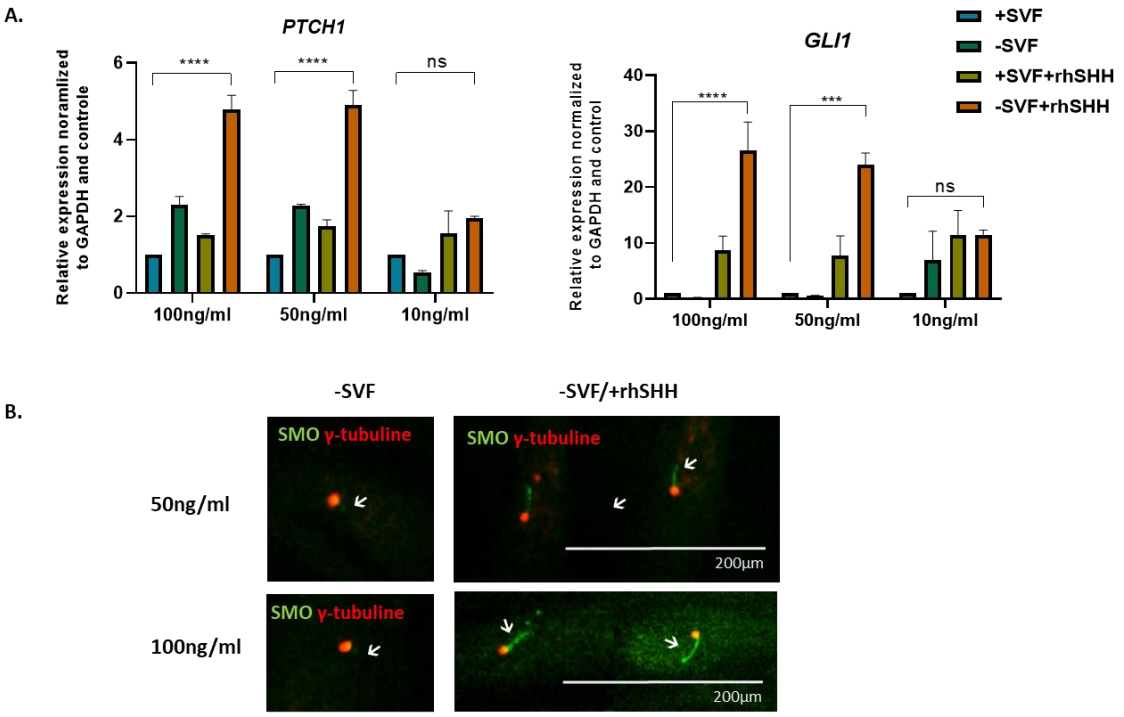


Figure 30 : Activation de la voie SHH avec le ligand rhSHH. A. Niveau d'expression de *PTCH1* et *GLI1* dans les fibroblastes cutanés d'un contrôle dans 4 conditions différentes. Les données d'expression sont normalisées par rapport au gène de référence *GAPDH*, et les valeurs sont présentées comme des niveaux d'expression relative +- SEM. Les valeurs *p* sont déterminées à l'aide d'un test ANOVA à deux voies (test de comparaison multiple de Tukey). ns : non significatif, ***p<0,001 ****p<0,0001. **B.** Images des IF réalisées sur des fibroblastes dans deux conditions (-SVF et –SVF/+rhSHH), le corps basal est marqué avec un anti-γ-tubuline et SMO avec un anti-SMO. Les images sont prises avec Incucyte (objectif 20X).

Pour cette expérience, l'acquisition d'images a été réalisée avec un Incucyte ayant un objectif maximal de 20X. Pour pouvoir évaluer un changement de translocation ciliaire de SMO entre des cellules contrôles et celle du patient présentant une anomalie de la voie SHH, il va falloir étudier cette translocation en mesurant l'intensité de translocation de SMO dans le cil de plusieurs cellules pour faire des statistiques. Pour avoir cette mesure, il faut que les images soient plus résolutives et faut donc faire les IF sur des lames permettant de faire l'acquisition des images avec un microscope à fluorescence à objectif 40X ou 60X et traiter par la suite les images avec un logiciel comme ImageJ ou Imaris permettant de mesurer la fluorescence du marquage de SMO dans le cil.

B. Test de prolifération cellulaire

Le résultat du test de prolifération cellulaire des fibroblastes contrôle et ceux de la patiente *BBS5* réalisées sur 6 jours ne montre aucune différence significative de prolifération (Figure 31).

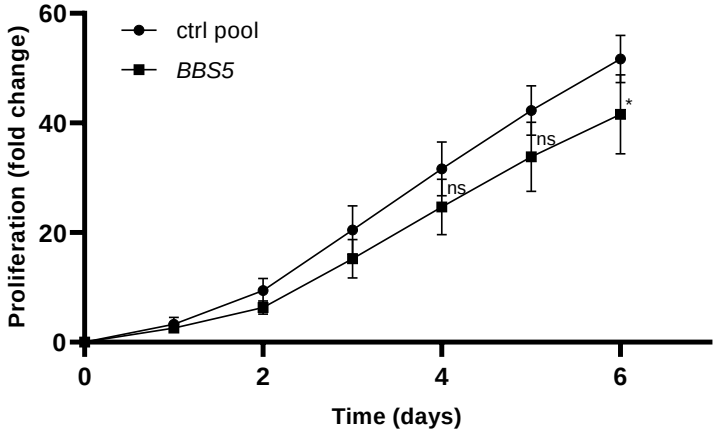


Figure 31 : Test de prolifération des fibroblastes cutanés *BBS5*. Courbe de prolifération des fibroblastes cutanés provenant de contrôles sains. L'analyse est réalisée avec Incucyte S3 Sartorius (objectif 20X), permettant d'évaluer la prolifération des cellules dans des plaques à 24 puits au cours du temps (6 jours). Les valeurs sont rapportées comme la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes. Les valeurs *p* sont déterminées en utilisant un test ANOVA à deux voies. ns : non significatif.

Nous pouvons en conclure que la variation de *BBS5* et les anomalies du phénotype ciliaires dans les fibroblastes de la patiente n'ont pas affecté la prolifération cellulaire chez cette dernière.

C. Test de complémentation (rescue)

La meilleure façon de prouver que le phénotype ciliaire des fibroblastes de patients est dû aux mutations du gène en question est de compenser la copie du gène mutée avec un sur-expression de l'allèle WT de ce gène dans les cellules des malades et de voir si la correction de ce dernier va corriger le phénotype ciliaire. L'idée est donc d'introduire par transfection dans les fibroblastes de la patiente *BBS5*, un plasmide porteur du gène *BBS5*-WT fusionné à la GFP et d'étudier à nouveau son phénotype ciliaire en observant les même biomarqueurs (ciliogénèse, longueur du cil, voie SHH, prolifération). Pour réaliser les expériences de complémentation, il y a plusieurs facteurs à prendre en considération, si le type cellulaire utilisé accepte facilement la transfection (le pourcentage de transfection), si la protéine de fusion (la protéine BBS5 fusionnée à la GFP) est stable après son expression (nous utilisons un plasmide GFP-vide comme contrôle), si la viabilité des cellules post-transfection est importante ou pas (la toxicité les agents de transfection, à quelle ratio concentration les utiliser) et dans le cas précis de l'étude du phénotype ciliaire si les conditions de transfection permettent de faire l'étude c'est à dire avec et sans ciliogénèse et activation de la voie SHH et à quel moment des traitements il faut transfecter les cellules.

On notera que les fibroblastes sont des cellules primaires difficilement transfectables par rapport à des lignées cellulaires établies comme les HEK 293T (lignée immortalisée par l'incorporation de l'antigène grand T du virus SV40 dans son génome) par exemple.

Les expériences de complémentation que j'ai réalisées ont été faite en essayant de tenir compte de toutes ces conditions sur des HEK et des fibroblastes de peau (contrôle et de la

patiente BBS5) en utilisant plusieurs conditions expérimentales différentes (avec des agents de transfection ou par magnétofection).

1. La lipofection

- Lipofectamine 3000

Le résultat de la transfection des HEK réalisée avec la lipofectamine 3000 avec le plasmide GPF-vide montre une bonne efficacité de transfection (~80%) alors qu'avec le plasmide BBS5-GFP presque aucune cellule n'a été transfectée et ceci quel que soit la concentration utilisée (Figure 32).

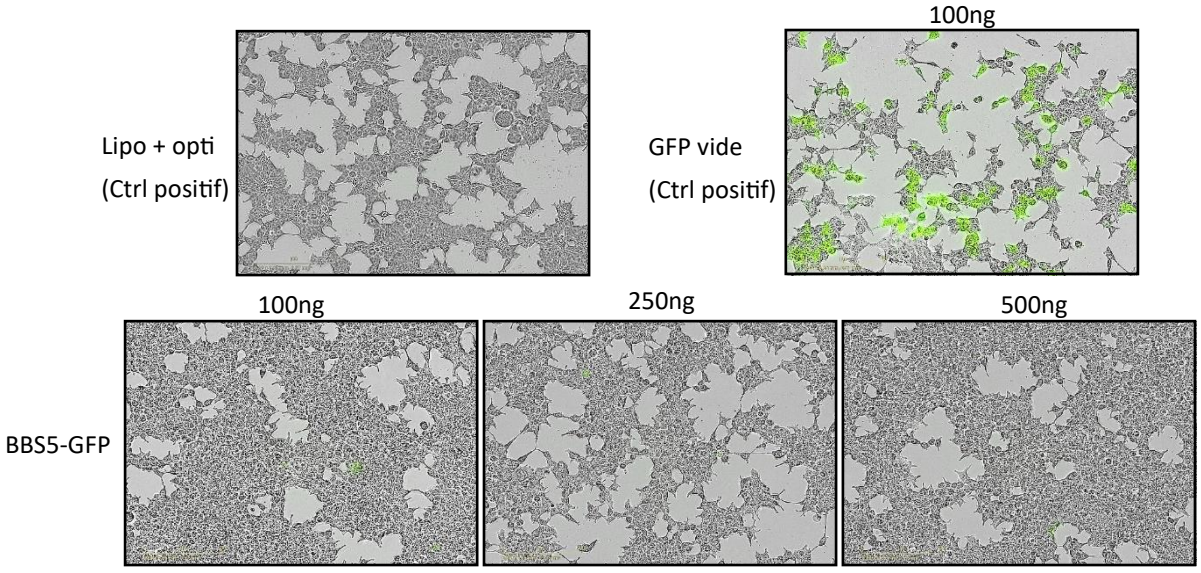


Figure 32 : Transfection des HEK avec la lipofectamine 3000. Images des HEK transfectées avec le plasmide GFP-vide et le plasmide *BBS5*-GFP testé pour 3 concentrations (100, 250 et 500ng). Les images sont prises après 48H de transfection avec le système d'imagerie automatique Incucyte Sartorius.

La lipofectamine 3000 ne permet pas une bonne transfection du plasmide BBS5-GFP même dans les HEK, cellules qui sont normalement facilement transfectables.

- X-tremeGENE 9 DNA

Le résultat de la transfection des HEK réalisée avec l'X-tremeGENE 9 DNA avec le plasmide GPF-vide montre une très bonne efficacité de transfection en condition +SVF (~90% des cellules qui ont intégrées le plasmide), en condition -SVF la transfection est toujours réalisée mais moins importante. Alors que le résultat de la transfection des HEK avec le plasmide BBS5-GFP montre une transfection beaucoup moins importante en conditions +SVF (~40% de cellules HEK transfectées), et encore moins en conditions -SVF (Figure 33).

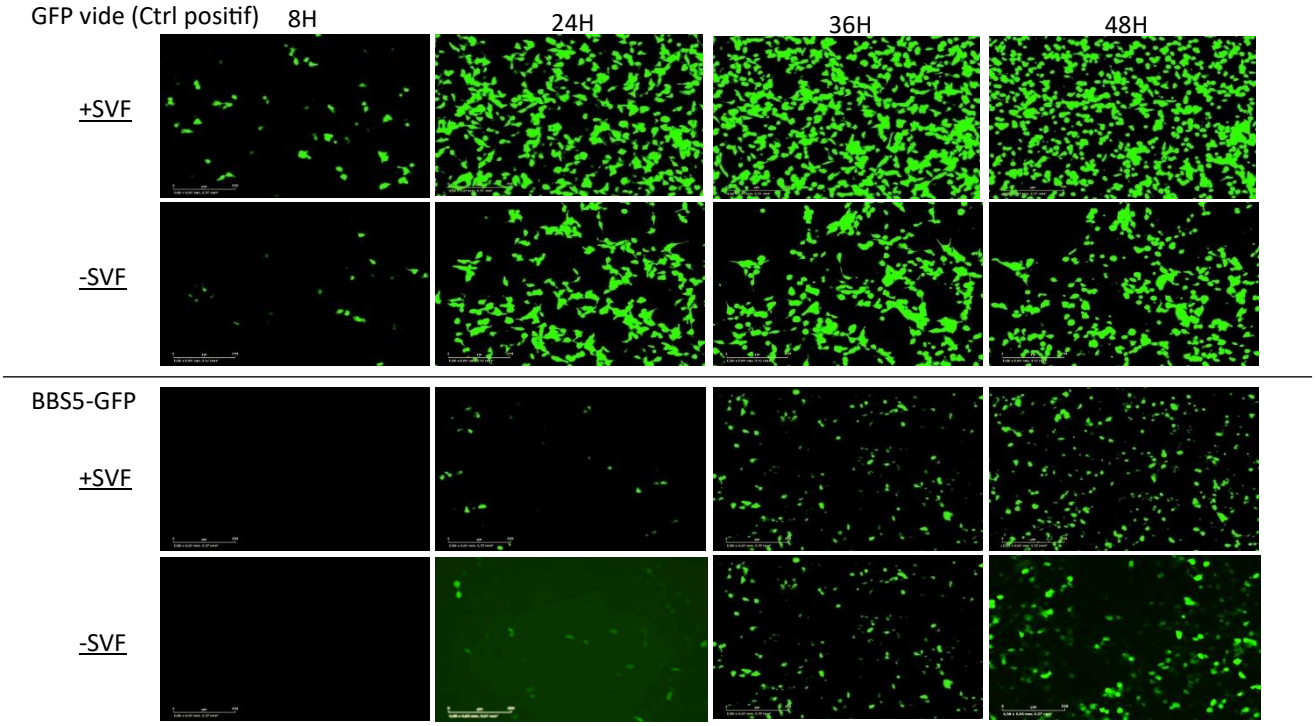


Figure 33 : Transfection des HEK avec l'X-tremeGENE 9 DNA. Images des HEK transfectées avec le plasmide GFP-vide et le plasmide *BBS5*-GFP testé dans deux conditions + et –SVF. Les images sont prises après 48H de transfection avec le système d'imagerie automatique Incucyte Sartorius S3.

Ces résultats montrent qu'avec l'agent l'X-tremeGENE 9 nous pouvons avoir une efficacité de transfection ~40% du plasmide BBS5-GFP dans les HEK. Le fait de mettre les cellules en condition -SVF dès le début de la transfection a causé la perte d'une grande quantité de ces dernières et drastiquement réduit l'efficacité de transfection. Donc avec l'X-tremeGENE 9 les résultats sont plus encourageant qu'avec la lipofectamine 3000 mais le pourcentage de cellules transfectées peux encore être amélioré et les conditions de ciliogénèse sont à ajuster pour limiter la perte cellulaire.

- X-tremeGENE^{TM} HP

Le résultat de transfection des HEK avec le plasmide GFP-vide et le plasmide BBS5-GFP montre une très bonne efficacité de transfection avec les deux plasmides en condition +SVF et en condition -SVF induite 24H après le début de la transfection. Dans ces mêmes conditions la transfection des fibroblastes n'est pas du tout efficace pour les deux plasmides (Figure 34).

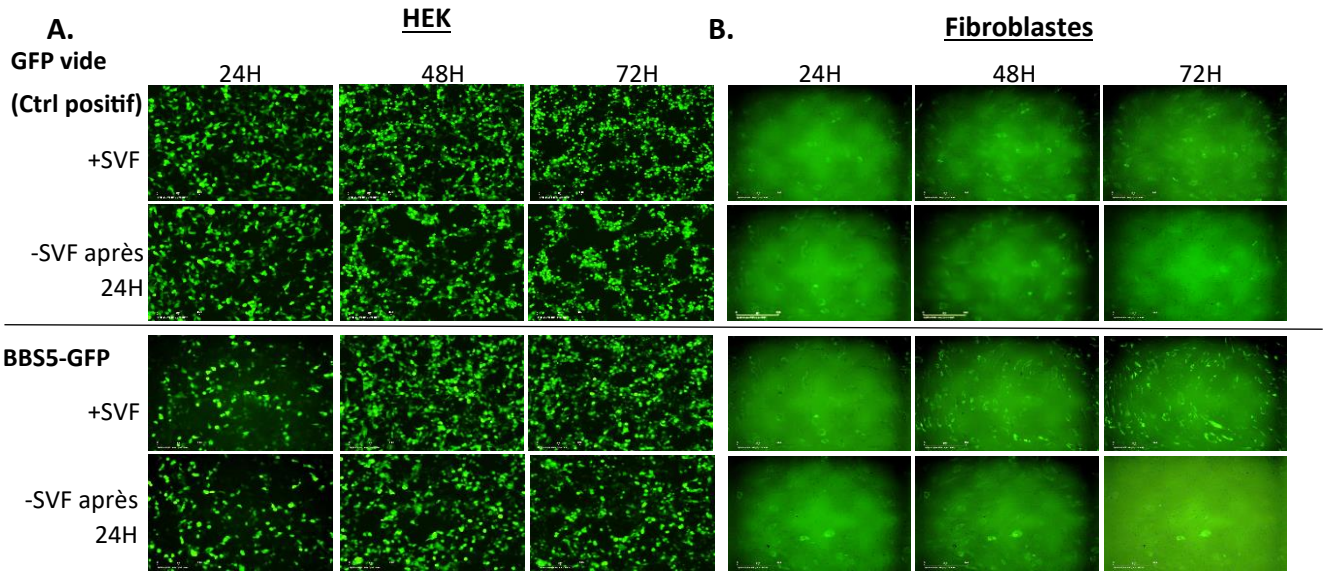


Figure 34 : Transfection des HEK et fibroblastes avec l'X-tremeGENE™ HP. Images des cellules HEK **(A)** et fibroblastes **(B)** transfectées avec le plasmide GFP-vide et le plasmide *BBS5*-GFP testé dans deux conditions + et -SVF (cette fois le milieu -SVF est changer après 24H du début de la transfection). Les images sont prises toutes les 2H pour 72H pour suivre la transfection avec le système d'acquisition d'images automatique d'Incucyte Sartorius.

Ces résultats montrent que l'agent X-tremeGENE™ HP améliore beaucoup plus le pourcentage de HEK transfecté, et que l'induction de la ciliogénèse (changement du milieu en -SVF) 24H après le début de la transfection permet d'avoir une meilleure viabilité des cellules. Les conditions optimales de transfection avec le plasmide BBS5-GFP sont valables pour les HEK, mais pas pour les fibroblastes de peau qui restent toujours difficilement transfectables.

- Lipofectamine LTX and PLUS™ Reagent

Les résultats de la transfection des fibroblastes contrôle avec le plasmide GFP-vide en condition +SVF (condition normale de culture) montre que ~25% des cellules ont été transfectées, alors que les fibroblastes de la patiente présentent une efficacité de transfection moins importante ~10% (Figure 35).

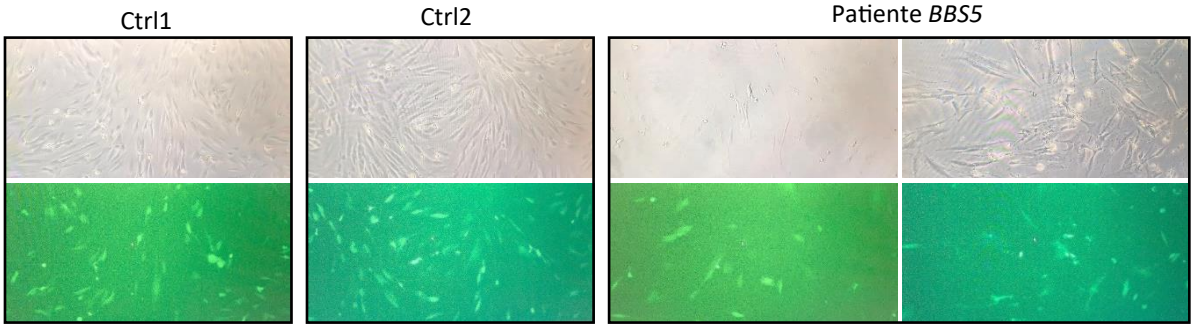


Figure 35 : Transfection des fibroblastes avec la Lipofectamine LTX and PLUS™ Reagent. Images des fibroblastes de deux contrôles et de la patiente *BBS5* transfectés avec le plasmide GFP-vide dans une conditions + SVF. Les images sont prises 48H post-transfection avec un ZOE Fluorescent Cell Imager.

Avec la lipofectamine LTX and PLUS™ Reagent j'ai obtenu la meilleure efficacité de transfection pour les fibroblastes. Néanmoins, le taux de cellules transfectées reste insuffisant pour pouvoir réaliser les tests du phénotypage ciliaire post-transfection.

2. La magnétofection

- Glial-Mag et PolyMag Neo

Dans le but d'augmenter l'efficacité de transfection des fibroblastes j'ai testé la magnétofection qui est une technique de transfection qui consiste à exercer une force magnétique sur les vecteurs de gènes associés à des particules magnétiques pour incorporés les acides nucléiques dans les cellules cibles. J'ai testé deux réactifs différents le Glial-Mag et le PolyMag Neo. Les résultats de la magnétofection des fibroblastes de contrôles avec le plasmide GFP-vide en condition +SVF en utilisant les deux réactifs ne montrent quasiment aucune transfection dans aucune des cellules (Figure 36).

Figure 36 : Magnétofection des fibroblastes de contrôles. Images des fibroblastes transfectés par magnétofection avec le plasmide GFP-vide à l'aide de deux agents différents le Glial-Mag et le PolyMag Neo dans une condition +SVF. Les images sont prises 48H post-transfection avec un ZOE Fluorescent Cell Imager.

La magnétofection semble ne pas être la bonne solution pour optimiser l'efficacité de transfection des fibroblastes.

Malgré tous les tests de transfection que j'ai réalisé avec les différents agents de transfection et la magnétofection, je n'ai pas obtenu une efficacité de transfection supérieure à 25% pour les fibroblastes cutanés humain. Les tests doivent être poursuivis, en testant la transfection par électroporation appelé aussi électroperméabilisation. C'est une technique qui consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires qui sont ainsi déstabilisées ce qui crée des pores dans la membrane et augmentera sa perméabilité permettant ainsi l'intégration des acides nucléique à l'intérieure des cellules. Cette technique est connue pour sa non toxicité en comparaison aux agents de transfection, et peut selon le système être appliqué sur des

cellules adhérentes ou en suspension ce qui permet de transfecter un grand nombre de cellules à la fois tout en gardant une viabilité importante de ces dernières.

D. Conclusion

Pour conclure, les expériences présentées ci-dessus sont des expériences très intéressantes qui permettent de compléter l'étude du phénotype ciliaire, d'enrichir et de consolider la « boite à outils ciliopathie ». L'application des tests de complémentation semble indispensable car leurs résultats pourront confirmer que les phénotypes ciliaires observés dans les cellules des patients sont provoqués par les variants identifiés dans le gène donné. Ces expériences seront poursuivies au laboratoire afin de les utiliser dans la résolution et l'étude d'autres patients.

Le projet portant sur l'étude comparative des phénotypes ciliaires BBS

I. Introduction

Le gène *BBS1*

Le gène *BBS1* (NM_024649.5), situé sur le chromosome 11 (11q13.2) code pour une sous-unité majeure du BBSome. *BBS1* contient 17 exons codant pour un transcrit de 3368 pb et une protéine de 593 AA (65kDa) (NP_078925.3, MIM# 209900) (Figure 37A)

). BBS1 joue un rôle essentiel dans la formation et le maintien du BBSome, il a été montré que l'assemblage du BBSome est spatialement contrôlé par BBS1 dans les cellules humaines (Prasai et al., 2020). Il a été démontré que BBS1 s'incorpore au BBSome en tant que dernière sous-unité à la dernière étape de sa formation, et c'est grâce à son incorporation qu'un événement important à la fonction du BBSome aura lieu. Il s'agit du changement de conformation du BBSome, causé par une interaction GTPase de BBS1 avec BBS3/ARL6. Cette interaction BBS1-BBS3-GTP permettra la translocation du BBSome du satellite péricentriolaire à la base du cil permettant ainsi la liaison du BBSome à la membrane ciliaire (Mourão et al., 2014; Singh et al., 2020) (Figure 37B et C). Dans l'ensemble, il semble probable que BBS1 facilite le changement de conformation de BBSome par l'intermédiaire de liaisons qui consomment de l'énergie et qui finissent par confiner le BBSome dans les cils. La perte de la protéine BBS1 est connue pour perturber la formation et la fonction du BBSome, des mutations de *BBS1* induisent des problèmes dans l'assemblage du BBSome, sa localisation et également son fonctionnement, entrainant ainsi un dysfonctionnement ciliaire. Il est intéressant de noter que l'absence de BBS1 non seulement bloque le BBSome au niveau des satellites péricentriolaires mais modifie aussi la structure de la base ciliaire, avec pour résultat un corps basal et une zone de transition légèrement allongés ce qui suggère un rôle de BBS1 non seulement dans l'assemblage du BBSome mais aussi dans l'organisation de la base ciliaire (Prasai et al., 2020).

BBS1 est un contributeur majeur du BBS, il est muté chez 20% des patients ayant ce syndrome. Plus de 70% des patients *BBS1* rapportés, portent le variant M390R devenu le plus récurent du *BBS1*. C'est un variant de type faux-sens qui modifie un acide aminé bien conservé au cours de l'évolution situé dans l'un des feuillets β du domaine β-propeller de *BBS1*. Il a été démontré que ce variant change le repliement du feuillet β empêchant ainsi l'interaction de BBS1 avec BBS3 et par la suite le recrutement du BBSome à la membrane ciliaire (Mourão et al., 2014). L'apparition de la mutation récurrente M390R est lié à un effet fondateur, c'est à dire l'apparition d'un variant dans un groupe d'individus restreint qui est sélectionné au cours des générations. Ce variant est le plus courant en Europe du Nord (Delvallée et al., 2021; Mykytyn et al., 2002; Young et al., 1999).

Il existe un modèle murin Knock-in (KI) de $Bbs1^{M390R/M390R}$, qui présente une atteinte rétinienne, une infertilité masculine, une obésité, des troubles olfactifs et des atteintes neuroanatomiques, il a donc un phénotype similaire à celui des patients *BBS1* (Davis et al., 2007; Delvallée and Dollfus, 2023). En 2021 une autre étude a été réalisé sur le modèle murin $Bbs1^{M390R/M390R}$ dans le but de voir si une expression ectopique du gène *BBS1* WT humain dans la souris allait restaurer son phénotype précisément l'infertilité masculine et la dégénérescence rétinienne. Les résultats montrent que le transgène a sauvé le phénotype de

l'infertilité masculine mais pas la dégénérescence rétinienne. Les résultats de cette étude indiquent que l'infertilité masculine du BBS est une cible intéressante pour la thérapie génique. (Cring et al., 2022).

D'autre études (au totale 9) ont été réalisées sur des modèles cellulaires KO et KD *in vitro*, par exemple sur des hTERT-RPE1 (human immortalized retinal pigment epithelial-1), des fibroblastes cutanés de souris, des cellules provenant des vésicules de Kupffer du poisson zèbre, des modèles d'iPSC dérivés de cellules neurales. Ces études montrent qu'un dysfonctionnement de BBS1 peut avoir un effet sur la ciliogénèse (pas de changement du nombre de cellules ciliées, ou moins de cil) et sur la longueur du cil (plus courts, plus long ou pas de changement). Les résultats montrent que le dysfonctionnement de BBS1 aboutit à des altérations du cil primaire, ces altérations sont assez variables et changent en fonction des conditions expérimentales telles que l'espèce (humain, souris, poisson zèbre), le tissu du prélèvement des cellules (tube neural, tissus adipeux, peau, poumons) et la technologie utilisée pour introduire la mutation (siRNA, KO, KD, MO) (Castro-Sánchez et al., 2019; Nozaki et al., 2018; Wang et al., 2021). Ces altérations ciliaires causées par le dysfonctionnement de BBS1 montrent l'importance du rôle de cette protéine dans le BBSome notamment dans la formation et le maintien du cil primaire. Seulement deux études ont montré que la perte de BBS1 induit une sous activation de la voie SHH exposant ainsi le rôle essentiel de BBS1 dans la fonction ciliaire (Wang et al., 2021; Yee et al., 2015).

Pour finir, la littérature montre qu'aucune étude n'a été encore réalisée sur des fibroblastes cutanés de patients *BBS1* porteurs de variants pathogènes. La compréhension plus précise de l'effet de BBS1 sur le phénotype ciliaire nécessite des investigations supplémentaires minimisant au plus les variabilités expérimentales afin de pouvoir obtenir une ligne de base pour des comparaisons en cas d'études avec des variations de signification incertaines par exemple.

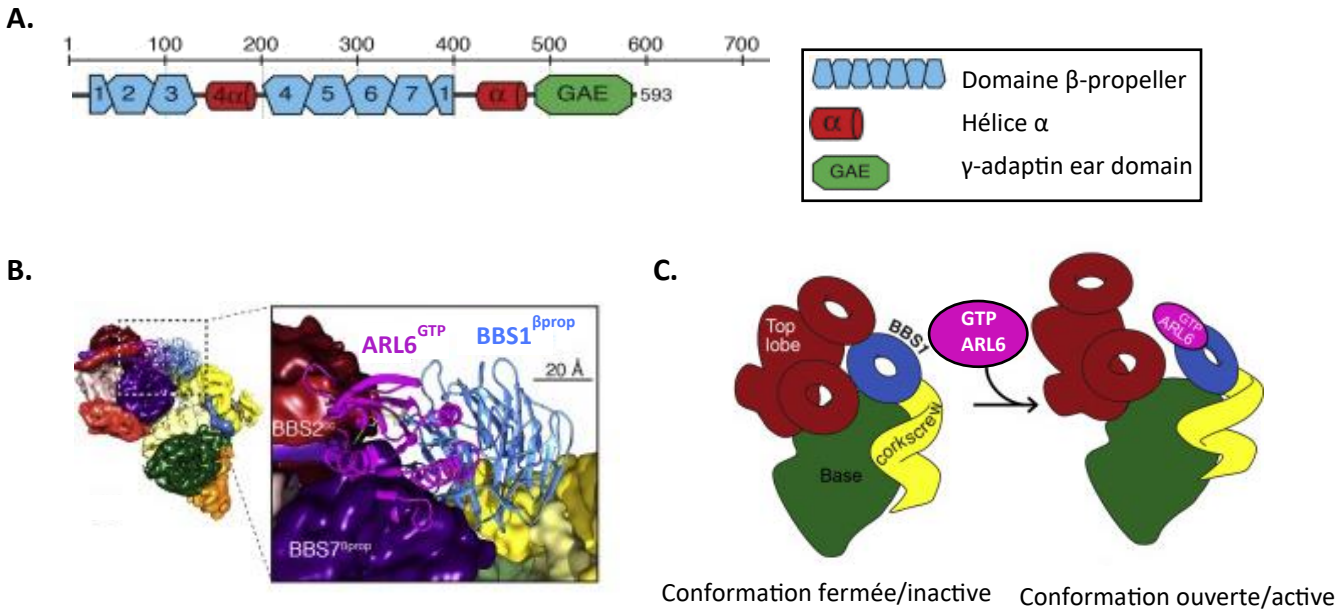


Figure 37 : BBS1. A. Représentation schématique des domaines protéiques de BBS1. **B.** Représentation de la position de BBS1 dans le BBSome réalisée par cryo-EM (cryo-microscopie éléctronique). **C.** Changement de conformation prédit dans le BBSome induit par la liaison de l'ARL6 GTP. A gauche : en solution, le BBSome existe principalement dans une conformation fermée, dans laquelle BBS1-βprop est trop proche du lobe supérieur pour permettre la liaison de l'ARL6-GTP. A droite : la liaison de l'ARL6-GTP bloque le BBSome membranaire dans une conformation ouverte et active. Cette conformation permet au BBSome d'interagir avec les cargaisons et/ou l'IFT et de traverser la zone de transition ciliaire (adapté de Chou *et al.* 2019).

E. Le gène BBS10

Le gène *BBS10* (NM_024685.3), situé sur le chromosome 12 (12q21.2) code pour une sous-unité du complexe chaperonin-like. *BBS10* contient 2 exons codant pour un transcrit de 2172 pb et une protéine de 723 AA (80kDa) (NP_ 078961.3, MIM# 615987) (Figure 38A). BBS10 entre en interaction avec BBS6 et BBS12 pour former le complexe chaperonin-like qui est impliqué dans l'assemblage du BBSome (Zhang et al., 2012).

L'histoire du gène *BBS10* a commencé suite à son identification chez une famille Libanaise consanguine avec 5 fratries atteints du BBS (Stoetzel et al., 2006). *BBS10* est le deuxième contributeur majeur du BBS après *BBS1*, il est muté chez ~19% des patients ayant ce syndrome, avec des exceptions remarquables dans des groupes ethniquement homogènes tels que les cohortes BBS Danoises (43%) (Hjortshøj et al., 2010) ou Espagnoles (8,3%) (Álvarez-Satta et al., 2014). Une centaine de variants pathologiques différents ont été identifiés avec une distribution large tout au long de la séquence de *BBS10* (Human Gene Mutation Database, (Stenson et al., 2017)). Parmi ces variants, p.Cys91Leufs*5 est un variant délétère (de type frameshift) récurrent dans les cohortes BBS d'origine Européenne, 48% des patients *BBS10* portent ce variant qui est causé par un effet fondateur (Muller et al., 2010; Stoetzel et al., 2006). Il est important de souligner certaines tendances concernant les phénotypes BBS liés à des modifications des gènes *BBS* chaperonin-like (*BBS6/MKKS*, *BBS10* et *BBS12*). Il existe un

consensus général sur le fait que les patients *BBS* présentant des variants pathogènes dans ces gènes développent un phénotype plus sévère que ceux présentant des modifications affectant les composants du BBSome tels que BBS1 (Castro-Sánchez et al., 2015; Imhoff et al., 2011). Les patients présentent une apparition plus précoce de la maladie (en particulier les patients *BBS10*), une plus grande prévalence de tous les critères majeurs du BBS et également une plus grande fréquence de chevauchement des caractéristiques avec d'autres ciliopathies, principalement le MKKS (McKusick-Kaufman syndrome, MIM#604896) et le syndrome d'Alström (MIM#203800). Ces différences dans la sévérité phénotypique pourraient être dues aux rôles fonctionnels distincts des gènes *BBS* chaperonin-like par rapport aux protéines BBS faisant partie du BBSome. Ainsi, des variants délétères dans certains composants du BBSome pourraient conduire à l'accumulation de complexes intermédiaires qui maintiennent une activité résiduelle ou un gain de fonction comme mécanisme de compensation (Zhang et al., 2012), alors que les protéines BBS chaperonine-like sont essentielles pour l'étape initiale de l'assemblage du BBSome, de sorte qu'aucun complexe fonctionnel n'est formé si ce sous-ensemble de protéines est affecté (Seo et al., 2010). Le BBSome non fonctionnel induira des altérations ciliaires affectant la ciliogénèse la formation et la fonction du cil. Une étude réalisée sur les fibroblastes de patients porteurs du variant *BBS10* le plus récurent (p.Cys91Leufs*5) à l'état homozygote montre que les cellules présentent moins de cellules ciliées, des cils plus long et une voie SHH moins active confirmant ainsi l'implication de BBS10 dans le cil primaire (Hey et al., 2021). Il existe plusieurs modèle murins *BBS10*, une étude réalisée par Mayer *et al* en 2022 montre que la souris *Bbs10*$^{-/-}$ KO présente un phénotype typique du BBS caractérisé par une rétinopathie pigmentaire inversée pendant laquelle la dégénérescence des cônes survient au stade précoce avant celle des bâtonnets (Mayer et al., 2022). Ce phénomène diffère de la plupart des types de rétinopathies pigmentaires (RP), dans lesquels la perte des bâtonnets précède celle des cônes. La souris *Bbs10*$^{-/-}$ récapitule le phénotype rétinien "cônes simultanés avec les bâtonnets ou cônes avant bâtonnets" observé chez certains patients *BBS10* (Grudzinska Pechhacker et al., 2021; Scheidecker et al., 2015b).

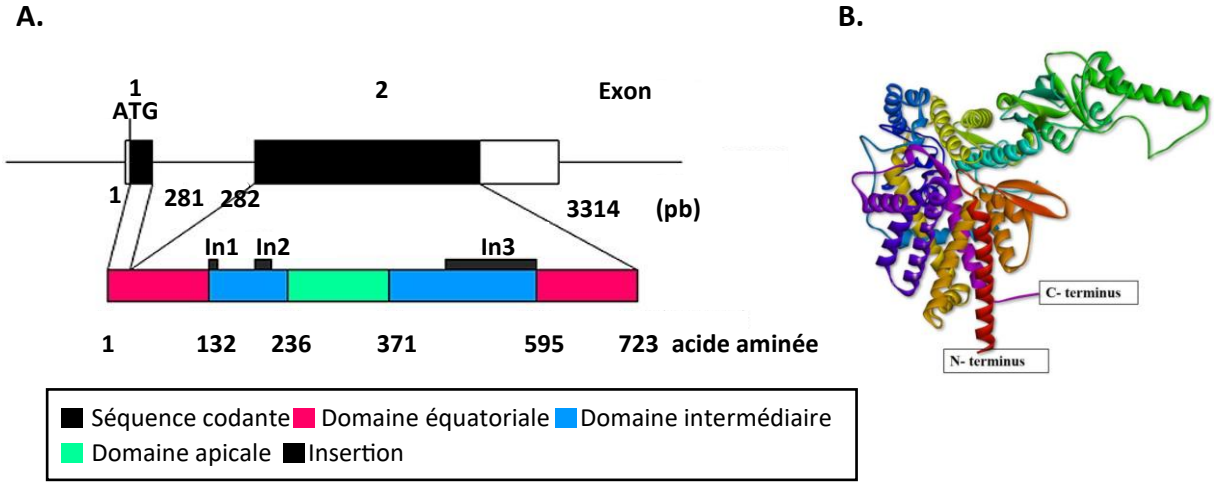


Figure 38 : BB10. A. Représentation schématique du gène *BBS10* et de sa structure protéique de type chaperonine-like (Alvarez-Satta *et al*. 2017). **B.** Représentation de la structure 3D modélisée de la protéine BBS10 (Gupta *et al*. 2022).

F. Le gène *IFT172/BBS20*

Le gène *IFT172/BBS20* (NM_015662.2) situé sur le chromosome 2 (2p23.3) code pour une sous-unité du complexe IFT-B. *IFT172* contient 48 exons codants pour un transcrit de 5247 pb et une protéine de 1749 AA (MIM# 619471). IFT172 est la plus grande protéine IFT avec un poids moléculaire de 197KDa.

IFT172 a été signalé pour la première fois par Huangfu et ses collègues en 2003 (Huangfu et al., 2003). IFT172 est connu à l'origine comme une protéine de liaison sélective du domaine LIM (un domaine composé de deux domaines contigus à doigt de zinc, séparés par deux résidus hydrophobes) qui participe à l'assemblage de l'IFT-B2 (Tsao and Gorovsky, 2008). L'extrémité de la protéine IFT172 contient sept répétitions WD (40 résidus d'acide aminés terminé par le dipeptide tryptophane(W)-aspartate(D)) qui sont généralement impliquées dans l'interaction transitoire des protéines. Elle contient également sept répétitions dégénérées distinctes, appelées répétitions WAA en raison des résidus tryptophane (W) et alanine (A) conservés. Cette séquence est homologue aux répétitions tetratricopeptidiques (TPR) et devrait présenter une structure secondaire en hélice α. La structure de la protéine IFT172 est très conservée chez les organismes dotés de cils et sa région homologue comprend les domaines WD et WAA décrits ci-dessus (Pedersen et al., 2005). La protéine IFT172 présente des conformations ouvertes et fermées distinctes qui peuvent être régulées par des lipides ou des détergents. Grâce à sa capacité à subir une transformation conformationnelle d'une forme de "tige" élancée en une forme de "boule" fermée, IFT172 contribue au transport antérograde de l'IFT ainsi qu'à la transition "antérograde à rétrograde" à l'extrémité ciliaire (Pedersen et al., 2005) (Figure 39).

Plusieurs études ont permis d'associer le rôle d'IFT172 à la formation le maintien et la fonction du cil notamment à la régulation de la voie SHH. Il a été démontré que IFT172 joue un rôle important dans la croissance et l'extension des cils primaires. Des analyses quantitatives montrent que le maintien de la longueur des cils primaires nécessite un taux d'expression normale d'*IFT172*. Lorsque l'expression de l'*IFT172* diminue, les cils primaires cessent de croître voire se désassemblent, tandis que l'expression totale de l'α-tubuline acétylée (le composant central de l'axonème ciliaire) reste intacte. Cela suggère que la croissance défectueuse des cils primaires est une conséquence directe de la mutation d'*IFT172* (Ma et al., 2020; Yanardag and Pugacheva, 2021). D'autres études ont démontré que IFT172 est nécessaire à l'activation normale de la voie SHH. En absence d'IFT172, les cellules ne peuvent ni favoriser la formation des activateurs GLI-2A ni réguler la production des inhibiteurs GLI3-R (Huangfu and Anderson, 2005) ce qui suggère qu'IFT172 est nécessaire à l'activation ciblée de la voie SHH et qu'elle est essentielle à la production de quantités correctes d'inhibiteurs GLI3-R (Matissek and Elsawa, 2020). La voie SHH étant impliquée dans de nombreuses maladies neurodéveloppementales ou psychiatriques, la mutation d'*IFT172* est donc vraisemblablement impliquée dans ces conditions pathologiques.

Les souris KO *IFT172*$^{-/-}$ sont létales au stade embryonnaire : ne survivent pas après les stades E12,5 et E13,5 en raison de malformations crâniofaciales graves, d'une fermeture incomplète

du tube neural crânien, d'un cerveau antérieur malformé (sans fissure), d'un œdème cardiaque et d'une hémorragie massive (Yuan and Yang, 2015). Il existe des souris « Wimple » porteuses du variant Leu1564Pro dans IFT172 à l'état homozygote. Ces dernières présentent un retard du développement au stade embryonnaire E10,5-E11,5 avec des anomalies de formation du tube neural, des malformations cérébrales et une polydactylie préaxiale (Pruski et al., 2019). . Ces études montrent que IFT172 est nécessaire au fonctionnement normal du nœud embryonnaire, de l'organisateur embryonnaire précoce et à la formation du centre d'organisation de la tête (le mésendoderme antérieur, AME). En plus de son implication dans les ciliopathies IFT172 contribue à diverses maladies neuropsychiatriques en raison de son rôle critique dans le développement du cerveau embryonnaire (Pruski et al., 2019; Youn and Han, 2018).

IFT172 joue également un rôle important dans le développement de la rétine. Chez les embryons de souris, la rétine dégénère rapidement lorsque *IFT172* est spécifiquement supprimée dans les photorécepteurs à bâtonnets. Toutes ces implications d'IFT172 sont également due à ses rôles indispensables dans la morphogenèse des cils et la transduction du signal médié par ces derniers (Gorivodsky et al., 2009; Zheng et al., 2023).

IFT172 a été associé à des ciliopathies modérées non syndromique comme la RP isolé (Bujakowska et al., 2015) et à des formes syndromiques comme le syndrome de Joubert (JBTS) et le BBS ainsi qu'à d'autres ciliopathies squelettiques plus sévères comme le syndrome de Jeune (JS) ou la dystrophie thoracique asphyxiante (ATD), le syndrome de Mainzer-Saldino (MZSDS) et le syndrome de Sensenbrenner (Cranioectodermal dysplasia (CED)). *IFT172* a été identifié comme le 20ème gène BBS en 2016 (Schaefer et al., 2016). C'est un contributeur mineur de ce syndrome avec quelques familles identifiées. Jusqu'à présent, il n'existe aucune corrélation entre le génotype et les différents phénotypes associés à *IFT172* (RP, BBS, ATD et MZSD). Plusieurs types de variants ont été identifiés et sont distribués le long de la séquence codante. Aucune variation non-sens n'est responsable des phénotypes les plus légers (RP et BBS).

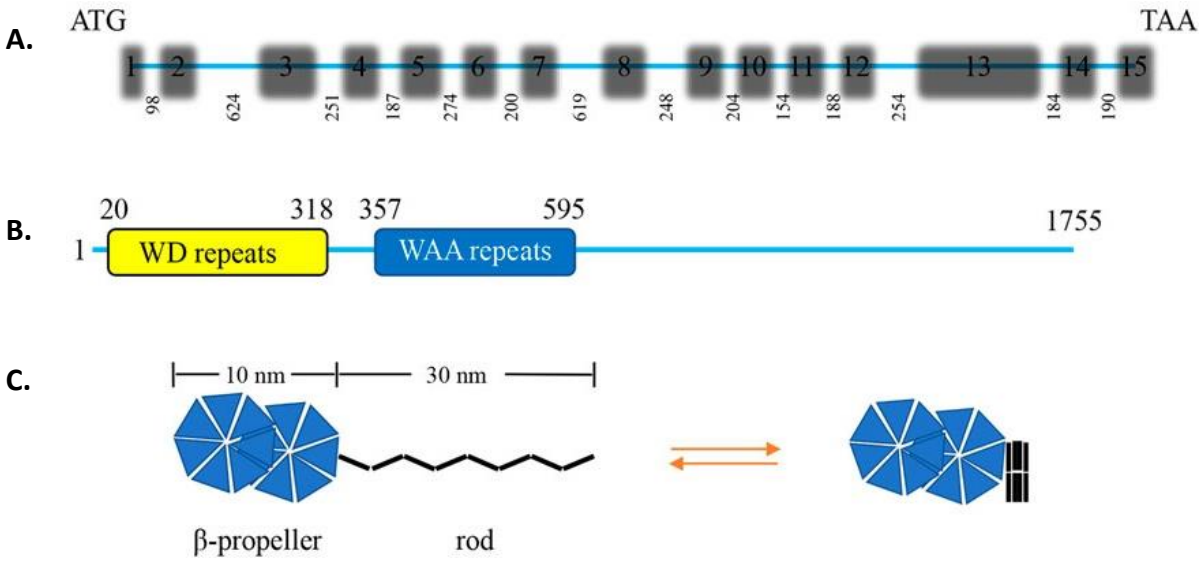


Figure 39 : Caractérisation du gène *IFT172* de *Chlamydomonas* et de sa protéine. A. Le gène *IFT172* de *Chlamydomonas* comporte 15 exons et 14 introns la longueur en pb est indiquée pour chacun des introns. **B.** L'architecture du domaine de l'IFT172 de Chlamydomonas. IFT172 contient sept répétitions WD et sept répétitions WAA. **C.** Représentation schématique de la transformation conformationnelle de l'IFT172 monomérique (Zheng *et al*. 2023).

II. Le synopsis

Le deuxième objectif de ma « boite à outil ciliopathie » est de caractériser les phénotypes ciliaires des patients BBS dont le diagnostic génétique est déjà résolu. Le but de cette caractérisation globale est d'essayer de répondre aux questions ci-dessous :

- Existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire en fonction des conditions expérimentales (espèce, tissus…) ?
- Existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire pour des variants différents au sein du même gène BBS ?
- Existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire pour différents gènes BBS ?
- Existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire pour des gènes codant des protéines BBS localisées dans les mêmes compartiments ciliaires (BBSome, IFT, Chaperonine…) ?

Afin de pouvoir répondre aux questions scientifiques posées, j'ai d'abord effectué avec une collègue postdoctorante au laboratoire (Dr. Gaëlle Hayot) une recherche bibliographique. Nous avons ainsi extrait tous les articles portants sur les 24 gènes BBS publiés avant 01/01/2021 et ayant traité des anomalies du cil (nombre, taille et fonction) et/ou la prolifération cellulaire quel que soit le modèle d'étude utilisé (cellules, animaux). Tous les résultats ont été collectés et analysés de manière conjointe et sont résumé dans un circos présenté dans l'article joint à ce projet. Sur l'ensemble des articles sélectionnés, seul 3,5% rapportent des caractérisations phénotypiques du cil. Nous avons constaté une grande

variabilité des résultats pour les gènes BBS en fonction de la variation, de l'espèce, du type cellulaire, de la technique utilisée. Finalement, très peu d'études ont été réalisées sur les fibroblastes dérivés des patients. Nous pouvons conclure de cette recherche bibliographique que la variabilité du phénotype ciliaire est dépendante des conditions expérimentales et qu'à elle seule, nous ne pouvons pas répondre à toutes les questions posées ci-dessus.

Pour le faire, nous avons décidé d'appliquer la « boite à outils ciliopathie » en minimisant au maximum les variabilités des conditions expérimentales afin de pouvoir obtenir des résultats interprétables en utilisant un seul type cellulaire. J'ai travaillé sur le même type de cellules provenant de la même espèce : des cultures primaires de fibroblastes issues de biopsies de peau de patients porteur de variants pathogènes évitant ainsi la nécessité de réaliser des techniques d'édition des variants (tels que la technique du CRISPR-cas9).
Nous avons ainsi entrepris une étude pilote sur une sélection de patients BBS (n= 3-4) de la cohorte COBBALT (Cohorte Bardet-Biedl et Alström Translationnelle) présente au laboratoire. Cette cohorte est composée des patients atteints du syndrome de Bardet-Biedl et du syndrome d'Alström et de plusieurs types de prélèvements (ADN, fibroblastes de peau …). Nous avons sélectionné des patients avec des variations génétiques de pathogénicité certaine dans des gènes BBS connus. Nous nous sommes intéressés aux trois compartiments connus du cil à savoir le BBSome, le complexe « chaperonin-like » et le complexe du transport intraflagellaire (IFT).
Le choix des patients se présente comme suit :

- BBSome : 4 patients pour le gène *BBS1* (le plus fréquemment impliqué dans le BBS) dont :
  - 1 homozygote pour le variant c.479G>A (p.R160Q)
  - 2 homozygotes porteur du variant c.1169T>G (p.M390R) mutation récurrente du gène BBS1 (présent chez 70% des patients BBS)
  - 1 hétérozygote composite pour la même variation récurrente et l'insertion d'un élément mobile dans l'exon 13 (SVA_ F.) (Delvallée et al., 2021).
- Chaperonine-like : 4 patients pour le gène *BBS10* (le second gène le plus fréquemment impliqué dans le BBS) dont :
  - 2 homozygotes porteurs du variant le plus fréquent du gène c.271dupT (p.Cys91Leufs*5)
  - 1 homozygote pour un variant fréquent c.145C>T (p.Arg49Trp)
  - 1 hétérozygote composite pour ces 2 variants.
- Transport intraflagellaire : 2 patients pour le gène *IFT172* pour lesquelles nous disposions les fibroblastes cutanés au laboratoire.
  - 1 hétérozygote composite porteur des variants p.[Gly364Glufs*19];[Cys1727Arg]
  - 1 hétérozygote composite porteur des variants p.[Lys94_Gly96delinsI]; [Lys1317_Ala1318ins10*]

Le phénotype ciliaire normal ayant déjà été déterminé sur une sélection de 5 contrôles (voir Partie 1 du manuscrit), j'ai appliqué toutes les expériences de la « boite à outils ciliopathie » sur l'ensemble des 10 patients BBS sélectionnés. Les résultats obtenus m'ont permis de répondre, en partie, aux trois questions restantes.

Les résultats ont montré que pour *IFT172* le phénotype ciliaire change en fonction du type de variants.

Une altération du gène IFT172 n'a pas d'effet sur la ciliogénèse mais cause des effets variables sur la longueur du cil et l'activation de la voie SHH en fonction des variants.

Par contre pour *BBS1* et *BBS10* le phénotype ciliaire est gène-spécifique, et ne change pas en fonction du type de variant.

Une altération du gène *BBS1* cause systématiquement moins de cellules ciliées avec un cil plus long et une voie SHH moins active pour les deux types de variants étudiés.

Une altération du gène *BBS10* n'a pas d'effet sur le nombre de cellules ciliées mais causes systématiquement un cil plus long et une voie SHH moins active pour les deux types de variants étudier.

Pour répondre à la dernière question : existe-t-il une variabilité du phénotype ciliaire pour des gènes codant des protéines BBS localisées dans les mêmes compartiments ciliaires (BBSome, IFT, Chaperonine…) ? j'ai comparé les résultats obtenus pour BBS1 et BBS5, tous deux membres du BBSome. Les deux gènes causent le même phénotype ciliaire, on peut donc conclure, qu'à priori, la variabilité du phénotype ciliaire pourrait être compartiment-dépendant.

L'étude de la prolifération cellulaire a montré des résultats très variables quant à la capacité proliférative des fibroblastes cutanés dérivés des patients. L'analyse de ces résultats nous a permis de conclure que la prolifération cellulaire n'est, à priori, pas affectée systématiquement par l'altération ciliaire et ne peut pas être considéré comme un marqueur de ciliopathie. C'est un processus cellulaire dépendant de nombreux autres mécanismes qui demande des investigations supplémentaires pour mieux le comprendre. A l'avenir, ce test ne fera donc plus parti de la « boite à outils ciliopathies ».

Il faut noter qu'il s'agit d'une étude pilote qui montre des résultats préliminaires intéressants sur une sélection de seulement 10 patients BBS. Ceci nous a permis de commencer à entrevoir l'effet des variants/des gènes/des compartiments BBS sur le phénotype ciliaire en s'affranchissant des variabilités expérimentales. Des études et tests supplémentaires sur d'autres patients porteurs de différents variants pathogènes dans les gènes *BBS1*, *BBS10*, *IFT172* et les autres gène BBS sont indispensables afin de pouvoir consolider les résultats déjà obtenus et avoir une idée plus large du phénotype ciliaire causé par tous les gènes BBS.

La mise en place de la « boite à outils ciliopathies » est un succès qui a facilité et facilitera la caractérisation du phénotype ciliaire nous permettant de faire des études comparatives sur un grand nombre d'échantillons (accessible au laboratoire) dans les mêmes conditions expérimentales. A moyen terme, ces tests seront appliqués systématiquement sur tous les fibroblastes cutanés dérivés de patients atteints de ciliopathies présents au laboratoire

(cohorte COBBALT) afin de les caractériser et répertorier leurs phénotypes ciliaires. Ces connaissances nous permettront de mieux comprendre le rôle des différents gènes dans le cil. Ce travail fait l'objet d'un article qui est rédigé et qui sera soumis prochainement.

III. Article

Towards a systematic cellular characterization of the ciliary phenotype of Bardet-Biedl genes

Adella Karam[1], Gaelle Hayot[1], Aurélie Gouronc[2], Marine Legendre[3], Pascal Kessler[4], Nicolas Le May[1], Hélène Dollfus[1,5,6*], Jean Muller[1,2*]

1. Laboratoire de Génétique médicale, UMR_S INSERM U1112, Institut de Génétique Médicale d'Alsace (IGMA), Université de Strasbourg, Strasbourg, France.
2. Laboratoires de Diagnostic Génétique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.
3. Service de Génétique Médicale, Centre de Référence Anomalies du Développement et Syndrome Malformatifs, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France.
4. Université de Strasbourg, Inserm UMS 38, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg
5. Service de Génétique Médicale, IGMA, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.
6. Centre de Référence pour les affections rares en génétique ophtalmologique, CARGO, Filière SENSGENE, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

*equal contributor

Corresponding Author: Jean Muller/Hélène Dollfus
Email address: jeanmuller@unistra.fr/dollfus@unistra.fr

ABSTRACT

Bardet-Biedl syndrome (BBS) is a ciliopathy characterized by retinitis pigmentosa, obesity, polydactyly, renal anomalies, genital abnormalities and intellectual disabilities. Biallelic pathogenic variants are found in 26 BBS genes representing more 80% of the BBS mutational load. BBS genes have been implicated in cilia formation/function and defects in ciliogenesis, cilia length and Sonic Hedgehog signaling pathway have been reported. The effect of these BBS genes on the ciliary phenotype has never been systematically evaluated preventing us to understand the exact contribution or possible variations or implication of a specific variant or a specific genes or group of genes.

In this study, we developed a robust standardized approach to accurately characterize the cilium phenotype in controls and applied it to a selection of BBS patients.

We determined and compared the cilium phenotype of healthy unrelated controls to 10 BBS patients from 3 different BBS genes, using skin-derived fibroblasts. Selected genes are *BBS1*, *BBS10* and *IFT172* belonging respectively to the BBSome complex, the chaperonin-like complex and the Intraflagellar Transport complex. Altogether, we demonstrated a healthy ciliary phenotype and at least a ciliary defect in one of the parameters for each BBS genes tested. BBS1 systematically leads to less ciliated cells with longer cilia and a reduced SHH pathway activation. BBS10 has no effect on ciliogenesis but leads to longer cilia and a reduced SHH pathway activation, while IFT172 has variable effect on the cilium phenotype.

Our results show that standardized analysis of the cilium phenotype can be used to discriminate between healthy cilium phenotype and patient's cilia phenotype of different genes. Therefore, we believe that the systematic application of this approach to all BBS genes and to other ciliopathies will provide important information of scientific impact but also will help reclassifying variations of uncertain significance thus facilitating molecular diagnosis.

Keywords: Bardet-Biedl syndrome, ciliogenesis, cilium length, SHH pathway, cell proliferation, BBS10, BBS1, IFT172/BBS20, functional testing.

INTRODUCTION

Bardet-Biedl syndrome (BBS, MIM# 209900) is a rare autosomal recessive inherited disorder considered a model of non-motile (primary) ciliopathy (Forsythe and Beales, 2013). The prevalence of BBS varies considerably between populations, ranging from 1/140.000 to 1/160,000 in European populations (Waters and Beales, 2011) and from to 1/13,500 to ~1/66,000 in isolated populations such as in Kuwait and Reunion Island, likely due to a founder effect (Farag and Teebi, 1989; Gouronc et al., 2020). BBS is pleiotropic, characterized by a broad spectrum of symptoms, affecting multiple organ systems. The primary features (major criteria) are retinitis pigmentosa (RP), obesity, polydactyly, renal anomalies, genital abnormalities and intellectual disabilities (Beales et al., 1999). They can be associated with various inconstant secondary features (minor criteria) such as hepatic anomaly, diabetes mellitus, growth retardation, psychomotor retardation, speech disorder, developmental delay, strabismus, dental disorders, hearing loss, cardiac malformations and others. Accordingly, the established diagnostic criteria are the combination of 4 major criteria or 3 major criteria combined with 2 or 3 minor criteria (Beales et al., 1999; Billingsley et al., 2011; McConnachie et al., 2021; Putoux et al., 2012) with antenatal presentation (Karmous-Benailly et al., 2005; Mary et al., 2019). BBS is caused by biallelic pathogenic variations in one of the 26 known BBS genes encoding for proteins mainly with functions related to the cilia either its localization or active function (Khan et al., 2023; Meyer et al., 2022; Novas et al., 2015). However, for some genes, their exact role remains to be determined. Pathogenic variants account for around 70-80% of cases worldwide (Forsyth and Gunay-Aygun, 2020). The contribution of each gene to the BBS mutation load is highly variable and can differ depending on the population. *BBS1* and *BBS10* are the major contributors to BBS, as in Caucasian populations, pathogenic mutations in the *BBS1* and *BBS10* genes are detected in 21-30% of patients (Janssen et al., 2011; Muller et al., 2010), a percentage that rises to 40-50% in patients from Northern Europe (Harville et al., 2010). A founder effect is responsible for the two most common pathogenic variations in Northern Europe: c.1179T>G (p.M390R) (accounting for 70% of *BBS1* cases) and c.271insT (p.C91Lfs*5) (accounting for 48% of *BBS10* cases) (Mykytyn et al., 2002; Stoetzel et al., 2006). The remaining BBS genes are very rarely mutated in BBS families and account each for around 5% of BBS cases, some of which have only been identified in a few BBS families (Khan et al., 2016).

Primary cilia are a highly conserved immotile antenna-like present at the surface of most of the eukaryotic cell in a single copy. They consist of a microtubule-based axoneme composed of 9 doublet “9+0” which is connected by a transition zone to a basal body which anchors the cilium to the cell body (Klena and Pigino, 2022). Ciliogenesis or cilium assembly takes place in the G0 phase of the cell cycle and disassembly takes place before mitosis (before the cell prepares for division). This highlights the close coordination between the cell cycle and ciliogenesis (Mill et al., 2023).

Primary cilia function as sensory organelles that coordinate a variety of signal transduction pathways, such as Sonic Hedgehog (SHH), transforming growth factor Beta (TGF-Beta) and WNT signaling that are critical for regulating cell polarity, differentiation, migration and proliferation of cells during embryonic development and in maintaining tissue homeostasis (Rosengren et al., 2018). SHH signaling pathway is one of the most studied pathways in vertebrates that is connected and strictly dependent on an intact primary cilium. The SHH pathway is regulated by a set of membrane receptors and transition factors that can be transported in and out of the cilium depending on conditions. When the pathway is OFF, PTCH1 (Patched 1) a 12-transmembrane protein is localized in the cilium, and SMO

(Smoothened) a 7-transmembrane GPCR-like protein is localized outside of the cilium. The GLI proteins which are transcription factors are retained in the cilium and undergo proteolytic transformation to generate the repressor forms (GLI2R and GLI3R) preventing the transcription of target genes (Niewiadomski et al., 2014). The binding of SHH ligand to PTCH1 turns the pathway ON by leading the inactivation of this one and its removal from the cilium allowing SMO translocation and accumulation along the cilia. SMO translocation activate the pathway preventing the proteolytic cleavage of GLI proteins. The full-length activated GLI proteins predominantly GLI2A translocate into the nucleus allowing the transcription of target gene such as *GLI1* and *PTCH1* (Anvarian et al., 2019).

Primary cilia are considered as separate organelles as their membrane compositions differ from the rest of the cell. As no protein synthesis takes place in the primary cilia, active transport of proteins into the primary cilium is required. This transport system is composed of protein complexes such as the intraflagellar transport (IFT) complex and the BBSome complex, both include known BBS genes (Nakayama and Katoh, 2018; Wingfield et al., 2018). Bidirectional movement along the axoneme from the basal body to the tip of the cilia (thanks to kinesin-anterograde transport) and vice versa (facilitated by dynein-retrograde transport) is ensured by two IFT sub-complexes: IFT-A and IFT-B (Klena and Pigino, 2022). IFT-B is involved in the anterograde transport of cargo proteins and is composed of 16 proteins (IFT20-22-25-27-38-46-52-54-56-57-70-74-80-81-88-172), and IFT-A complex is involved in retrograde transport, enabling the evacuation and recycling of proteins from the cilia, and is composed of 6 proteins (FT122-140-144 et IFT43-121-139) (van den Hoek et al., 2022). Composed of 8 proteins (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 and BBIP1/BBS18), the BBSome acts as an adaptor linking IFT complexes to signaling molecules and is required for ciliary export of activated signaling receptors (Nachury, 2018). Although the role of the BBSome is not fully understood, studies suggest that it is mainly involved in retrograde transport and exit of GPCRs from the primary cilium such as PTCH1 and SMO (Hey et al., 2021). BBSome assembly at the base of the cilium requires another BBS protein complex which is the chaperonin-complex, consisting of BBS6 (MKKS), BBS10 and BBS12 (Seo et al., 2010).
Interestingly, ciliogenesis and HH signaling have been reported to be disturbed in BBS (Zhang et al., 2012). Despite the high diagnostic rate for BBS, several BBS families remain without a definitive molecular diagnosis (Melluso et al., 2023). One of the reasons is the identification of one or more variations of uncertain significance (VSI, class 3) and for which additional data are required to conclude. Ciliary functional testing is well known for assessing the gene impact on cilia and demonstrating a relation to the cilia but taking into the account the medical impact of such testing requires some background. This raises a number of questions as to the impact of the variations identified in the BBS genes from a cellular and functional point of view. In particular, we know that these variations can affect ciliogenesis, notably the length and number of cilia, but also its function (HH signaling pathways) and, more generally, cell proliferation. What is less known is the variability of those parameters depending on the gene, the variants or even functional module in question.
In order to answer these questions, we mined the literature for ciliary phenotype on the 24 BBS genes. Data analysis showed a great variability in gene results depending on variation, species and cell type. Thus, we present a pilot study encompassing the systematic analysis of 4 cilia related parameters (ciliogenesis, cilium length, SHH signaling pathway and cell proliferation) on a selection of 10 BBS patients (skin derived fibroblasts) with known

pathogenic variants and representing the 3 major BBS functional modules (BBSome, chaperonin-like and IFT)

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Study protocols used in this study has been approved by the corresponding Institutional Review Board of the University of Strasbourg and Strasbourg University Hospitals ("Comité Protection des Personnes" EST IV, N°DC-20142222). Written informed consent was provided for each participant. Our research complies with the Declaration of Helsinki. Written informed consent for open-access publication was provided by the participants. Skin fibroblasts were obtained for the proband.

Literature search

Literature search was performed using PubMed (Sayers et al., 2022) accessed from November 2020 to Mars 2021 with no limit on date of publication. The search was conducted using each gene name and synonyms of BBS1 to BBS24 as search terms. The results were manually curated to retain only articles with inclusion criteria met and no exclusion criteria. Inclusion criteria were primary study and full article available in which either cilia length, percentage of ciliated cells, study of Sonic Hedgehog signaling pathway or cell proliferation was assessed. Exclusion criteria were absence of primary data (neither cilia length, percentage of ciliated cells SHH Signaling pathway nor cell proliferation were assessed). Two authors reviewed all abstracts and made decisions on inclusion and exclusion criteria. If a primary data was not available from the abstract, the full-text article was reviewed. The reviewer decided whether a study could be included and contained data suitable for the subsequent analysis, and extracted the relevant data from each selected study using a standard form. The review form was designed to capture the primary data. All articles were registered on an Excel file, using a table indicating the different primary data (Supplementary Table S1). This led to the identification 2177 articles (redundant) of which of 97 were selected corresponding to 76 non-redundant ones (Supplementary Table S1 and S2).

BBS Circos plot

To build the BBS circos plot, several datasets have been assembled. The pathogenic variations dataset has been extracted in June 2021 using the HGNC gene names (Seal et al., 2023) as defined in Supplementary Table 2 from the HGMD and ClinVar databases (Landrum et al., 2018; Stenson et al., 2020). HGMD variations (v2021.1) were restricted to the DM status and with a reported phenotype compatible with a BBS/ciliopathy phenotype. ClinVar variations were restricted to include either "multiple submitters, no conflicts", or "criteria provided, single submitter" or "practice guideline" OR "reviewed by expert panel" in the review status field AND 'Pathogenic" or "Likely pathogenic" status in the Clinical significance field. Protein-protein interaction (PPI) were queried from the STRING database v11.5 (Szklarczyk et al., 2021) using all BBS proteins. Parameters were set as following: physical network, active interaction sources = Experiments + databases, minimum required interaction score = medium confidence (0.400), show only query protein. The display on the circos includes the following parameters: score >0.900=thickness=10pt, score >0.700=thickness=5pt. Genes/proteins have been color-coded according to the complex to which they belong (e.g. BBSome, Chaperonin complex, IFT complex, subdistal appendage and other), PPI interactions between proteins of the same complex or between complexes have been represented as links in the very center of the circos plot. For each gene, the type of pathogenic variations has been represented as bars (outer circle), the literature search results (selected and non-selected), and their contribution to BBS mutation load. The results of the experiments carried out were presented, specifying

the species used and the mutation induction method. The circos was created using the software (www.circos.ca). We used the Color Universal Design (CUD) proposed by Mastaka Okabe and Kei Ito (https://jfly.uni-koeln.de/color/#redundant1).

Cell culture

Primary dermal derived fibroblasts from a BBS cases and control individuals (Supplementary Table S3 and S4) were obtained by skin biopsy according to (Scheidecker et al., 2014). As described in (Karam et al., 2023), fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glutamax (21885-025 Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin–streptomycin (PS) (all from Gibco). To induce ciliogenesis, the fibroblasts were grown in serum-reduced media (0.1% FCS) for 48 h. To induce SHH pathway stimulation, the fibroblasts were stimulated with smoothened agonist (SAG, Abcam ab145866) at a final concentration of 100 nM for 48 h with and without serum starvation.

Immunofluorescence analysis

To induce primary cilia formation, the fibroblasts were grown in serum-reduced media (0.1% FCS) for 48 h. Skin-derived fibroblasts were grown on 24-well plates (Falcon, 3226) and Lab-Tek8-well chamber slides (Thermo Scientific Nunc 15411). The fibroblasts were subsequently fixed in ice-cold methanol at −20 °C for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS 1×, and blocked in 10% FCS in PBS 1× for 1 h at room temperature. Incubation with primary antibodies diluted in 2% FCS was done for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C. Secondary antibody incubation was carried out for 1 h at room temperature. For those realized in Lab-Tek8-well, nuclei were visualized using Hoechst, and images were obtained using an inverted fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). For those realized on 24-well plates, images were obtained using an IncuCyte S3 (Sartorius) and were analyzed using ImageJ. Cilia frequency was calculated from the number of cells with a primary cilium divided by the total number of cells (n = 400 cells analyzed). p-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA ****: $p < 0.0001$. Primary cilia length was measured via IncuCyte software irrespective of the angle of orientation (n = 400 cilia). p-values and significance were determined using Kruskal–Wallis test ****: $p < 0.0001$. The number of cilia (n) measured consisted of pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment. Statistical analysis was done using GraphPad Prism software. Antibodies used in this experiment are available in **Supplementary Table S5**.

SHH pathway analysis

RNA was extracted from skin-derived fibroblasts via QiaShredder (Qiagen, ref 79654) and RNeasy Minikit (Qiagen, ref 74104) kits. RNA concentration was evaluated by spectrophotometry (Eppendorf Bio Photometer Plus). cDNA was synthesized via an "iScript ™ c Synthesis Kit" (170-889, Bio-Rad, USA) according to the manufacturer's instructions with 500 ng of RNA. Quantitative real-time PCR was carried out with an iQTM SYBR Green Supermix (#170-8886, Bio-Rad) in a Bio-Rad CFX96/384^{TM} Real-Time System in triplicate. cDNA was diluted to 1/10, and *GLI1*, *PTCH1* and *GAPDH* (house-keeping gene) primers were used at a concentration of 0.25 µM. The primers are available in **Supplementary Table S6**. The normalized fold expression of the target genes was calculated using the comparative cycle threshold (C_t) method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) by normalizing target messenger RNA (mRNA) C_t to those for *GAPDH* reference gene using CFX Manager Software Version 1.5 and Microsoft Excel

calculations. Data are presented as relative expressions ± SEM. Statistical analyses were done using the GraphPad Prism software. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

Cell proliferation assay

To measure cell proliferation, skin fibroblast cells were detached using trypsin and counted with an Automated Cell Counter (LUNA-FL™). Cells were plated in triplicate in 24-well plates (10^4 cells/well). The IncuCyte® NucLight Rapid Red reagent was added in each well to fluorescently label the nucleus of living cells (Sartorius Cat# 4717). Viability was measured with the IncuCyte S3 (Sartorius) on a 10 days duration with image acquisition every 2H. Each measurement was normalized to day 0 (measured the day after plating) and expressed as a fold increase. Three independent experiments were performed. Statistical analysis was done using GraphPad Prism software. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test. ns: non-significant** $p < 0.01$.

RESULTS

Literature analysis

In order to delineate the ciliary phenotype of several BBS genes and variations, we carried out a literature search for each of the 24 known BBS genes including experiments describing ciliogenesis, cilia length, SHH pathway study or cell proliferation. Of the 2177 articles published on the 24 *BBS* gene until January 1, 2021, we have selected 76 non-redundant articles that met the search criteria including at least one of the search experiences (see Methods).

Looking at the distribution of the data available for each gene, there is of course an increased number of articles reported for genes described earlier (e.g. *BBS1, BBS6*) but also for genes implicated in multiple and/or more frequent diseases such as *CEP290/BBS14* implicated in Leber congenital amaurosis (MIM #611755), Senior Loken (MIM# 610189) and other ciliopathies (Supplementary Table S2). No data could be observed for 3 genes (*BBS12*, *BBS21*, and *BBS23*). Within the 76 studies, considering each cellular/organism model has one experiment there is a total of 197 experiments carried out that concerned multiple species (49% human, 39% mouse, 11% zebrafish, 1% *C. elegans*) and multiple tissues (30% skin, 26% retina, 12% kidney 9% stem cells, 3% brain, 2% neurons, 1% adipose tissue, 1% neural tube and others). The authors used multiple techniques to induce the mutant or specific variant (42% knockout, 17% knockdown siRNA, 6% overexpression, 6% morpholinos) but also cells harboring the variant natively (27%) (Supplementary Figure 1). Overall, ciliogenesis (i.e. presence or absence of ciliated cells) was explored in 72% of the experiments, cilia length in 55% and only few studies explored the possible SHH pathway defects (19%). Cell proliferation was studied in only two articles (**Figure 1**). Different experimental conditions including indirect measures made it difficult to draw conclusions about the effect of a *BBS* gene on primary cilia and cell phenotype. For example, *BBS1* experiments might give opposite conclusions for ciliated cells (less or no change) and for cilia length (longer or shorter) depending on the species used (e.g. mouse or human).

This prompted to systematically study the 3 cilia related parameters (ciliogenesis, cilia length, SHH signalling pathway) as well as cell proliferation on skin fibroblasts from a selection of BBS patients. We selected genes from each *BBS* compartment including the BBSome, the chaperonin-like complex and the IFT complex. For the BBSome, we selected the most frequently mutated gene, *BBS1,* by selecting 4 patients including 2 homozygous for the recurrent pathogenic variant (c.1169T>G), one truncating splice variant and one compound heterozygous case. Regarding the chaperonin-like complex, we selected 4 patients of the most frequent gene, *BBS10*, including 3 homozygous of the 2 most frequent variants (c.271dupT and c.145C>T) and one compound heterozygous of the same variants. For the IFT complex, patients are much rarer and we selected 2 *IFT172/BBS20* patients (Supplementary Table S4). This strategy should allow us to reduce the experimental variability and start delineating gene effects on the ciliary phenotype in patient's cells. We first applied the experiments to a selection of 5 controls to determine the basic conditions for ciliary cell phenotypes in normal cells.

Normal cilia phenotype and cell proliferation in control cells

To analyze primary cilia assembly and length in human skin fibroblasts, ciliogenesis was induced by using serum-starvation-mediated cell-cycle arrest in confluent fibroblasts from controls and the patients and visualized primary cilium by immunostaining with antibodies

raised against ARL13B and acetylated γ tubulin for the basal body. To determine the normal state of ciliogenesis and cilium length, five control samples were investigated. No significant differences were observed between them, they had all more than 60% of their cells ciliated (**Figure 2B**), and they all have primary cilium of the same length 3–4 µm (**Figure 2A and C**).
To determine the normal state of the SHH pathway activity with a functional primary cilium, a smoothened agonist (SAG) was used to activate the SHH signaling with and without inducing ciliogenesis. The expression levels of *GLI1* and *PTCH1* (two SHH target genes) in response to SHH pathway activation were evaluated as a marker of SHH activity. Five controls were used, four of them (except control 2) showed, as expected, a robust and significant induction of SHH target genes, *GLI1* and *PTCH1* in ciliogenesis conditions (0.1% FCS) (**Figure 2 D and E**).
Lastly, the cell proliferation assay showed that 4 of the 5 controls had the same proliferation capacity, with all cells proliferating at the same rate over the 9 days, with the exception of control 2, which showed slightly lower proliferation than the others (**Figure 3**). This is the same control that showed no activation of the SHH signaling pathway, an example of the physiological variability between cells, even if they are assumed to have a normal profile.
As controls have the same ciliary and cellular phenotype in general, they were pooled for comparison with the phenotype of BBS patient's skin fibroblasts.

Non-functional BBS1 leads to reduced ciliogenesis of longer cilia, a less active SHH pathway and variable effects on cell proliferation

Immunofluorescence analysis of the *BBS1* patients' skin-derived fibroblasts revealed that these cells had cilia anomalies. Indeed, when grown in ciliary conditions (0.1% FCS), three of the four *BBS1* patient's cells developed significantly fewer primary cilia (~50% vs 70%) compared to controls (**Figure 4B**). Moreover, a significant difference in cilia length could be observed. The same three *BBS1* patient's cells harbored cilia significantly longer than those of controls (5-8 µm vs. 3-4 µm) (**Figure 4A and C**). Only *BBS1(3)* has a normal percentage of ciliated cells and normal cilia length.
By contrast, a strongly reduced response to the SMO ligand was observed in all *BBS1* patients' cells, revealed by a reduction of the SHH target genes' expression under the same conditions (**Figure 4D and E**). As almost no signal was detected in the patient's fibroblasts, SHH pathway activation was significantly less important in the patient's cells.
Regarding the proliferation capacity, *BBS1(2)* and *BBS1(4)* showed no difference with controls which contrasted with *BBS1(1)* and *BBS1(3)* that showed greater proliferative capacity than controls and the other two *BBS1* patients (**Figure 5**)
In general, *BBS1* variants led to a significant decrease of cilium formation, a longer cilia length with a less activated SHH pathway and a variable effect on cell proliferation. These results indicate that a functional BBS1 protein is important for normal cilia formation and function in fibroblast cells.

Non-functional BBS10 has no effect on ciliogenesis but results in longer cilia, a less active SHH pathway and variable effects on cell proliferation.

Immunofluorescence analysis of the *BBS10* patients' skin-derived fibroblasts revealed a normal number of ciliated cells (70-80%) when compared to controls in ciliary conditions (0.1% FCS) (**Figure 6B**). However, a significant difference in cilia length could be observed. The four *BBS10* patient's cells harbored cilia significantly longer than those of controls (5-9 µm vs. 3-4 µm) (**Figure 6A and C**).

In line with this, a strongly reduced response to the SMO ligand was observed in all *BBS10* patients' cells, revealed by a reduction of the SHH target genes' expression under the same conditions (**Figure 6 D and E**). Since no signal was detected for *PTCH1* expression and *GLI1* expression is very insignificant in-patient fibroblasts, activation of the SHH pathway was significantly lower in patient cells.
Proliferation capacity of three of the four *BBS10* patients is the same as the controls, in contrast *BBS10 (3)* patients' fibroblasts show greater proliferative capacity than controls and the other three *BBS10* patients (**Figure 7**).
BBS10 variants had no effect on cilium formation, in contrast they led to a longer cilia length with a less activated HH pathway and a variable effect on cell proliferation.

Non-functional IFT172 has no effect on ciliogenesis, variable effect on cilium length, SHH pathway activation and on cell proliferation

Immunofluorescence analysis of the *IFT172* patients' skin-derived fibroblasts revealed a normal number of ciliated cells (70–80%) compared to controls under ciliary conditions (0.1% FCS) (**Figure 8B**). Additionally, a variable effect on cilia length could be observed with one patient, *IFT172(1)*, showing normal cilia length (3–4 µm), and on patient, *IFT172(2)*, showing shorter cilia (2–3 µm) (**Figure 8A and C**).
In contrast with those results, *IFT172(1)*, had significantly lower activation of the SHH pathway compared with controls as no signal could be detected for *PTCH1* and *GLI1* while *IFT172(2)*, had significantly higher *PTCH1* and *GLI1* expression, indicating a greater SHH pathway activation compared with controls (**Figure 8D and E**). These data indicated an alteration of the SHH pathway in the patient's fibroblasts with variable effects as for cilia length caused by unfunctional IFT172 protein.
The proliferative capacity of fibroblasts from *IFT172(1)* patients is reduced compared with controls, while that of *IFT172(2)* and *IFT172(3)* patients is much greater (**Figure 9**).
IFT172 variants had no effect on ciliogenesis, in contrast they led to variable cilia length with a less or more activated SHH pathway and a variable effect on cell proliferation.

DISCUSSION

Bardet-Biedl syndrome is a rare autosomal recessive ciliopathy caused by primary cilia alteration. All the proteins encoded by the 26 known BBS genes are localized to the base of the primary cilium or involved in the function or formation of this organelle (Novas et al., 2015). Owing to this, defects in cilia have been reported early on (Blacque et al., 2004) and from time to time either while reporting a novel association to a disease or deciphering the BBS protein function (Loktev et al., 2008; Wormser et al., 2019). With the extensive use of sequencing techniques since many years for patients with a ciliopathy phenotype many variants have been identified including a large part are pathogenic or likely pathogenic (He et al., 2020; Shaheen et al., 2016) but for many cases current data is insufficient, leaving those as variant of uncertain significance (VUS) as proposed by the ACMG guidelines (Richards et al., 2015). Eventually, additional data such as recurrence or strong and/or repeated segregation will help to reclassify those variants but most of the time those variants will require functional data (Marwaha et al., 2022). Functional test with medical implication requires proper definition and thus prompted us to design this study. The aim of our study was to develop a robust functional assay that could distinguish between healthy controls and BBS patients. In the course of this project other studies have been carried out to develop such approach, for example, on primary ciliary dyskinesia using beating cilia measurements (Blanchon et al., 2020) or on skeletal ciliopathies (Doornbos et al., 2021) with similar parameters as this study. Beside this first objective, we were also interested in knowing whether difference existed in the ciliary phenotype of different BBS genes or for the same BBS gene but with different variant or even for the same variant.

Analysis of published data showed a great variability in ciliary phenotype explored, gene results depending on variations type, species and cell type. In addition, only few studies have been carried out on patients' skin derived fibroblasts. Setting up our experimental conditions on 5 healthy controls allowed us to estimate the consistency of this approach before testing patients. We performed experiments to study ciliogenesis (proportion of ciliated cells in a given cell population), cilia length, the activation of the SHH signaling pathway and cell proliferation on a selection of 5 unrelated controls to characterize a "healthy ciliary phenotype", to which we can compare the ciliary phenotype of 10 selected BBS patients (4 *BBS1*, 4 *BBS10* and 2 *IFT172*). Controls show consistent results, with the same percentage of ciliated cells >70%, cilium length 3–4 µm, same normal levels of *GLI1* and *PTCH1* expression in response to HH pathway activation, and same capacity for cell proliferation. These comparable and reproductible data enable us to characterize a "healthy cilium phenotype", allowing us to pool controls and provide a good basis for comparing patients' results.

Patient selection was based on our interest in studying cilium phenotype caused by several genes belonging to the three compartments related to BBS: the BBSome, the chaperonin-like complex and the IFT complex. As a representative of the BBSome, we chose BBS1 (the most frequently mutated gene in this complex and in the disease), selecting 2 homozygous patients with the most frequent pathogenic variant (c.1169T>G, p.M390R) (Mykytyn et al., 2002), a homozygous truncating missense (c.479G>A, p.R160Q) with a splice effect (Redin et al., 2012; Schmid et al., 2011) and lastly a compound heterozygous for the p.M390R and a truncating mobile element insertion in *trans* (Delvallée et al., 2021). Our results show at least a ciliary defect in one of the 3 assays, all showed an impaired SHH pathway (consistent reduced activation) and in 3 of the 4 *BBS1* patients fewer ciliated cells and longer cilia, with the exception of the *BBS1(3)* patient who had a normal number of cilia with normal length. The

differences observed in the ciliary phenotype of *BBS1(3)* patient compared to the others is an example that illustrates the biological variability of cell lines, showing that even if two patients have the same variant in the same gene, they can have different pathophysiological impact. This has been already demonstrated for the c.1169T>G variant as it is also known to cause nonsyndromic RP (Estrada-Cuzcano et al., 2012) but in our patient no significant phenotype differences can be noted (Supplementary Table S4) irrespective of the *BBS1* genotype. Nevertheless, genetic background can have an impact on the patient or the cellular phenotype. Genetic interactions can lead to variability in phenotypic outcomes (Costanzo et al., 2019; Domingo et al., 2019) and we have already shown that BBS has a complex genetic architecture with a burden of secondary site ultra-rare variants (Kousi et al., 2020). Several examples have already been exposed in ciliopathies (Khanna et al., 2009; Zaki et al., 2011). In our study, no whole genome exploration has been performed for these patients but a systematic sequencing analysis including patients with similar genes/variations and controls such as in gnomAD might help deciphering such genetic interactions (Karczewski et al., 2020; Rahit and Tarailo-Graovac, 2020). However, stochastic events by modifying gene expression might also play role (Burga et al., 2011; Burga and Lehner, 2012).
Nine studies representing 14 experimental models were carried out on Knock-out and Knock-down cell models *in vitro*, e.g. on hTERT-RPE1 (human immortalized retinal pigment epithelial-1), mouse skin fibroblasts, cells from zebrafish Kupffer vesicles and others, or on iPSC models derived from neural cells. The results of these studies show that BBS1 defects lead to alterations in the primary cilium, but they lack repeated results on ciliogenesis (only 3 reports out of 14) and they show mixed results on cilia length (9/14) with shorter (n=6), longer (n=2) and no change (n=1). These alterations are quite variable and change depending on the experimental conditions such as species (human, mouse, zebrafish), cell harvest tissue (neural tube, adipose tissue, skin, lung) and the technology used to introduce the mutation (siRNA, KO, KD, MO) (Castro-Sánchez et al., 2019; Nozaki et al., 2018; Wang et al., 2021). Despite discrepancies between the published results and the absence of results on patient's derived-skin fibroblasts, we demonstrated that a defective BBS1 is responsible of a ciliary phenotype. BBS1 plays an essential role in the BBSome formation and maintenance (Prasai et al., 2020; Singh et al., 2020) which is important for tubulin transport through the IFT and may alter ciliary length homeostasis (Anvarian et al., 2019; Hernandez-Hernandez et al., 2013). Interestingly, our recent work on one *BBS5* patient using also skin fibroblasts demonstrated the exact same effect on the cilia (Karam et al., 2023). BBS5 is also a member of the BBSome and our results suggest that maybe all BBSome members will present the same type of ciliary anomalies. This will of course need additional support.

Regarding the chaperonin-like complex, all *BBS10* cell lines showed the same ciliary phenotype with a normal number of ciliated cells, longer cilia and less activated SHH pathway. In the literature, the only study implicating human *BBS10* derived-skin fibroblasts highlighted the exact same results (Hey et al., 2021) strengthening our data. We suggest that irrespective of its variants type, a mutated *BBS10* gene will systematically lead to identified cellular phenotype. Considering the other members of the chaperonin-like complex, for *BBS6/MKKS* a few studies (n=8 for 11 experiments) identified mainly no change (1/11) or less (5/11) ciliated cells, no effect on cilia length (1/11) or shorter cilia (6/11) while no experiment has evaluated the SHH pathway. For example, a study carried out on *Bbs6*$^{-/-}$ KO RPE (retinal pigment epithelium) mice cells and on *BBS6* KD (siRNA) hTERT-RPE1 cells showed less ciliated cells and shorter cilia for both cell types without any information on the SHH pathway activation

(Patnaik et al., 2019). The only study carried out on *BBS12*, KD (siRNA) on RPE mice cells observed an increased number of ciliated cells, with no information on cilia length and SHH pathway activation (Loktev et al., 2008). Given the experimental variability, no conclusions can be extrapolated for the other chaperonin-like genes and will require further testing.

In accordance with the three *IFT172* patients already reported in the literature (Halbritter et al., 2013), our two *IFT172/BBS20* patients showed a normal number of ciliated cells. In contrast, the cilia length results of our 2 patients are not consistent with either no effect or shorter cilia. This variability of cilia length is also observed in the literature, a study carried out on *Ift172*$^{-/-}$ mice fibroblasts showed shorter cilia (Jm et al., 2011) and the study carried out on skin-derived fibroblasts of *IFT172* patients showed longer cilia (Halbritter et al., 2013). Interestingly the SHH assay showed again discrepancy between our 2 cell lines with either a reduced activation or an increased activation. SHH pathway has never been tested so far in human but mice experiments highlighted a major role for IFT172 in SHH signaling (Huangfu and Anderson, 2005). IFT172 is the largest IFT protein and an important component of the IFT-B complex. The situation is even more complex for this gene as it has been implicated in several ciliopathies including Mainzer-Saldino Syndrome, BBS, Joubert syndrome but also nonsyndromic RP (Zheng et al., 2023). No specific genotype to phenotype correlation is known prompting additional testing for ciliogenesis effect and variant cases.

Altogether, each patient cell lines had at least a defect in one cilium related parameter, more likely a defect in the SHH pathway, followed by cilia length and eventually ciliogenesis (Table 1). This demonstrates once again that this information is reliable for variant analysis, but that all possible variants and genes need to be systematically tested. Interestingly, taking into account both cilia length and SHH pathway activation we can observe that longer cilia correlate with reduced SHH pathway activation and, conversely, that shorter cilia correlate with greater SHH pathway activation. This observation suggests a possible compensation between cilium length and SHH pathway activation. We suggest that when the cilium is longer, the SHH pathway may start with strong activation and end up being reduced to maintain a normal state at the cell level, and that when the cilium is shorter, there is not enough receptors to allow normal activation of the pathway, which over-activates to compensate for the lack. Further investigations will be required to confirm this observation and speculation. Concerning the cell proliferation assays, almost all controls had the same proliferation capacity, contrasting with our defective genes (*BBS1*, *BBS10* and *IFT172*). Some had a similar proliferation capacity as controls, others showed reduced or increased proliferation capacity compared to controls. These finding suggest that the alteration of the ciliary phenotype does not systematically alter cell proliferation capacity preventing us to systematically use this in the future to discriminate between patients and controls.
Frequency of ciliated cells and primary cilium length require intensive and repetitive microscopy experiments (n=400 cells for each experiments repeated multiple times) which are time-consuming, especially for the study of large cohorts of patients such as the one presented here. All the analysis of cilium length and number of ciliated cells presented in this study were done manually, which is very time-consuming especially with the big number of control and patients characterized. Another advantage of automation is increasing reproducibility and robustness of such analysis overtime as well as high throughput (Doornbos et al., 2021). To partially solve this problem, we first used the IncuCyte S3 (Sartorius) that allows automatic image capture on 24-well plates. In addition, we have developed a macro

using the Fiji image-processing package for automated cilia detection and length measurement. To evaluate the efficiency of our macro, we compared the results of the same batch of images analysed manually and automatically (Supplementary methods). The software was able to detect significant differences in mean cilia length between control and patient identifying correctly longer cilia. In absolute terms, the length of cilia detected in controls and patients was 1 or 1.5µm greater than what was found manually. To further improve this pipeline, image quality and resolution needs to be drastically improved as the IncuCyte objective is too restricting (20X). Several studies have been carried out to develop such approach. In particular a recent study reported the ALPACA software that has been developed with the same objective (Doornbos et al., 2021) and was able to distinguish between healthy controls and patients of several ciliopathies.

CONCLUSION

In this study, we present a systematic approach to study the ciliary phenotype of BBS patients' cells carrier of biallelic pathogenic variants in 3 BBS genes representative of the 3 subcomplexes of the disease (BBSome, chaperonin-like and IFT complex). This pilot study will call for other BBS genes and variations characterization in order to obtain a more complete map of ciliary anomalies. Our results show that systematic analysis of the cilia phenotype is a robust functional test that allows us to distinguish healthy controls from ciliopathy patients.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL

Data generated or analysed during this study are included in the published article and the corresponding supplementary data.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patients and their family for their participation. We would like also to acknowledge the members of the laboratoire de génétique médicale for stimulating discussion and for technical assistance, especially Cathy Obringer.

FUNDING

This work was supported by the following grants: Agence de la biomédecine “AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique 2022”,
PHRC National Bardet-Biedl 2007 IDRCB 2007-A00868-45,
COBBALT (COhorte de Recherche Translationnelle sur le syndrome de Bardet-Biedl et le syndrome d’ALstrom),
CREGEMES (Centre Régional de Génétique Médicale de Strasbourg) and the following institutions: University of Strasbourg and Strasbourg University Hospital.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

TABLES AND FIGURES

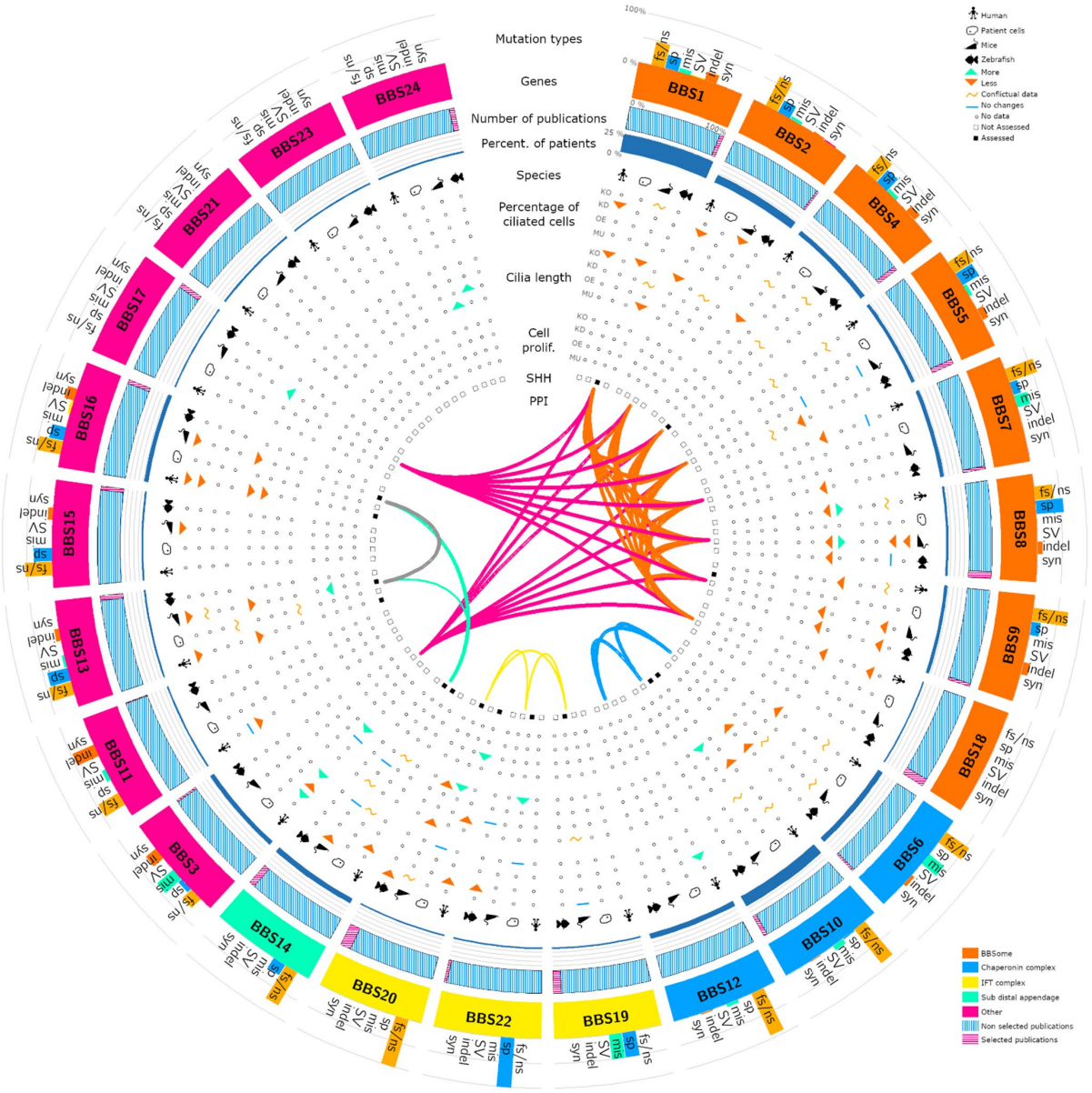


Figure 1. A circos plot representing the collected data for BBS genes. Data collected during the literature search is summarized by presenting the results obtained for the four experiments (e.g. ciliogenesis, cilium length, SHH pathway and cell proliferation assays), specifying the species and the mutation induction technique. Green arrow indicates an “increased” criteria and orange arrow a “decreased” criteria. Ambiguous results are marked by a yellow “~” and no change are indicated using a blue “-”. BBS genes are color-coded according to the protein complexes to which they belong: BBSome (orange), chaperonin-like (blue) and IFT (yellow). Genes with no specific complex are in pink and *BBS14* in green (sub distal appendage). Protein-protein interactions are represented as connecting arcs in the center of the circos plot. We used the Color Universal Design (CUD) proposed by Mastaka Okabe and Kei Ito. For each gene, we have represented the different types of variants (histogram on the outer circle), the gene contribution to BBS patients and the number of publications identified (dashed blue lines are not retained while dashed red are of interest).

Abbreviations: KO: knock-out, KD: knock-down, OE: overexpression, MU: , PPI: protein-protein interaction, fs/ns: frameshift/nonsense, sp: splice, mis: missense , SV: structural variant, indel: insertion/deletion, syn: synonymous.

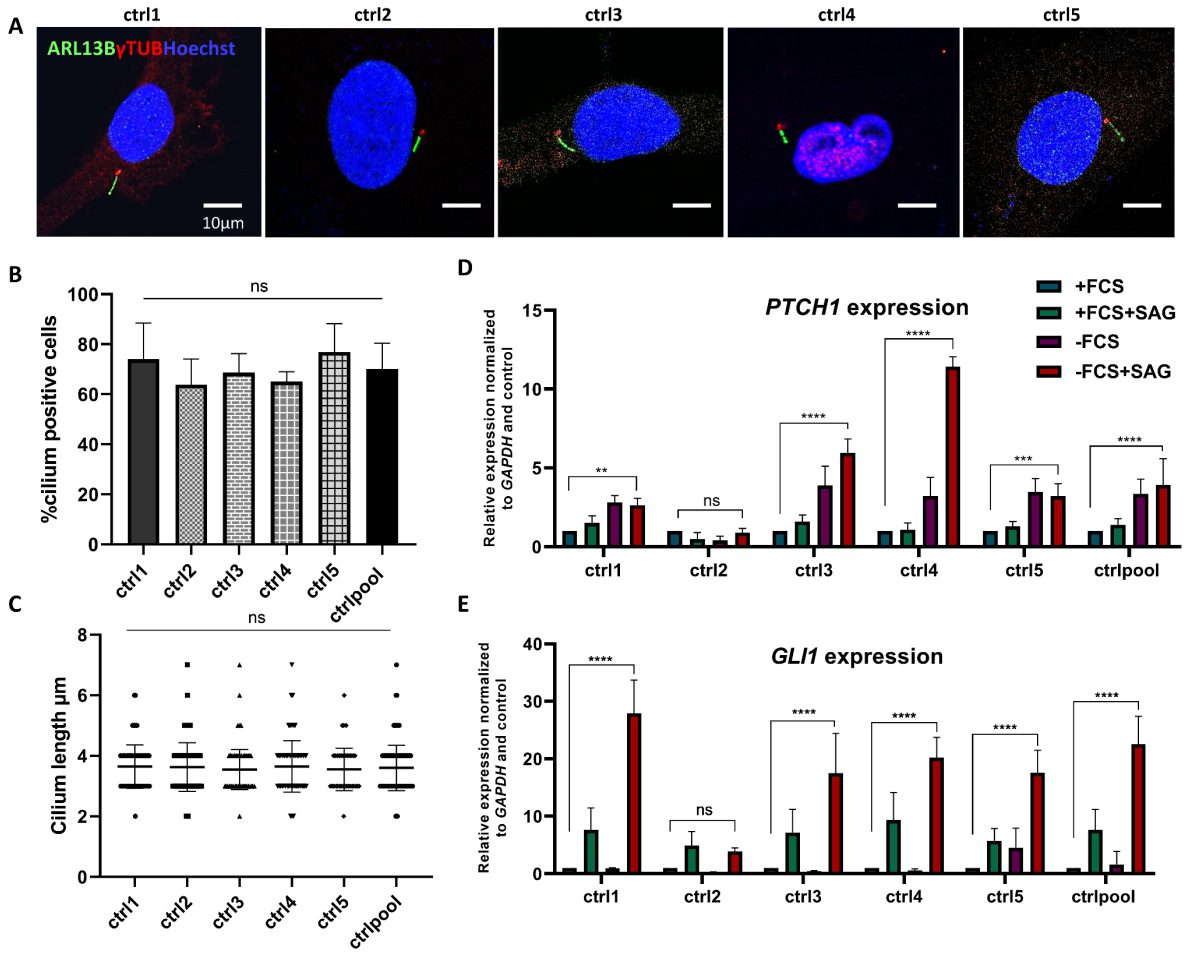


Figure 2. Functional assessment of *BBS1* variations/Ciliary defects due to *BBS1* variants in patient skin fibroblasts. (**A**) Representative images of ciliogenesis in skin-derived fibroblasts from controls and the patient. Primary cilia were labeled with an anti-ARL13B antibody (green) and the basal body with anti-γ-Tubulin antibody (red) while the nucleus was visualized with Hoechst staining (blue). Images were taken with an inverted confocal fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). Scale bars 10 µm. (**B**) Ciliated cells were counted on serum-deprived (48 h) controls and the patient's skin-derived fibroblasts fixed for immunofluorescence and stained with an anti-ARL13B (green) antibody. Images were taken with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing a combined visualization of phase (cells) and fluorescence (cilia). (**C**) Percentage of patient's skin fibroblasts with cilia calculated by dividing primary cilia counts by cellular counts (n = 400 cells analyzed for each of the controls and the patient). p-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA, ns: non-significant, ****: $p < 0.0001$. (**D**) Quantification of primary cilia length (n = 400 cells analyzed for each of the controls and patient). p-values and significance were determined using the Kruskal-Wallis test ****: $p < 0.0001$. In (**C**, **D**), the measured number of cilia (n) represents pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment. (**E**, **F**) Assessment of SHH-signal transduction by quantification of the induction of two SHH target genes *PTCH1* (**E**) and *GLI1* (**F**) on SHH-stimulated cells from controls and the patient in four different conditions, with and without inducing ciliogenesis (+/- FCS) and SHH activation (+/- SAG). The expression of both genes is normally induced in controls except in control 2, whereas no induction is found in the patient test. The expression data performed with biological triplicates were normalized to the reference gene *GAPDH* mRNA expression data, and the values were presented as relative expression levels +/- SEM). p-values and significance were determined using 2-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ns: non significant, **: $p < 0.01$ ****: $p < 0.0001$.

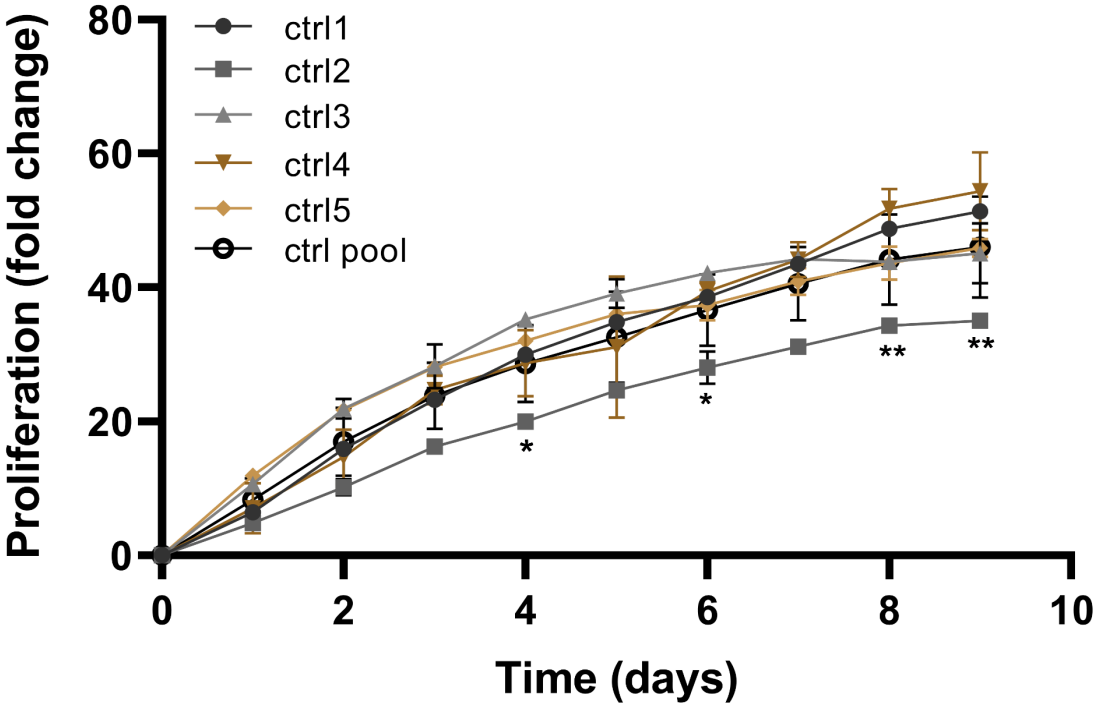


Figure 3. Proliferation test of controls skin-fibroblasts. Proliferation curve of primary skin fibroblasts from healthy controls. The analysis was performed with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing to evaluate the proliferation of cells in 24-well plats in time (9 days). Values are reported as the mean ± SEM from 3 independent experiments. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (*: $p < 0.1$, ****: $p < 0.0001$)

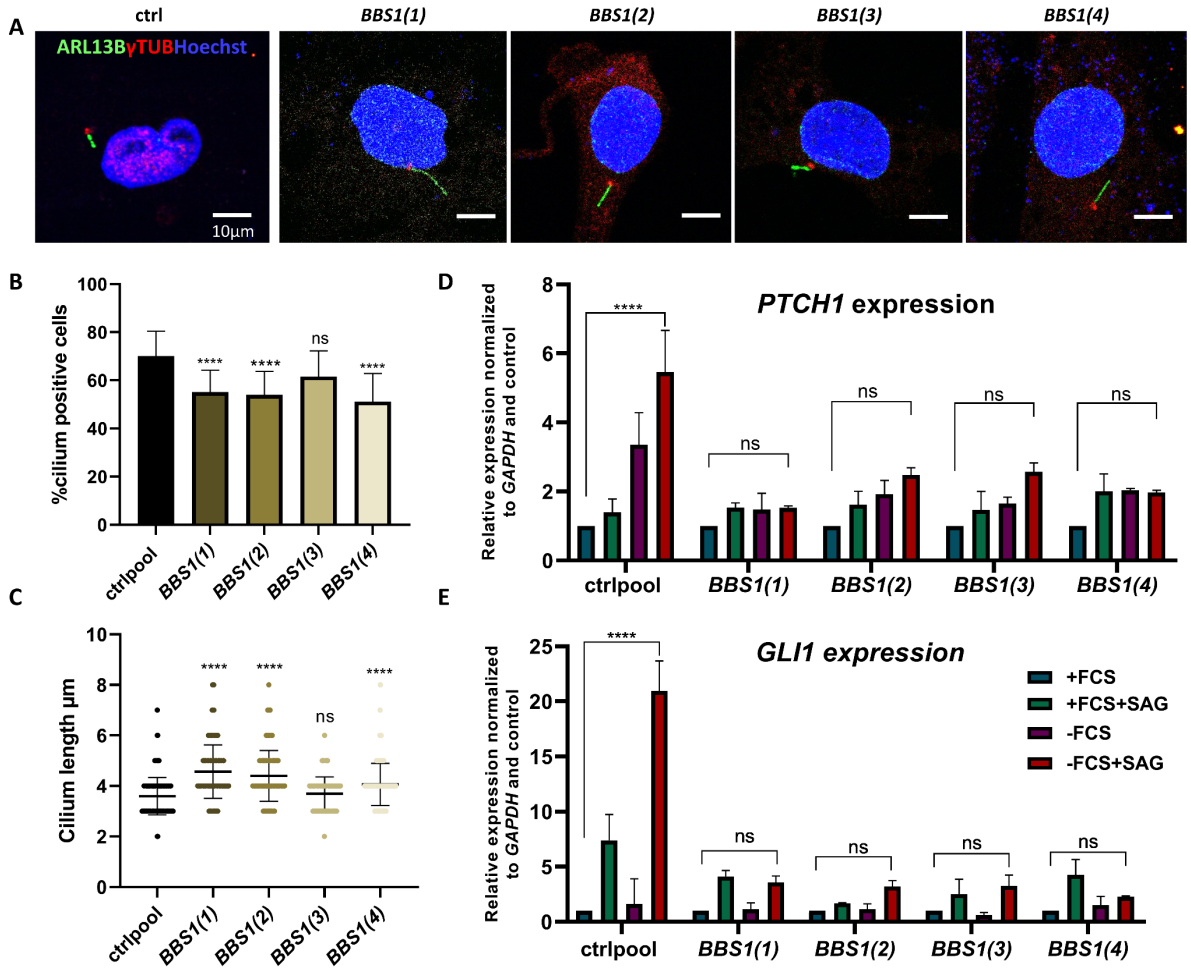


Figure 4. Functional assessment of *BBS1* variations/Ciliary defects due to *BBS1* variants in patient skin fibroblasts. (**A**) Representative images of ciliogenesis in skin-derived fibroblasts from controls and patients. Primary cilia were labeled with an anti-ARL13B antibody (green) and the basal body with anti-γ-Tubulin antibody (red) while the nucleus was visualized with Hoechst staining (blue). Images were taken with an inverted confocal fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). Scale bars 10 µm. (**B**) Ciliated cells were counted on serum-deprived (48 h) controls and the patient's skin-derived fibroblasts fixed for immunofluorescence and stained with an anti-ARL13B (green) antibody. Images were taken with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing a combined visualization of phase (cells) and fluorescence (cilia). (**C**) Percentage of patient's skin fibroblasts with cilia was calculated by dividing primary cilia counts by cellular counts (*n* = 400 cells analyzed for each of the controls and the patient). *p*-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA, ns: non-significant, ****: $p < 0.0001$. (**D**) Quantification of primary cilia length (*n* = 400 cells analyzed for each of the controls and patient). *p*-values and significance were determined using the Kruskal–Wallis test ****: $p < 0.0001$. In (**C**, **D**), the measured number of cilia (n) represents pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment. (**E**, **F**) Assessment of SHH-signal transduction by quantification of the induction of two Hh target genes *PTCH1* (**E**) and *GLI1* (**F**) on SHH-stimulated cells from controls and the patient in four different conditions, with and without inducing ciliogenesis (+/- FCS) and SHH activation (+/- SAG). The expression data performed with biological triplicates were normalized to the reference gene *GAPDH* mRNA expression data, and the values were presented as relative expression levels +/- SEM). *p*-values and significance were determined using 2-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ns: non significant, **p<0.01 ****p<0.0001.

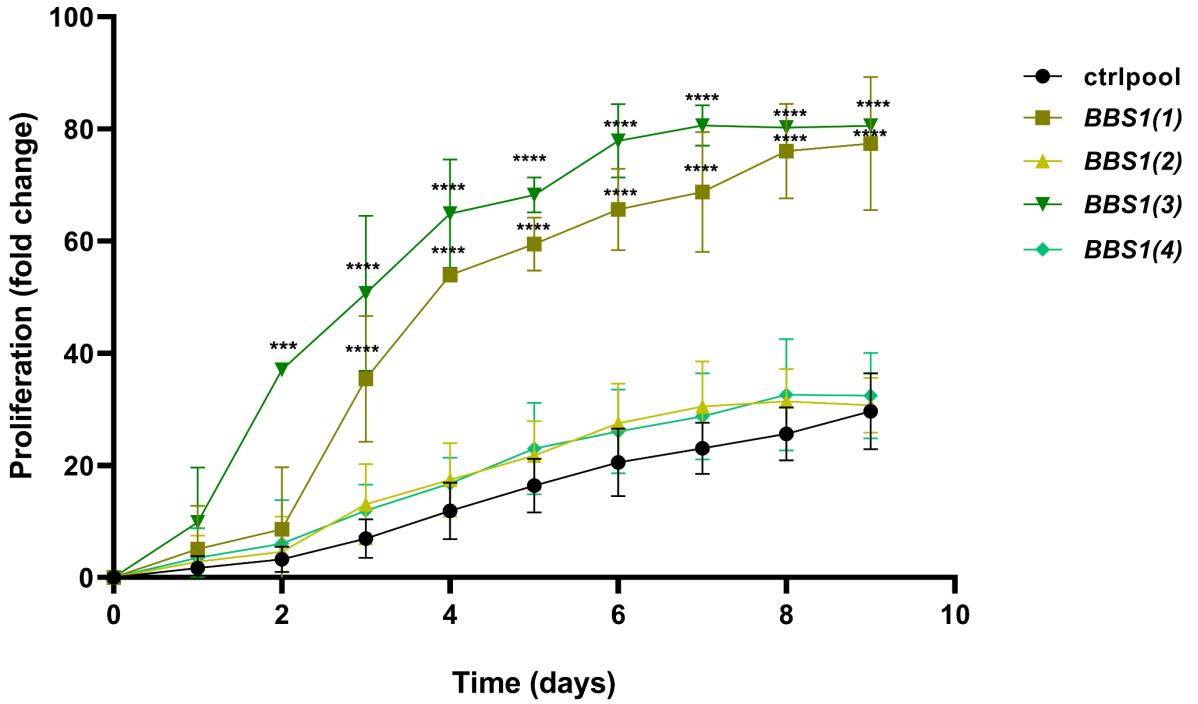


Figure 5. Proliferation test of *BBS1* patients' skin-fibroblasts. Proliferation curve of primary skin fibroblasts from the patients and unrelated healthy controls. The analysis was performed with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing to evaluate the proliferation of cells in 24-well plats in time (9 days). Values are reported as the mean ± SEM from 3 independent experiments. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (*: $p < 0.1$, ****: $p < 0.0001$).

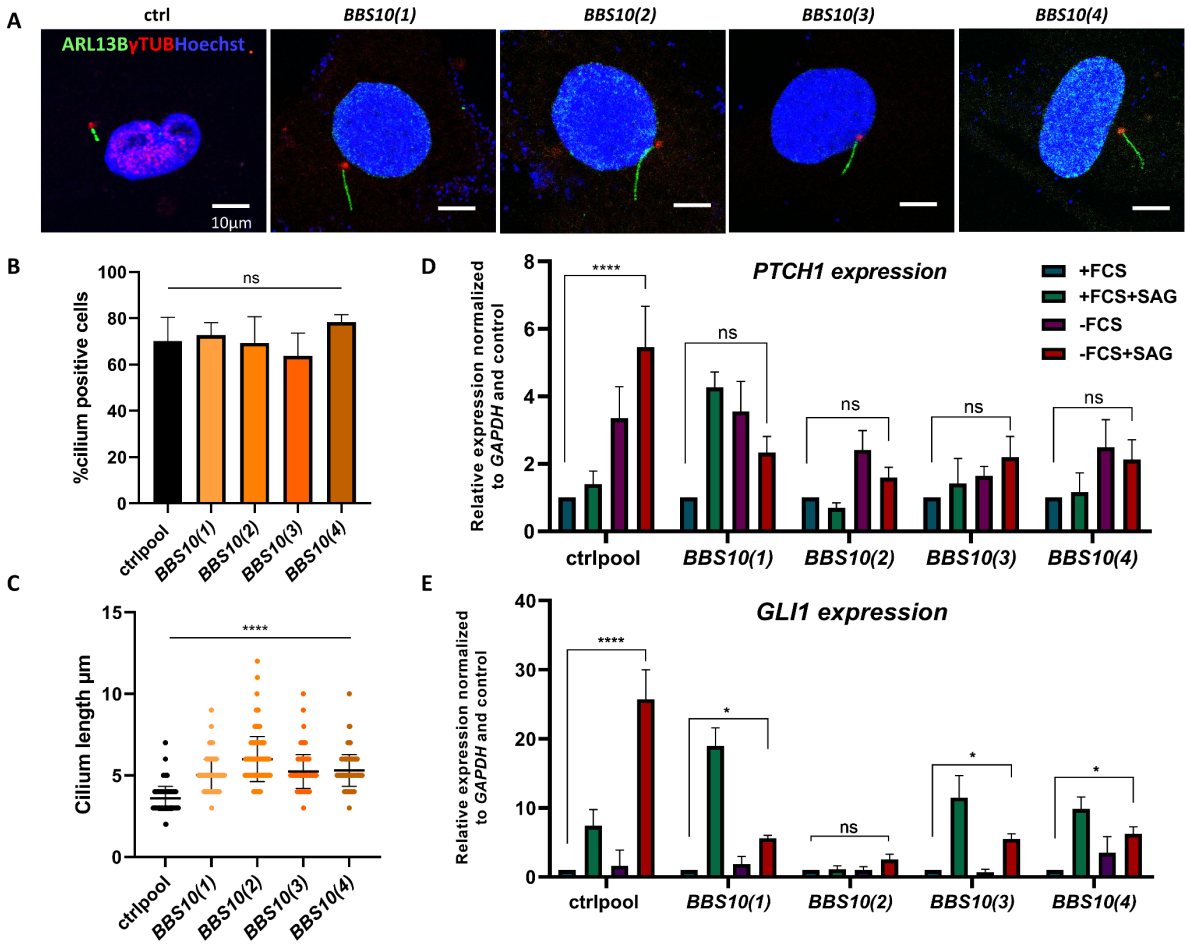


Figure 6. Functional assessment of *BBS10* variations/Ciliary defects due to *BBS10* variants in patient skin fibroblasts. (**A**) Representative images of ciliogenesis in skin-derived fibroblasts from controls and the patient. Primary cilia were labeled with an anti-ARL13B antibody (green) and the basal body with anti-γ-Tubulin antibody (red) while the nucleus was visualized with Hoechst staining (blue). Images were taken with an inverted confocal fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). Scale bars 10 µm. (**B**) Ciliated cells were counted on serum-deprived (48 h) controls and the patient's skin-derived fibroblasts fixed for immunofluorescence and stained with an anti-ARL13B (green) antibody. Images were taken with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing a combined visualization of phase (cells) and fluorescence (cilia). (**C**) Percentage of patient's skin fibroblasts with cilia was calculated by dividing primary cilia counts by cellular counts (*n* = 400 cells analyzed for each of the controls and the patient). *p*-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA, ns: non-significant, ****: $p < 0.0001$. (**D**) Quantification of primary cilia length (*n* = 400 cells analyzed for each of the controls and patient). *p*-values and significance were determined using the Kruskal–Wallis test ****: $p < 0.0001$. In (**C**, **D**), the measured number of cilia (n) represents pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment. (**E**, **F**) Assessment of Hh-signal transduction by quantification of the induction of two Hh target genes *PTCH1* (**E**) and *GLI1* (**F**) on Hh-stimulated cells from controls and the patient in four different conditions, with and without inducing ciliogenesis (+/- FCS) and Hh activation (+/- SAG). The expression data performed with biological triplicates were normalized to the reference gene *GAPDH* mRNA expression data, and the values were presented as relative expression levels +/- SEM). *P* values and significance were determined using 2-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ns: non significant, **: $p < 0.01$ ****: $p < 0.0001$.

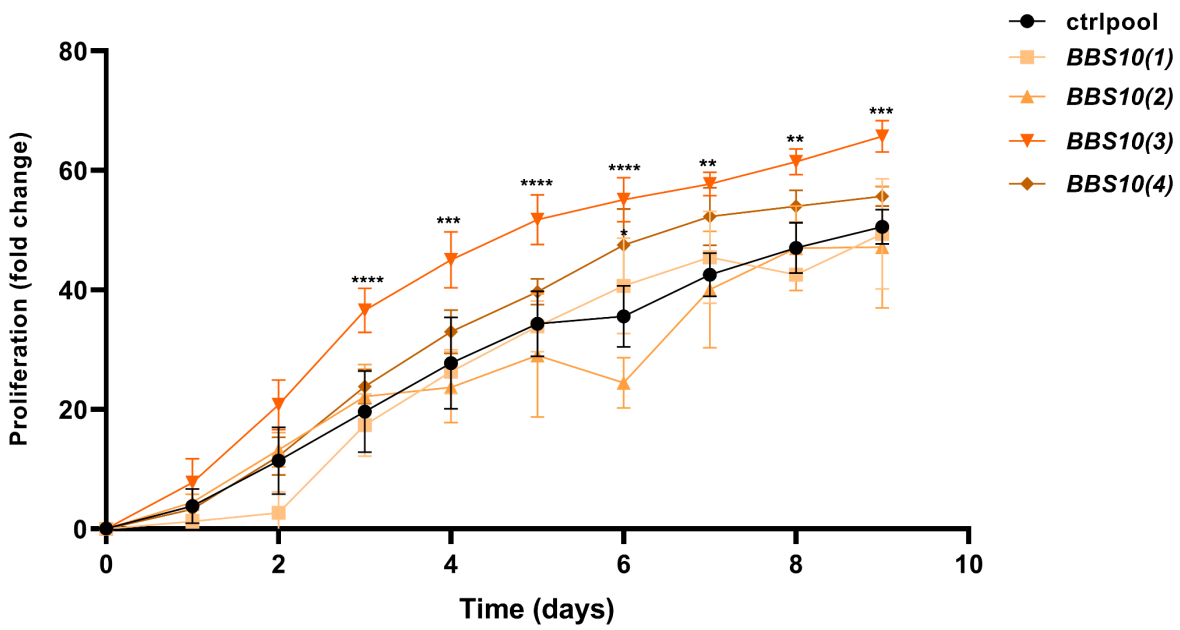


Figure 7. Proliferation test of *BBS10* patients' skin-fibroblasts. Proliferation curve of primary skin fibroblasts from the patients and unrelated healthy controls. The analysis was performed with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing to evaluate the proliferation of cells in 24-well plats in time (9 days). Values are reported as the mean ± SEM from 3 independent experiments. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (*: $p < 0.1$, ****: $p < 0.0001$).

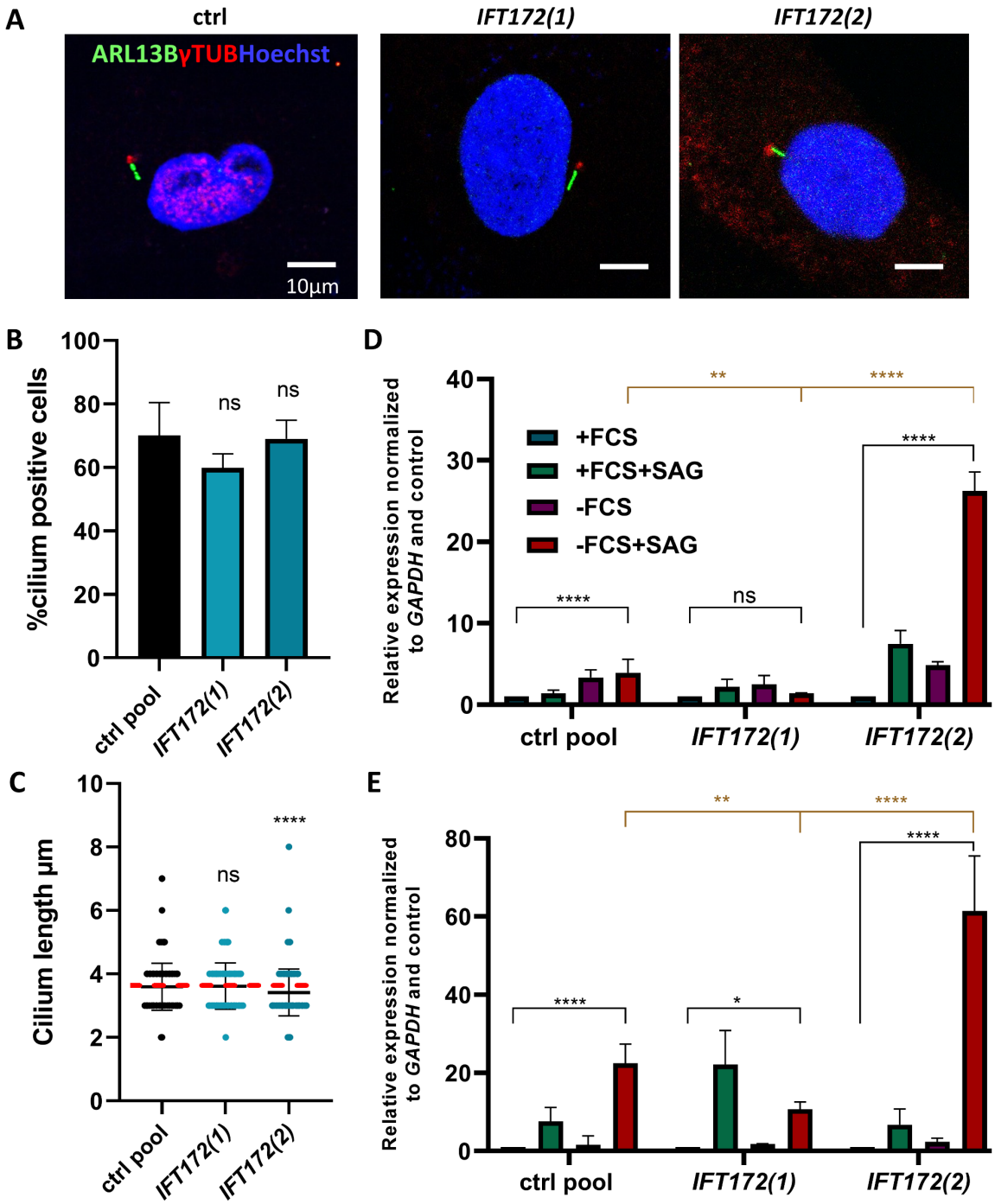


Figure 8. Functional assessment of *IFT172* variations/Ciliary defects due to *IFT172* variants in patient skin fibroblasts. (**A**) Representative images of ciliogenesis in skin-derived fibroblasts from controls and the patient. Primary cilia were labeled with an anti-ARL13B antibody (green) and the basal body with anti-γ-Tubulin antibody (red) while the nucleus was visualized with Hoechst staining (blue). Images were taken with an inverted confocal fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). Scale bars 10 µm. (**B**) Ciliated cells were counted on serum-deprived (48 h) controls and the patient's skin-derived fibroblasts fixed for immunofluorescence and stained with an anti-ARL13B (green) antibody. Images were taken with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing a combined visualization of phase (cells) and fluorescence (cilia). (**C**) Percentage of patient's skin fibroblasts with cilia was calculated by dividing primary cilia counts by cellular counts (n = 400 cells analyzed for each of the controls and the patient). p-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA, ns: non-significant, ****: $p < 0.0001$. (**D**) Quantification of primary cilia length (n = 400 cells

analyzed for each of the controls and patient). *p*-values and significance were determined using the Kruskal–Wallis test ****: $p < 0.0001$. In (**C**, **D**), the measured number of cilia (n) represents pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment. (**E**, **F**) Assessment of SHH-signal transduction by quantification of the induction of two SHH target genes *PTCH1* (**E**) and *GLI1* (**F**) on SHH-stimulated cells from controls and the patient in four different conditions, with and without inducing ciliogenesis (+/- FCS) and SHH activation (+/- SAG). The expression data performed with biological triplicates were normalized to the reference gene *GAPDH* mRNA expression data, and the values were presented as relative expression levels +/- SEM). *p*-values and significance were determined using 2-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ns: non significant, **: $p < 0.01$ ****: $p < 0.0001$.

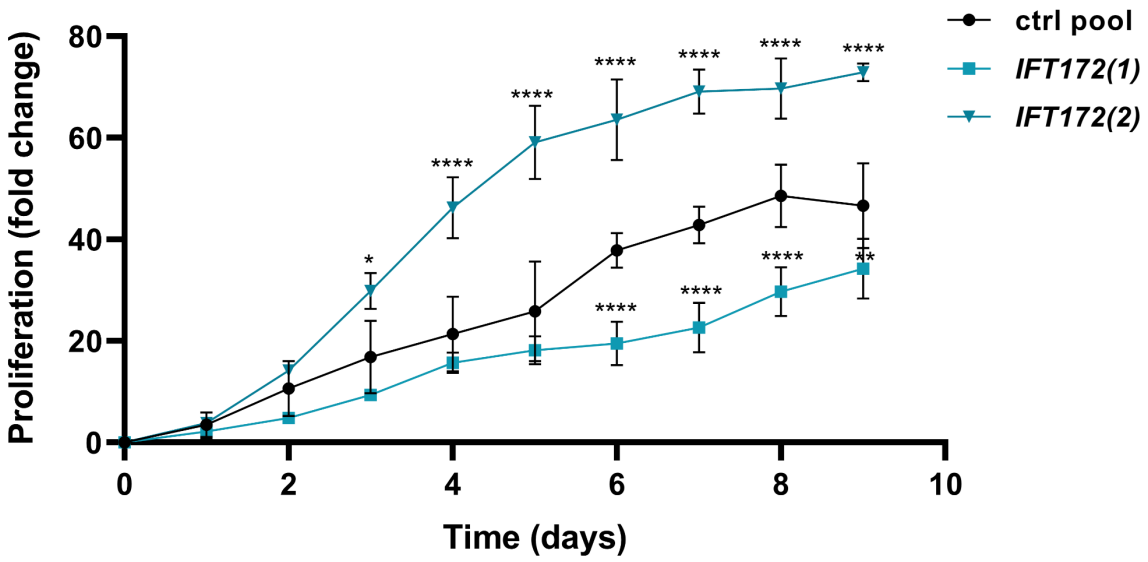


Figure 9. Proliferation test of *IFT172* patients' skin-fibroblasts. Proliferation curve of primary skin fibroblasts from the patients and unrelated healthy controls. The analysis was performed with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing to evaluate the proliferation of cells in 24-well plats in time (9 days). Values are reported as the mean ± SEM rom 3 independent experiments. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (*: $p < 0.1$, ****: $p < 0.0001$)

Gene	Ciliogenesis	Cilium length	SHH pathway	Cell proliferation
Literature	NA	NA	NA	NA
BBS1(1)	▼	▲	▼	▲
BBS1(2)	▼	▲	▼	–
BBS1(3)	–	–	▼	▲
BBS1(4)	▼	▲	▼	–
Literature	▼	▲	▼	NA
BBS10(1)	–	▲	▼	–
BBS10(2)	–	▲	▼	–
BBS10(3)	–	▲	▼	▲
BBS10(4)	–	▲	▼	–
Literature	–	▲	NA	NA
IFT172(1)	–	–	▼	▼
IFT172(2)	–		▲	▲

Table 1. Summary of the results obtained when applying the 4 experiments on the 3 selected genes and the results performed only on *BBS1*, *BBS10* and *IFT172* patient's skin fibroblasts from literature

REFERENCES

Anvarian, Z., Mykytyn, K., Mukhopadhyay, S., Pedersen, L.B., Christensen, S.T., 2019. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. Nat Rev Nephrol 15, 199–219. https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9

Beales, P.L., Elcioglu, N., Woolf, A.S., Parker, D., Flinter, F.A., 1999. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. J Med Genet 36, 437–446.

Billingsley, G., Deveault, C., Héon, E., 2011. BBS mutational analysis: a strategic approach. Ophthalmic Genet 32, 181–187. https://doi.org/10.3109/13816810.2011.567319

Blacque, O.E., Reardon, M.J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M.R., Ansley, S.J., Badano, J.L., Mah, A.K., Beales, P.L., Davidson, W.S., Johnsen, R.C., Audeh, M., Plasterk, R.H.A., Baillie, D.L., Katsanis, N., Quarmby, L.M., Wicks, S.R., Leroux, M.R., 2004. Loss of C. elegans BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. Genes Dev. 18, 1630–1642. https://doi.org/10.1101/gad.1194004

Blanchon, S., Legendre, M., Bottier, M., Tamalet, A., Montantin, G., Collot, N., Faucon, C., Dastot, F., Copin, B., Clement, A., Filoche, M., Coste, A., Amselem, S., Escudier, E., Papon, J.-F., Louis, B., 2020. Deep phenotyping, including quantitative ciliary beating parameters, and extensive genotyping in primary ciliary dyskinesia. J Med Genet 57, 237–244. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106424

Burga, A., Casanueva, M.O., Lehner, B., 2011. Predicting mutation outcome from early stochastic variation in genetic interaction partners. Nature 480, 250–253. https://doi.org/10.1038/nature10665

Burga, A., Lehner, B., 2012. Beyond genotype to phenotype: why the phenotype of an individual cannot always be predicted from their genome sequence and the environment that they experience. FEBS J 279, 3765–3775. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08810.x

Castro-Sánchez, S., Suarez-Bregua, P., Novas, R., Álvarez-Satta, M., Badano, J.L., Rotllant, J., Valverde, D., 2019. Functional analysis of new human Bardet-Biedl syndrome loci specific variants in the zebrafish model. Sci Rep 9, 12936. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49217-7

Costanzo, M., Kuzmin, E., van Leeuwen, J., Mair, B., Moffat, J., Boone, C., Andrews, B., 2019. Global Genetic Networks and the Genotype-to-Phenotype Relationship. Cell 177, 85–100. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.033

Delvallée, C., Nicaise, S., Antin, M., Leuvrey, A.-S., Nourisson, E., Leitch, C.C., Kellaris, G., Stoetzel, C., Geoffroy, V., Scheidecker, S., Keren, B., Depienne, C., Klar, J., Dahl, N., Deleuze, J.-F., Génin, E., Redon, R., Demurger, F., Devriendt, K., Mathieu-Dramard, M., Poitou-Bernert, C., Odent, S., Katsanis, N., Mandel, J.-L., Davis, E.E., Dollfus, H., Muller, J., 2021. A BBS1 SVA F retrotransposon insertion is a frequent cause of Bardet-Biedl syndrome. Clin Genet 99, 318–324. https://doi.org/10.1111/cge.13878

Domingo, J., Baeza-Centurion, P., Lehner, B., 2019. The Causes and Consequences of Genetic Interactions (Epistasis). Annu Rev Genomics Hum Genet 20, 433–460. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118-014857

Doornbos, C., van Beek, R., Bongers, E.M.H.F., Lugtenberg, D., Klaren, P.H.M., Vissers, L.E.L.M., Roepman, R., Oud, M.M., 2021. Cell-based assay for ciliopathy patients to improve accurate diagnosis using ALPACA. Eur J Hum Genet 29, 1677–1689. https://doi.org/10.1038/s41431-021-00907-9

Estrada-Cuzcano, A., Koenekoop, R.K., Senechal, A., De Baere, E.B.W., de Ravel, T., Banfi, S., Kohl, S., Ayuso, C., Sharon, D., Hoyng, C.B., Hamel, C.P., Leroy, B.P., Ziviello, C., Lopez, I., Bazinet, A., Wissinger, B., Sliesoraityte, I., Avila-Fernandez, A., Littink, K.W., Vingolo, E.M., Signorini, S., Banin, E., Mizrahi-Meissonnier, L., Zrenner, E., Kellner, U., Collin, R.W.J., den Hollander, A.I., Cremers, F.P.M., Klevering, B.J., 2012. BBS1 mutations in a wide spectrum of phenotypes ranging from nonsyndromic retinitis pigmentosa to Bardet-Biedl syndrome. Arch. Ophthalmol. 130, 1425–1432. https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2012.2434

Farag, T.I., Teebi, A.S., 1989. High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. Clin Genet 36, 463–464. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1989.tb03378.x

Forsyth, R., Gunay-Aygun, M., 2020. Bardet-Biedl Syndrome Overview, GeneReviews® [Internet]. University of Washington, Seattle.

Forsythe, E., Beales, P.L., 2013. Bardet-Biedl syndrome. Eur. J. Hum. Genet. 21, 8–13. https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.115

Gouronc, A., Zilliox, V., Jacquemont, M.-L., Darcel, F., Leuvrey, A.-S., Nourisson, E., Antin, M., Alessandri, J.-L., Doray, B., Gueguen, P., Payet, F., Randrianaivo, H., Stoetzel, C., Scheidecker, S., Flodrops, H., Dollfus, H., Muller, J., 2020. High prevalence of Bardet-Biedl syndrome in La Réunion Island is due to a founder variant in ARL6/BBS3. Clin. Genet. https://doi.org/10.1111/cge.13768

Halbritter, J., Bizet, A.A., Schmidts, M., Porath, J.D., Braun, D.A., Gee, H.Y., McInerney-Leo, A.M., Krug, P., Filhol, E., Davis, E.E., Airik, R., Czarnecki, P.G., Lehman, A.M., Trnka, P., Nitschké, P., Bole-Feysot, C., Schueler, M., Knebelmann, B., Burtey, S., Szabó, A.J., Tory, K., Leo, P.J., Gardiner, B., McKenzie, F.A., Zankl, A., Brown, M.A., Hartley, J.L., Maher, E.R., Li, C., Leroux, M.R., Scambler, P.J., Zhan, S.H., Jones, S.J., Kayserili, H., Tuysuz, B., Moorani, K.N., Constantinescu, A., Krantz, I.D., Kaplan, B.S., Shah, J.V., UK10K Consortium, Hurd, T.W., Doherty, D., Katsanis, N., Duncan, E.L., Otto, E.A., Beales, P.L., Mitchison, H.M., Saunier, S., Hildebrandt, F., 2013. Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans. Am J Hum Genet 93, 915–925. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.012

Harville, H.M., Held, S., Diaz-Font, A., Davis, E.E., Diplas, B.H., Lewis, R.A., Borochowitz, Z.U., Zhou, W., Chaki, M., MacDonald, J., Kayserili, H., Beales, P.L., Katsanis, N., Otto, E., Hildebrandt, F., 2010. Identification of 11 novel mutations in eight BBS genes by high-resolution homozygosity mapping. Journal of Medical Genetics 47, 262–267. https://doi.org/10.1136/jmg.2009.071365

He, S., R, S., N, E., Dk, B., H, Alkuraya, E, Almardawi, A, H., Y, S., Em, A., Ay, A., Jm, A., A, Alsagheir, A, Alfares, H, M., Mh, H., Ma, A.-M., M, S., E, A.S., Ma, S., N, M., R, K., M, A., A, Q., M, T., M, M., K, A., Ak, A., Sr, N., A, Alhashem, M, H., F, A., N, I., T, A., E, AlObeid, Mm, A., H, Alzaidan, Z, R., M, A.-O., S, S., Mz, S., Fs, A., 2020. The morbid genome of ciliopathies: an update. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics 22. https://doi.org/10.1038/s41436-020-0761-1

Hernandez-Hernandez, V., Pravincumar, P., Diaz-Font, A., May-Simera, H., Jenkins, D., Knight, M., Beales, P.L., 2013. Bardet–Biedl syndrome proteins control the cilia length through regulation of actin polymerization. Human Molecular Genetics 22, 3858–3868. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt241

Hey, C.A.B., Larsen, L.J., Tümer, Z., Brøndum-Nielsen, K., Grønskov, K., Hjortshøj, T.D., Møller, L.B., 2021. BBS Proteins Affect Ciliogenesis and Are Essential for Hedgehog Signaling, but Not for Formation of iPSC-Derived RPE-65 Expressing RPE-Like Cells. Int J Mol Sci 22, 1345. https://doi.org/10.3390/ijms22031345

Huangfu, D., Anderson, K.V., 2005. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 11325–11330. https://doi.org/10.1073/pnas.0505328102

Janssen, S., Ramaswami, G., Davis, E.E., Hurd, T., Airik, R., Kasanuki, J.M., Van Der Kraak, L., Allen, S.J., Beales, P.L., Katsanis, N., Otto, E.A., Hildebrandt, F., 2011. Mutation analysis in Bardet–Biedl syndrome by DNA pooling and massively parallel resequencing in 105 individuals. Hum Genet 129, 79–90. https://doi.org/10.1007/s00439-010-0902-8

Jm, F.-L., Ad, H., Pj, O., Ma, P., Jd, B., Y, C., Sy, C., Kv, A., Ip, M., 2011. A novel murine allele of Intraflagellar Transport Protein 172 causes a syndrome including VACTERL-like features with hydrocephalus. Human molecular genetics 20. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr241

Karam, A., Delvallée, C., Estrada-Cuzcano, A., Geoffroy, V., Lamouche, J.-B., Leuvrey, A.-S., Nourisson, E., Tarabeux, J., Stoetzel, C., Scheidecker, S., Porter, L.F., Génin, E., Redon, R., Sandron, F., Boland, A., Deleuze, J.-F., Le May, N., Dollfus, H., Muller, J., 2023. WGS Revealed Novel BBS5

Pathogenic Variants, Missed by WES, Causing Ciliary Structure and Function Defects. International Journal of Molecular Sciences 24, 8729. https://doi.org/10.3390/ijms24108729

Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G., Cummings, B.B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R.L., Laricchia, K.M., Ganna, A., Birnbaum, D.P., Gauthier, L.D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N.A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E.M., Seaby, E.G., Kosmicki, J.A., Walters, R.K., Tashman, K., Farjoun, Y., Banks, E., Poterba, T., Wang, A., Seed, C., Whiffin, N., Chong, J.X., Samocha, K.E., Pierce-Hoffman, E., Zappala, Z., O'Donnell-Luria, A.H., Minikel, E.V., Weisburd, B., Lek, M., Ware, J.S., Vittal, C., Armean, I.M., Bergelson, L., Cibulskis, K., Connolly, K.M., Covarrubias, M., Donnelly, S., Ferriera, S., Gabriel, S., Gentry, J., Gupta, N., Jeandet, T., Kaplan, D., Llanwarne, C., Munshi, R., Novod, S., Petrillo, N., Roazen, D., Ruano-Rubio, V., Saltzman, A., Schleicher, M., Soto, J., Tibbetts, K., Tolonen, C., Wade, G., Talkowski, M.E., Aguilar Salinas, C.A., Ahmad, T., Albert, C.M., Ardissino, D., Atzmon, G., Barnard, J., Beaugerie, L., Benjamin, E.J., Boehnke, M., Bonnycastle, L.L., Bottinger, E.P., Bowden, D.W., Bown, M.J., Chambers, J.C., Chan, J.C., Chasman, D., Cho, J., Chung, M.K., Cohen, B., Correa, A., Dabelea, D., Daly, M.J., Darbar, D., Duggirala, R., Dupuis, J., Ellinor, P.T., Elosua, R., Erdmann, J., Esko, T., Färkkilä, M., Florez, J., Franke, A., Getz, G., Glaser, B., Glatt, S.J., Goldstein, D., Gonzalez, C., Groop, L., Haiman, C., Hanis, C., Harms, M., Hiltunen, M., Holi, M.M., Hultman, C.M., Kallela, M., Kaprio, J., Kathiresan, S., Kim, B.-J., Kim, Y.J., Kirov, G., Kooner, J., Koskinen, S., Krumholz, H.M., Kugathasan, S., Kwak, S.H., Laakso, M., Lehtimäki, T., Loos, R.J.F., Lubitz, S.A., Ma, R.C.W., MacArthur, D.G., Marrugat, J., Mattila, K.M., McCarroll, S., McCarthy, M.I., McGovern, D., McPherson, R., Meigs, J.B., Melander, O., Metspalu, A., Neale, B.M., Nilsson, P.M., O'Donovan, M.C., Ongur, D., Orozco, L., Owen, M.J., Palmer, C.N.A., Palotie, A., Park, K.S., Pato, C., Pulver, A.E., Rahman, N., Remes, A.M., Rioux, J.D., Ripatti, S., Roden, D.M., Saleheen, D., Salomaa, V., Samani, N.J., Scharf, J., Schunkert, H., Shoemaker, M.B., Sklar, P., Soininen, H., Sokol, H., Spector, T., Sullivan, P.F., Suvisaari, J., Tai, E.S., Teo, Y.Y., Tiinamaija, T., Tsuang, M., Turner, D., Tusie-Luna, T., Vartiainen, E., Vawter, M.P., Ware, J.S., Watkins, H., Weersma, R.K., Wessman, M., Wilson, J.G., Xavier, R.J., Neale, B.M., Daly, M.J., MacArthur, D.G., Genome Aggregation Database Consortium, 2020. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature 581, 434–443. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7

Karmous-Benailly, H., Martinovic, J., Gubler, M.-C., Sirot, Y., Clech, L., Ozilou, C., Auge, J., Brahimi, N., Etchevers, H., Detrait, E., Esculpavit, C., Audollent, S., Goudefroye, G., Gonzales, M., Tantau, J., Loget, P., Joubert, M., Gaillard, D., Jeanne-Pasquier, C., Delezoide, A.-L., Peter, M.-O., Plessis, G., Simon-Bouy, B., Dollfus, H., Le Merrer, M., Munnich, A., Encha-Razavi, F., Vekemans, M., Attié-Bitach, T., 2005. Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. Am. J. Hum. Genet. 76, 493–504. https://doi.org/10.1086/428679

Khan, S. a., Muhammad, N., Khan, M. a., Kamal, A., Rehman, Z. u., Khan, S., 2016. Genetics of human Bardet–Biedl syndrome, an updates. Clinical Genetics 90, 3–15. https://doi.org/10.1111/cge.12737

Khan, S., Focșa, I.O., Budișteanu, M., Stoica, C., Nedelea, F., Bohîlțea, L., Caba, L., Butnariu, L., Pânzaru, M., Rusu, C., Jurcă, C., Chirita-Emandi, A., Bănescu, C., Abbas, W., Sadeghpour, A., Baig, S.M., Bălgrădean, M., Davis, E.E., 2023. Exome sequencing in a Romanian Bardet-Biedl syndrome cohort revealed an overabundance of causal BBS12 variants. Am J Med Genet A. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63322

Khanna, H., Davis, E.E., Murga-Zamalloa, C.A., Estrada-Cuzcano, A., Lopez, I., den Hollander, A.I., Zonneveld, M.N., Othman, M.I., Waseem, N., Chakarova, C.F., Maubaret, C., Diaz-Font, A., MacDonald, I., Muzny, D.M., Wheeler, D.A., Morgan, M., Lewis, L.R., Logan, C.V., Tan, P.L., Beer, M.A., Inglehearn, C.F., Lewis, R.A., Jacobson, S.G., Bergmann, C., Beales, P.L., Attié-Bitach, T., Johnson, C.A., Otto, E.A., Bhattacharya, S.S., Hildebrandt, F., Gibbs, R.A., Koenekoop, R.K., Swaroop, A., Katsanis, N., 2009. A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. Nat. Genet. 41, 739–745. https://doi.org/10.1038/ng.366

Klena, N., Pigino, G., 2022. Structural Biology of Cilia and Intraflagellar Transport. Annu Rev Cell Dev Biol 38, 103–123. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-034238

Kousi, M., Söylemez, O., Ozanturk, A., Mourtzi, N., Akle, S., Jungreis, I., Muller, J., Cassa, C.A., Brand, H., Mokry, J.A., Wolf, M.Y., Sadeghpour, A., McFadden, K., Lewis, R.A., Talkowski, M.E., Dollfus, H., Kellis, M., Davis, E.E., Sunyaev, S.R., Katsanis, N., 2020. Evidence for secondary-variant genetic burden and non-random distribution across biological modules in a recessive ciliopathy. Nature Genetics. https://doi.org/10.1038/s41588-020-0707-1

Landrum, M.J., Lee, J.M., Benson, M., Brown, G.R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., Holmes, J.B., Kattman, B.L., Maglott, D.R., 2018. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. Nucleic Acids Res. 46, D1062–D1067. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153

Loktev, A.V., Zhang, Q., Beck, J.S., Searby, C.C., Scheetz, T.E., Bazan, J.F., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., Jackson, P.K., Nachury, M.V., 2008. A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. Dev. Cell 15, 854–865. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.001

Marwaha, S., Knowles, J.W., Ashley, E.A., 2022. A guide for the diagnosis of rare and undiagnosed disease: beyond the exome. Genome Medicine 14, 23. https://doi.org/10.1186/s13073-022-01026-w

Mary, L., Chennen, K., Stoetzel, C., Antin, M., Leuvrey, A., Nourisson, E., Alanio-Detton, E., Antal, M.C., Attié-Bitach, T., Bouvagnet, P., Bouvier, R., Buenerd, A., Clémenson, A., Devisme, L., Gasser, B., Gilbert-Dussardier, B., Guimiot, F., Khau Van Kien, P., Leroy, B., Loget, P., Martinovic, J., Pelluard, F., Perez, M.-J., Petit, F., Pinson, L., Rooryck-Thambo, C., Poch, O., Dollfus, H., Schaefer, E., Muller, J., 2019. Bardet-Biedl syndrome: Antenatal presentation of forty-five fetuses with biallelic pathogenic variants in known Bardet-Biedl syndrome genes. Clinical Genetics 95, 384–397. https://doi.org/10.1111/cge.13500

McConnachie, D.J., Stow, J.L., Mallett, A.J., 2021. Ciliopathies and the Kidney: A Review. American Journal of Kidney Diseases 77, 410–419. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.08.012

Melluso, A., Secondulfo, F., Capolongo, G., Capasso, G., Zacchia, M., 2023. Bardet-Biedl Syndrome: Current Perspectives and Clinical Outlook. TCRM 19, 115–132. https://doi.org/10.2147/TCRM.S338653

Meyer, J.R., Krentz, A.D., Berg, R.L., Richardson, J.G., Pomeroy, J., Hebbring, S.J., Haws, R.M., 2022. Kidney failure in Bardet–Biedl syndrome. Clinical Genetics 101, 429–441. https://doi.org/10.1111/cge.14119

Mill, P., Christensen, S.T., Pedersen, L.B., 2023. Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease. Nat Rev Genet 24, 421–441. https://doi.org/10.1038/s41576-023-00587-9

Muller, J., Stoetzel, C., Vincent, M.C., Leitch, C.C., Laurier, V., Danse, J.M., Hellé, S., Marion, V., Bennouna-Greene, V., Vicaire, S., Megarbane, A., Kaplan, J., Drouin-Garraud, V., Hamdani, M., Sigaudy, S., Francannet, C., Roume, J., Bitoun, P., Goldenberg, A., Philip, N., Odent, S., Green, J., Cossée, M., Davis, E.E., Katsanis, N., Bonneau, D., Verloes, A., Poch, O., Mandel, J.L., Dollfus, H., 2010. Identification of 28 novel mutations in the Bardet–Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. Hum Genet 127, 583–593. https://doi.org/10.1007/s00439-010-0804-9

Mykytyn, K., Nishimura, D.Y., Searby, C.C., Shastri, M., Yen, H., Beck, J.S., Braun, T., Streb, L.M., Cornier, A.S., Cox, G.F., Fulton, A.B., Carmi, R., Lüleci, G., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Jacobson, S.G., Heckenlively, J.R., Weleber, R.G., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2002. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. Nat. Genet. 31, 435–438. https://doi.org/10.1038/ng935

Nachury, M.V., 2018. The molecular machines that traffic signaling receptors into and out of cilia. Current Opinion in Cell Biology, Cell Signalling 51, 124–131. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.004

Nakayama, K., Katoh, Y., 2018. Ciliary protein trafficking mediated by IFT and BBSome complexes with the aid of kinesin-2 and dynein-2 motors. The Journal of Biochemistry 163, 155–164. https://doi.org/10.1093/jb/mvx087

Niewiadomski, P., Kong, J.H., Ahrends, R., Ma, Y., Humke, E.W., Khan, S., Teruel, M.N., Novitch, B.G., Rohatgi, R., 2014. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. Cell Rep 6, 168–181. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.003

Novas, R., Cardenas-Rodriguez, M., Irigoín, F., Badano, J.L., 2015. Bardet-Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction? FEBS Lett 589, 3479–3491. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.031

Nozaki, S., Katoh, Y., Kobayashi, T., Nakayama, K., 2018. BBS1 is involved in retrograde trafficking of ciliary GPCRs in the context of the BBSome complex. PLoS One 13, e0195005. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195005

Patnaik, S.R., Kretschmer, V., Brücker, L., Schneider, S., Volz, A.-K., Oancea-Castillo, L. del R., May-Simera, H.L., 2019. Bardet–Biedl Syndrome proteins regulate cilia disassembly during tissue maturation. Cell. Mol. Life Sci. 76, 757–775. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2966-x

Prasai, A., Schmidt Cernohorska, M., Ruppova, K., Niederlova, V., Andelova, M., Draber, P., Stepanek, O., Huranova, M., 2020. The BBSome assembly is spatially controlled by BBS1 and BBS4 in human cells. J Biol Chem 295, 14279–14290. https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013905

Putoux, A., Attie-Bitach, T., Martinovic, J., Gubler, M.-C., 2012. Phenotypic variability of Bardet-Biedl syndrome: focusing on the kidney. Pediatr Nephrol 27, 7–15. https://doi.org/10.1007/s00467-010-1751-3

Rahit, K.M.T.H., Tarailo-Graovac, M., 2020. Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. Genes 11, 239. https://doi.org/10.3390/genes11030239

Redin, C., Le Gras, S., Mhamdi, O., Geoffroy, V., Stoetzel, C., Vincent, M.-C., Chiurazzi, P., Lacombe, D., Ouertani, I., Petit, F., Till, M., Verloes, A., Jost, B., Chaabouni, H.B., Dollfus, H., Mandel, J.-L., Muller, J., 2012. Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alström syndromes. J Med Genet 49, 502–512. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100875

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., ; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine 17, 405–423. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Rosengren, T., Larsen, L.J., Pedersen, L.B., Christensen, S.T., Møller, L.B., 2018. TSC1 and TSC2 regulate cilia length and canonical Hedgehog signaling via different mechanisms. Cell Mol Life Sci 75, 2663–2680. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2761-8

Sayers, E.W., Bolton, E.E., Brister, J.R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D.C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., Wang, J., Williams, R., Trawick, B.W., Pruitt, K.D., Sherry, S.T., 2022. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Res 50, D20–D26. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112

Scheidecker, S., Etard, C., Pierce, N.W., Geoffroy, V., Schaefer, E., Muller, J., Chennen, K., Flori, E., Pelletier, V., Poch, O., Marion, V., Stoetzel, C., Strähle, U., Nachury, M.V., Dollfus, H., 2014. Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). J Med Genet 51, 132–136. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101785

Schmid, F., Glaus, E., Barthelmes, D., Fliegauf, M., Gaspar, H., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Omran, H., Berger, W., Neidhardt, J., 2011. U1 snRNA-mediated gene therapeutic correction of splice defects caused by an exceptionally mild BBS mutation. Hum Mutat 32, 815–824. https://doi.org/10.1002/humu.21509

Seal, R.L., Braschi, B., Gray, K., Jones, T.E.M., Tweedie, S., Haim-Vilmovsky, L., Bruford, E.A., 2023. Genenames.org: the HGNC resources in 2023. Nucleic Acids Res 51, D1003–D1009. https://doi.org/10.1093/nar/gkac888

Seo, S., Baye, L.M., Schulz, N.P., Beck, J.S., Zhang, Q., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., 2010. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 1488–1493. https://doi.org/10.1073/pnas.0910268107

Shaheen, R., Szymanska, K., Basu, B., Patel, N., Ewida, N., Faqeih, E., Al Hashem, A., Derar, N., Alsharif, H., Aldahmesh, M.A., Alazami, A.M., Hashem, M., Ibrahim, N., Abdulwahab, F.M., Sonbul, R., Alkuraya, H., Alnemer, M., Al Tala, S., Al-Husain, M., Morsy, H., Seidahmed, M.Z., Meriki, N., Al-Owain, M., AlShahwan, S., Tabarki, B., Salih, M.A., Ciliopathy WorkingGroup, Faquih, T., El-Kalioby, M., Ueffing, M., Boldt, K., Logan, C.V., Parry, D.A., Al Tassan, N., Monies, D., Megarbane, A., Abouelhoda, M., Halees, A., Johnson, C.A., Alkuraya, F.S., 2016. Characterizing the morbid genome of ciliopathies. Genome Biol 17, 242. https://doi.org/10.1186/s13059-016-1099-5

Singh, S.K., Gui, M., Koh, F., Yip, M.C., Brown, A., 2020. Structure and activation mechanism of the BBSome membrane protein trafficking complex. Elife 9. https://doi.org/10.7554/eLife.53322

Stenson, P.D., Mort, M., Ball, E.V., Chapman, M., Evans, K., Azevedo, L., Hayden, M., Heywood, S., Millar, D.S., Phillips, A.D., Cooper, D.N., 2020. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. Hum Genet 139, 1197–1207. https://doi.org/10.1007/s00439-020-02199-3

Stoetzel, C., Laurier, V., Davis, E.E., Muller, J., Rix, S., Badano, J.L., Leitch, C.C., Salem, N., Chouery, E., Corbani, S., Jalk, N., Vicaire, S., Sarda, P., Hamel, C., Lacombe, D., Holder, M., Odent, S., Holder, S., Brooks, A.S., Elcioglu, N.H., Silva, E.D., Da Silva, E., Rossillion, B., Sigaudy, S., de Ravel, T.J.L., Lewis, R.A., Leheup, B., Verloes, A., Amati-Bonneau, P., Mégarbané, A., Poch, O., Bonneau, D., Beales, P.L., Mandel, J.-L., Katsanis, N., Dollfus, H., 2006. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. Nat. Genet. 38, 521–524. https://doi.org/10.1038/ng1771

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2021. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. Nucleic Acids Res 49, D605–D612. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074

van den Hoek, H., Klena, N., Jordan, M.A., Alvarez Viar, G., Righetto, R.D., Schaffer, M., Erdmann, P.S., Wan, W., Geimer, S., Plitzko, J.M., Baumeister, W., Pigino, G., Hamel, V., Guichard, P., Engel, B.D., 2022. In situ architecture of the ciliary base reveals the stepwise assembly of intraflagellar transport trains. Science 377, 543–548. https://doi.org/10.1126/science.abm6704

Wang, L., Liu, Y., Stratigopoulos, G., Panigrahi, S., Sui, L., Zhang, Y., Leduc, C.A., Glover, H.J., De Rosa, M.C., Burnett, L.C., Williams, D.J., Shang, L., Goland, R., Tsang, S.H., Wardlaw, S., Egli, D., Zheng, D., Doege, C.A., Leibel, R.L., 2021. Bardet-Biedl syndrome proteins regulate intracellular signaling and neuronal function in patient-specific iPSC-derived neurons. J Clin Invest 131, e146287, 146287. https://doi.org/10.1172/JCI146287

Waters, A.M., Beales, P.L., 2011. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. Pediatr Nephrol 26, 1039–1056. https://doi.org/10.1007/s00467-010-1731-7

Wingfield, J.L., Lechtreck, K.-F., Lorentzen, E., 2018. Trafficking of ciliary membrane proteins by the intraflagellar transport/BBSome machinery. Essays in Biochemistry 62, 753–763. https://doi.org/10.1042/EBC20180030

Wormser, O., Gradstein, L., Yogev, Y., Perez, Y., Kadir, R., Goliand, I., Sadka, Y., El Riati, S., Flusser, H., Nachmias, D., Birk, R., Iraqi, M., Kadar, E., Gat, R., Drabkin, M., Halperin, D., Horev, A., Sivan, S., Abdu, U., Elia, N., Birk, O.S., 2019. SCAPER localizes to primary cilia and its mutation

affects cilia length, causing Bardet-Biedl syndrome. European Journal of Human Genetics 27, 928–940. https://doi.org/10.1038/s41431-019-0347-z

Zaki, M.S., Sattar, S., Massoudi, R.A., Gleeson, J.G., 2011. Co-occurrence of distinct ciliopathy diseases in single families suggests genetic modifiers. Am. J. Med. Genet. A 155A, 3042–3049. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34173

Zhang, Q., Seo, S., Bugge, K., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2012. BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes. Hum Mol Genet 21, 1945–1953. https://doi.org/10.1093/hmg/dds004

Zheng, N.-X., Miao, Y.-T., Zhang, X., Huang, M.-Z., Jahangir, M., Luo, S., Lang, B., 2023. Primary cilia-associated protein IFT172 in ciliopathies. Front Cell Dev Biol 11, 1074880. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1074880

SUPPLEMENTARY DATA

Automated cilia length analysis

Automated cilia length analysis was performed using a developed macro with the Fiji software (1). Analysis was performed on a selection of images of a control and a patient with longer cilia. The selected images were taken with the IncuCyte S3 (Sartorius) using the 20X objective. The same images were analyzed manually using our standard procedure as described in (2). Statistical analysis was done using GraphPad Prism software. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test. ****: $p < 0.0001$

										Sonic Hedgehog																		
										qPCR				Western Blot				Reporter assay										
Reference	PMID	Model	Gene	Diagnostic	Mutation	OE/KD/KO	Proliferation	Ciliated cells	Cilia length	GLI	PTCH1	KIF7	GPR161	GLI	KIF7	GPR161	GliX8:GFP	SMO translocation	PTCH1 in cilia	IFT88 in cilia	KIF7 in axoneme	GPR161 in cilia	Cilia/cytoplasm barrier	Centriole per cells	%cells >4 centrosomes	Cilia beating frequency
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS1*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS1*	NA	NA	KD MO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS1*	NA	c.68G>A (p.W23*)	KD MO + mut	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS1*	NA	c.1097 T >A (p.V366D)	KD MO + mut	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS1*	NA	c.1510_1520delCACCTGCAGAA (p.H504Hfs*48)	KD MO + mut	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kim.Kramer-Zucker.PLOSOne.2013	24069149	Zebrafish anterior	*BBS1*	NA	NA	KD MO	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kim.Kramer-Zucker.PLOSOne.2013	24069149	Zebrafish nasal pit	*BBS1*	NA	NA	KD MO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Reduced
Nozaki.Nakayama.PLOSOne.2018	29590217	hTERT-RPE1 cells	*BBS1*	NA	unspecified CRISPR mutant	KO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	More	NA	NA	NA	More	NA	NA	NA	NA
Prasai.Huranova.JBC.2020	3275930	RPE1 cells	*BBS1*	NA	deletion A(65) + deletion ATTCGAAGTGGTTGGA (59-	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Shah.Welsh.PNAS.2007	18299575	Mice lungs	*BBS1*	BBS	Bbs1 M390R/M390R	KO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Reduced
Williams.Martens.MolTherapy.2017	28237838	Mice olfactory sen	*BBS1*	NA	Bbs1 osnKO	KO	NA	Less cilia (OSN)	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Wang.Liebel.JCI.2021	33630762	iPSC derived neuro	*BBS1*	BBS	M390R hom	KO	NA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Wang.Liebel.JCI.2021	33630762	iPSC derived neuro	*BBS1*	BBS	M390R hom	KO	NA	NA	Longer	No activation	No PTCH1 ac	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less in cilia (SHH)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Yee.Reiter.PLOSGenetics.2015	26540106	Mice limb bud fibr	*BBS1*	NA	Tctn1+/- Bbs1-/-	KO	NA	No change	NA	Less induction	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less	NA	NA	NA	More	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS2/RP74*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Shah.Welsh.PNAS.2007	18299575	Mice lungs	*BBS2/RP74*	BBS	Bbs2-/-	KO	NA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Reduced
Husson.Ibraghimov.HumMolGenet.2020	32620959	Mice kidney	*BBS2/RP74*	BBS	Bbs2: del exon 5-13	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kaushil.WileyInterScience.2009	19195025	Mice chondrocyte	*BBS2/RP74*	BBS	Bbs2-/-	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Prasai.Huranova.JBC.2020	3275930	RPE1 cells	*BBS2/RP74*	NA	insertion A (72) + deletion CG (72-73)	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS3/ARL6*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	More ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Zhang.PNAS.2011	22139371	MEFs	*BBS3/ARL6*	BBS	Bbs3-/-	KO	NA	NA	NA	GLI1 less exp	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less in cilia (SAG)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cheryl J.Wiens.TheJournalOfBiologicalChemistry.	20207729	hTERT-RPE cells	*BBS3/ARL6*	BBS	NA	OE	NA	Less ciliated cells	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cheryl J.Wiens.TheJournalOfBiologicalChemistry.	20207729	hTERT-RPE cells	*BBS3/ARL6*	BBS	p.T31R	OE	NA	More ciliated cells	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cheryl J.Wiens.TheJournalOfBiologicalChemistry.	20207729	hTERT-RPE cells	*BBS3/ARL6*	BBS	p.Q71L	OE	NA	More ciliated cells	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS4*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Mokrzan.Mykytyn.NephExpNeph.2007	17519557	Primary culture of	*BBS4*	NA	Bbs4-/-	KO	NA	NA	Shorter D7 / Longer D1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Prasai.Huranova.JBC.2020	3275930	RPE1 cells	*BBS4*	NA	deletion GC (19-20) hom	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Victor Hernandez-Hernandez.HumMolGene.2013	23716571	Kidney primary ce	*BBS4*	BBS	Bbs4-/-	KO	NA	Less ciliated cells / No change	Shorter / Longer with	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Agassandian.PLOS.2014	24695551	Mice amygdala	*BBS4*	BBS	Bbs4-/-	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Agassandian.PLOS.2014	24695551	Mice hipocamppus	*BBS4*	BBS	Bbs4-/-	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter CA1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Goetz.PLOS.2017	28291807	MEFs	*BBS4*	MKS	Bbs4-/-	KO	NA	No change	No change	Strong activa	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less in cilia (SAG)	NA	NA	NA	No translocat	NA	NA	NA	NA
Agassandian.NeuroscienceandBehavioralPhysiol	30193056	Mice brain	*BBS4*	BBS	Bbs4-/-	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Uytingco.The company of Biologists.2019	30665891	Mice olfactory epi	*BBS4*	BBS	Bbs4-/-	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Shah.Welsh.PNAS.2007	18299575	Mice lungs	*BBS4*	BBS	Bbs4-/-	KO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Reduced
QingwenXu.ScientificReport.2015	26150102	hTERT-RPE-1	*BBS4*	NA	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS5*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS5*	NA	NA	KD MO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS5*	NA	c.412C>T (p.R138C)	KD MO + mut	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS5*	NA	c.538delT (p.F180Ffs*6)	KD MO + mut	NA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS5*	NA	c.551A>G (p.N184S)	KD MO + mut	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bentley-Ford.HumMolGene.2021	33560420	MEFs	*BBS5*	BBS	Bbs5-/-	KO	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
QingwenXu.ScientificReport.2015	26150102	hTERT-RPE-1	*BBS5*	NA	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Brunbjerg Hey.InternationalJournalOfMolecularSci	33572860	Patient fibroblasts	*BBS5*	NA	c.214G>A, p.(Gly72Ser) hom		NA	No change	Longer																	
Brunbjerg Hey.InternationalJournalOfMolecularSci	33572860	Patient fibroblasts	*BBS5*	NA	c.214G>A, p.(Gly72Ser) hom		NA	Less ciliated cells	Longer																	
Brunbjerg Hey.InternationalJournalOfMolecularSci	33572860	RPE1 cells	*BBS5*	NA	Bbs5-/-	KO	NA	Less ciliated cells	No change																	
Brunbjerg Hey.InternationalJournalOfMolecularSci	33572860	iPSC derived neuro	*BBS5*	NA																						
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS6/MKKS*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Patnaik.May-Simeras.CellMolLifeSciences.2019	30446775	Mice RPE cells	*BBS6/MKKS*	NA	Bbs6-/-	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Patnaik.May-Simeras.CellMolLifeSciences.2019	30446775	hTERT-RPE1	*BBS6/MKKS*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS6/MKKS*	NA	NA	KD MO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Castro-Sanchez.Valverde.SciReports.2019	31506453	Zebrafish Kupffer's	*BBS6/MKKS*	NA	c.1232G>C (p.G411A)	KD MO + mut	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Victor Hernandez-Hernandez.HumMolGene.2013	23716571	Kidney primary ce	*BBS6/MKKS*	BBS	Bbs6-/-	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fath.HumanMolecularGenetics.2005	15772095	Mice seminiferous	*BBS6/MKKS*	MKS	Mkks-/-	KO	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kaushil.WileyInterScience.2009	19195025	Mice chondrocyte	*BBS6/MKKS*	BBS	Bbs6-/-	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rachel.TheJournalOfClinicalInvestigation.2012	22446187	Mice stereociliary	*BBS6/MKKS*	BBS	Mkks ko/ko	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ross.NatureGenetics.2005	16170314	Mice olfactory epi	*BBS6/MKKS*	BBS	Mkks-/-	ko	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS7*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Prasai.Huranova.JBC.2020	3275930	RPE1 cells	*BBS7*	NA	deletion TTTAC (180-184) hom	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
XueMei.Elsevier.2014	24938409	Zebrafish Kupffer's	*BBS7*	NA	NA	KD MO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Blacque.Leroux.GenesDev.2004	15231740	C.elegans ASER ne	*BBS7*	NA	osm-12(n1606)	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS8/TTC8*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	More splitted centro	NA
Blacque.Leroux.GenesDev.2004	15231740	C.elegans ASER ne	*BBS8/TTC8*	NA	nx77	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Dilan.Ramamurthy.HumMolGenet.2018	29126234	Mice retina	*BBS8/TTC8*	NA	Bbs8-/- retina specific	KO	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hsu.Sheffield.PLOSGenet.2017	29049287	Mice retina photo	*BBS8/TTC8*	NA	Bbs8-/-	KO	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
May-Simeras.Beales.DevBiol.2010	20643117	Zebrafish Kupffer's	*BBS8/TTC8*	NA	NA	KD MO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Patnaik.May-Simeras.CellMolLifeSciences.2019	30446775	Mice RPE cells	*BBS8/TTC8*	NA	Bbs8-/-	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Patnaik.May-Simeras.CellMolLifeSciences.2019	30446775	hTERT-RPE1	*BBS8/TTC8*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Prasai.Huranova.JBC.2020	3275930	RPE1 cells	*BBS8/TTC8*	NA	insertion A (107) hom	KO	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Veleri.PLOS.2012	22479622	IMCD3 cells	*BBS8/TTC8*	BBS	NA	KD shRNA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
QingwenXu.ScientificReport.2015	26150102	hTERT-RPE-1	*BBS8/TTC8*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS9/PTHB1*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Prasai.Huranova.JBC.2020	3275930	RPE1 cells	*BBS9/PTHB1*	NA	insertion T (40) + deletion CTACTATTCT (32-41)	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Veleri.PLOS.2012	22479622	Zebrafish Kupffer's	*BBS9/ PTHB1*	BBS	NA	KD MO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Veleri.PLOS.2012	22479622	IMCD3 cells	*BBS9/ PTHB1*	BBS	NA	KD shRNA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Barba.Elsevier.2018	29674126	Patient P-CMSC ce	*BBS9/ PTHB1*	Nonsyndromic crani	NA	KD siRNA	NA	More ciliated cells (standard	NA	GLI1 less exp	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS10*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Marion.InternationalSocietyofNephrology.2011	21270763	hRPTEC	*BBS10*	BBS	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Stoetzel.Dollfus.NatGent.2006	16582908	Zebrafish embryo	*BBS10*	NA	NA	KD MO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Barrell.Lui.FrontMolNeuro.2019	31293383	hiPSC from patien	*BBS10*	BBS	c.285A>T (p.Arg95Ser) + c.2119_2120del (p.Val707)	NA	NA	More ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Barrell.Lui.FrontMolNeuro.2019	31293383	hiPSC from patien	*BBS10*	BBS	c.989T>C (p.Val330Ala) + c.235dup (p.Thr79Asnfs 17	NA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Marion.Dollfus.PNAS.2009	19190184	préadypocytes	*BBS10*	BBS	NA	KD RNAi	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hey.Moller.IJMS.2021	33572860	Patient fibroblast	*BBS10*	BBS	c.271insT (p.Cys91fs*95) hom	NA		Less ciliated cells	Longer	No induction	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hey.Moller.IJMS.2021	33572860	Patient fibroblast	*BBS10*	BBS	c.271insT (p.Cys91fs*95) hom	NA		Less ciliated cells	Longer	No induction	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hey.Moller.IJMS.2021	33572860	RPE1 cells	*BBS10*	NA	NA	KD siRNA		Less ciliated cells	Shorter	Less induction	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Wang.Liebel.JCI.2021	33630762	iPSC derived neuro	*BBS10*	BBS	p.S303Rfs*3 hom	KO	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Wang.Liebel.JCI.2021	33630762	iPSC derived neuro	*BBS10*	BBS	p.C91Lfs*95 hom	KO	NA	NA	Longer	No activation	No PTCH1 ex	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS11/TRIM32*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Das.Tsang.PLOSGenet.2017	28498859	RPE1 cells	*BBS11/TRIM32*	NA	NA	OE	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS12*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	More ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA
Cui.Lo.DiseaseModelMechanisms.2011	21045211	Mice kidney	*BBS13/MKS1*	NA	Mks1-/-	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cui.Lo.DiseaseModelMechanisms.2011	21045211	MEFs	*BBS13/MKS1*	NA	Mks1-/-	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Dawe.Johnson.HumMolGen.2007	17185389	IMCD-3 cells	*BBS13/MKS1*	MKS	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Goetz.Anderson.PlosOne.2017	28291807	MEFs	*BBS13/MKS1*	NA	Mks1 krc/krc	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less IFT88+ BB	Less KIF7+ cil	NA	NA	NA	NA	NA
Goetz.Anderson.PlosOne.2017	28291807	Mice embryo neur	*BBS13/MKS1*	NA	Mks1 krc/krc	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Okazaki.Katoh.MBoC.2020	32726168	RPE cells	*BBS13/MKS1*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No translocation (SA	NA	NA	NA	No in cilia (+A	NA	NA	NA	NA
Slaats.Doherty.JMedGenet.2016	26490104	Patient fibroblast	*BBS13/MKS1*	JBTS	c.417G>A (p.F88_E139del) + c.1208C>T (p.S403L)	NA	NA	Less ciliated cells	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Slaats.Doherty.JMedGenet.2016	26490104	Patient fibroblast	*BBS13/MKS1*	JBTS	c.1115_1117delCCT (p.S372del) + c.950G>A (p.G317E	NA	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Slaats.Doherty.JMedGenet.2016	26490104	Patient fibroblast	*BBS13/MKS1*	JBTS	c.157dupG (p.D53Gfs*6) + c.625C>T (p.P218S)	NA	NA	No change	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Slaats.Doherty.JMedGenet.2016	26490104	3D spheroid cultur	*BBS13/MKS1*	JBTS	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Slaats.Doherty.JMedGenet.2016	26490104	3D spheroid cultur	*BBS13/MKS1*	JBTS	NA	KD siRNA + re	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Slaats.Doherty.JMedGenet.2016	26490104	3D spheroid cultur	*BBS13/MKS1*	JBTS	NA	KD siRNA + re	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Slaats.Doherty.JMedGenet.2016	26490104	3D spheroid cultur	*BBS13/MKS1*	JBTS	NA	KD siRNA + re	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Wheway.Johnson.DevBiol.2013	23454480	MEFs	*BBS13/MKS1*	NA	Mks1-/-	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	No PTCH1 ex	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Wheway.Johnson.DevBiol.2013	23454480	IMCD3 cells	*BBS13/MKS1*	NA	NA	KD siRNA	More prolifera	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Molinari, Scientific Reports, 2019	31346239	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	JBTS	c.5658G>T hom		NA	NA	Less ciliated cells	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Molinari, Scientific Reports, 2019	31346239	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	JBTS	c.5658G>T het +		NA	NA	Less ciliated cells	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Parfitt, Cell Stem Cell, 2016	27151457	Patient iPSC deriv	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G hom		NA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Parfitt, Cell Stem Cell, 2016	27151457	Patient iPSC deriv	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G hom		NA	NA	No change (significant)	No change (significant	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Parfitt, Cell Stem Cell, 2016	27151457	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G hom		NA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
May Simeras, Cell Reports, 2018	29298421	Patient iPSC	*BBS14/CEP290*	JBTS	c.2495-2515 del/inATCT + c.5668 G>T	NA	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Barny.HumanMolecular Genetics.2018	29771326	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	Retinal Dystrophy wi	c.508A>T hom	NA	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Burnight.GeneTher.2014	24807808	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G hom	NA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Burnight.GeneTher.2014	24807808	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G + Val247del1gT	NA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Burnight.GeneTher.2014	24807808	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G + Thr833 del2acAG	NA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Burnight.GeneTher.2014	24807808	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G + c.6277delG	NA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Drivas.JClinInvest.2013	24051377	Mouse fibroblasts	*BBS14/CEP290*	LCA	Cep290rd16/rd16 mouse	NA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Dulla, Cheetham, Nucleic Acid, 2018	30114557	Retinal organoids	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G hom	NA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Garanto, Collin, Human Molecular Genetics, 2016	27106101	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G hom	NA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Itoh.Brain&Development.2018	29217415	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	Arima syndrome	c.6012-12T>A hom	NA	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Itoh.Brain&Development.2018	29217415	Patient fibroblast	*BBS14/CEP290*	Arima syndrome	c.1711+1G>A + c.6012-12T>A	NA	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kilander.SciRep.2018	30478281	NIH3T3 cells transf	*BBS14/CEP290*	ASD	rs79705698 p.D664G	OE	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kilander.SciRep.2018	30478281	NIH3T3 cells transf	*BBS14/CEP290*	ASD	rs61941020 p.R1746Q	OE	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less activation	Less activation (SH	Less enrichmen	NA	NA	NA	Altered	NA	NA	NA	NA	NA
Kilander.SciRep.2018	30478281	Patient derived iP	*BBS14/CEP290*	ASD	rs61941020 p.R1746Q	NA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Altered	NA	NA	NA	NA	NA
Mookherjee.CellReports.2018	30332642	MEFs mouse	*BBS14/CEP290*	LCA	Cep290rd16/rd16;Nrl-/- mouse	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rachel.HumMolGen.2015	25859007	Ventricular epend	*BBS14/CEP290*	NA	Cep290ko/ko mouse (not rd16)	KO	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rachel.TheJournalOfClinicalInvestigation.2012	22446187	Mice stereociliary	*BBS14/CEP290*	BBS	Cep290rd16/rd16 mouse	KO	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ramsbottom.PNAS.2018	30446612	Patient hURECs	*BBS14/CEP290*	JBTS	c.5668G>T p.G1890*	NA	NA	NA	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Shimada.CellReports.2017	28700940	Patient derived iP	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G p.C998* + c.5668G>T p.G1890*	NA	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Shimada.CellReports.2017	28700940	Patient derived iP	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G p.C998* + c.5668G>T p.G1890*	NA	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Shimada.CellReports.2017	28700940	Patient derived iP	*BBS14/CEP290*	LCA	c.2991+1655A>G p.C998* hom	NA	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Shimada.CellReports.2017	28700940	Patient derived iP	*BBS14/CEP290*	JBTS	c.4882C>T p.G1628* + c.6072C>A p.T2024*	NA	NA	Less ciliated cells	Longer	No GLI1 activ	No PTCH1 in	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less (SAG)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Shimada.CellReports.2017	28700940	Patient derived iP	*BBS14/CEP290*	JBTS	c.5668G>T p.G1890* + c2495_2512delIn ATCT	NA	NA	Less ciliated cells	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Shimada.CellReports.2017	28700940	Patient derived iP	*BBS14/CEP290*	JBTS	c.5668G>T p.G1890* + Deletion of 351bp in exon38	NA	NA	Less ciliated cells	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Stowe.MolBiolCell.2012	22767577	hTERT-RPE1	*BBS14/CEP290*	NA	NA	KD RNAi	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Zhang.HumanGeneTherapy.2018	28679290	MEFs mouse	*BBS14/CEP290*	LCA	Cep290rd16/rd16;Nrl-/- mouse	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cui.Lo.PLOSBio.2013	24302887	MEFs mouse	*BBS15/WDPCP*	NA	Wdpcp Cys40	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cui.Lo.PLOSBio.2013	24302887	Mouse kidney	*BBS15/WDPCP*	NA	Wdpcp Cys40	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cui.Lo.PLOSBio.2013	24302887	Embryon de souris	*BBS15/WDPCP*	NA	Wdpcp Cys40	KO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Reduced GLI3R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Airik.Hildebrandt.PLOSOne.2016	27224062	MEFs mouse	*BBS16/SDCCAG8*	NPHP	Sdccag8 gt/gt	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	GLI1 less exp	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Airik.Hildebrandt.PLOSOne.2016	27224062	hTERT-RPE1	*BBS16/SDCCAG8*	NPHP	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flynn.Derek.HumMolGen.2019	31868218	hTERT-RPE1	*BBS16/SDCCAG8*	Neurodevelopmene	unspecified CRISPR mutant	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less ciliated cells wi	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Flynn.Derek.HumMolGen.2019	31868218	SHSYSY	*BBS16/SDCCAG8*	Neurodevelopmene	unspecified CRISPR mutant	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Eguether.Pazour.MolBioCell.2018	29540531	NIH/3T3	*BBS17/LZTFL1*	NA	lztfl1-/-	KO	NA	NA	NA	GLI1 less exp	NA	NA	NA	NA	No change (Smo	NA	NA	NA	More	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Wei.Liu.JMCB.2018	30423168	MEFs mouse	*BBS17/LZTFL1*	BBS/Obesity	lztfl1-/-	KO	NA	NA	Longer	GLI1 less exp	Less PTCH1 a	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Jiang.Natarajan.JGenetGen.2016	27312011	Mouse retina	*BBS17/LZTFL1*	BBS	lztfl1-/-	KO	NA	NA	Thicker axoneme	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Loktev.Nachury.DevCell.2008	19081074	RPE cells	*BBS18/BBIP1*	Ciliopathy	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	More cells with splitted centrosomes
Prasai.Huranova.JBC.2020	3275930	RPE1 cells	*BBS18/BBIP1*	NA	deletionAGTCAATGTTCCGGGA (80-95) + deletionAG	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Eguether.Pazour.DevCell.2014	25446516	MEFs	*BBS19/IFT27*	NA	ift27-/-	KO	NA	No change	Longer	GLI1 less acti	NA	NA	NA	NA	Less GLI1 activa	NA	NA	NA	More SMO in cilia	No PTCH1 in cili	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Eguether.Pazour.MolBioCell.2018	29540531	MEFs	*BBS19/IFT27*	NA	ift27-/-	KO	NA	NA	NA	GLI1 less expressed and no activation (SAG)					No GLI2 and GLI	NA	NA	NA	NA	NA	More	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Yang.Chen.Development.2015	26023097	Mice skin	*BBS19/IFT27*	NA	ift27-/-	KO	NA	No change	No change	No GLI1, less	No PTCH1	NA	NA	NA	No GLI1 activati	NA	NA	NA	SMO in cilia without	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bujakowska.Pierce.HumMolGen.	25168386	mIMCD3 cells	*BBS20/IFT172*	BBS	c.4701C>A (p.H1567Q)	OE vs WT	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bujakowska.Pierce.HumMolGen.	25168386	mIMCD3 cells	*BBS20/IFT172*	BBS	c.4815T>G (p.D1605E)	OE vs WT	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Friedland-Little.Moskowitz.HumMolGen.2011	21653639	Mice fibroblast	*BBS20/IFT172*	NA	ift172 avc1/avc1	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Friedland-Little.Moskowitz.HumMolGen.2011	21653639	Mice fibroblast	*BBS20/IFT172*	NA	ift172 avc1/wim	KO	NA	Less ciliated cells	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Goetz.Anderson.PLOSOne.2016	28291807	MEFs	*BBS20/IFT172*	NA	ift172 avc1/avc1	KO	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No change	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gorivodsky.Westphal.DevBiol.2009	18930042	Mice neuroepithe	*BBS20/IFT172*	NA	ift172 Slb	KO	NA	NA	Shorter	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Halbritter.Hildebrandt.AJHG.2013	24140113	Patient fibroblast	*BBS20/IFT172*	Mainzer-Saldino Syn	c.1390_1395delGATATT (p.Asp464_Ile465del) + c.517	NA	NA	No change	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Halbritter.Hildebrandt.AJHG.2013	24140113	Patient fibroblast	*BBS20/IFT172*	JBTS	c.4630C>T (p.Arg1544Cys) hom	NA	NA	No change	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Halbritter.Hildebrandt.AJHG.2013	24140113	Patient fibroblast	*BBS20/IFT172*	JBTS	c.432delA (p.Lys144Asnfs*1) + c.4161G>A (p.Arg1387	NA	NA	No change	Longer	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ma.Tai.JMH.2020	32399704	Mesenchymal Ster	*BBS20/IFT172*	NA	NA	KD siRNA	More prolifera	Less ciliated cells	Shorter	Not sure	Not sure	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Pollock.Anand-Apte.PLOSOne.2020	32735563	Zebrafish hyaloid	*BBS20/IFT172*	NA	ift172 hi2211/moe	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			BBS21/CORF37																									
Luo.Cao.GenetMed.2021	33531668	Patient fibroblast	*BBS22/IFT74*	JBTS	c.92delT (p.L31Hfs*25) + c.535C>G (p.Q179E)	NA		No change (delayed? cf SS 5h)	Longer	Less GLI1 up	Less upregul	NA	NA	NA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Luo.Cao.GenetMed.2021	33531668	Patient fibroblast	*BBS22/IFT74*	JBTS	c.306-24A>G(p.103_135del) + c.535C>G (p.Q179E)	NA		No change (delayed? cf SS 5h)	Longer	Less GLI1 up	No change (SN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	More (SAG)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Luo.Cao.GenetMed.2021	33531668	Patient fibroblast	*BBS22/IFT74*	JBTS	c.85C>T (p.R29*) + c.535C>G (p.Q179E)	NA		No change (delayed? cf SS 5h)	Longer	Less GLI1 up	No change (SN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Luo.Cao.GenetMed.2021	33531668	Zebrafih	*BBS22/IFT74*	JBTS	c.535C>G (p.Q179E)	KD Morpholino	ift + rescue Q	Less ciliated cells	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			BBS24/SCAPER																									
Wormser.Birk.EJHG.2019	30723319	NIH/3T3	*BBS24/SCAPER*	BBS	c.2806delC; p.(L936*)	OE	NA	NA	Longer	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Wormser.Birk.EJHG.2019	30723319	Patient fibroblast	*BBS24/SCAPER*	BBS	c.2806delC; p.(L936*)	NA	NA	NA	Longer	NA		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tanos.Tsou.GenesDev.2013	23348840	hTERT-RPE1	*SCLT1*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Li.Yang.HumMolGenet.2017	28486600	Mice kidney	*SCLT1*	PKD	Sclt1 -/-	KO	More prolifera	No ciliated cells (no graph)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bernatik.Cajanek.MBoC.2019	32129703	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	N-term of CEP164	OE	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less in centrosc	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bernatik.Cajanek.MBoC.2019	32129703	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	N-A term of CEP164	OE	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less in centrosc	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bernatik.Cajanek.MBoC.2019	32129703	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	M part of CEP164	OE	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	In centrosome	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Chen.Wang.CellDeathDiff.2020	33462409	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kobayashi.Itoh.FrontCellDevBiol.2020	33251215	Panc1 cell	*CEP164/NPHP15*	Pancreatic ductal ad	CRISPR mutant (3 alleles: 1=del1bp; 2=ins101bp; 3=	KO	More prolifera	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Airik.Hildebrandt.Kidneyint.2020	31248650	Mice kidney proxi	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	No change/ No ciliated cells (I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kasahara.Inagaki.NatCom.2018	29472535	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Siller.Takemaru.PLOSGenet.2017	29244804	MEFs	*CEP164/NPHP15*	PCD	NA	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Siller.Takemaru.PLOSGenet.2017	29244804	Mice brain subven	*CEP164/NPHP15*	PCD	NA	Conditionnal KN	A	Less cilia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Siller.Takemaru.PLOSGenet.2017	29244804	Mice oviduct epith	*CEP164/NPHP15*	PCD	NA	Conditionnal KN	A	Less cilia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Siller.Takemaru.PLOSGenet.2017	29244804	MTECs	*CEP164/NPHP15*	PCD	NA	Conditionnal KN	A	Less multiciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Daly.Morrison.JCS.2016	26966185	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	1-2bp del	KO	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Slaats.Giles.PLOSGenet.2014	25340510	IMCD3 cells	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	Less prolifera	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Slaats.Giles.PLOSGenet.2014	25340510	RPE	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	Less prolifera	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Oda.Mizuno.GenesToCells.2014	25297623	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164-N	OE	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Oda.Mizuno.GenesToCells.2014	25297623	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	p.Y2A	OE	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cajanek.Nigg.PNAS.2014	24982133	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cajanek.Nigg.PNAS.2014	24982133	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164 full length	OE	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cajanek.Nigg.PNAS.2014	24982133	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164 N term	OE	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cajanek.Nigg.PNAS.2014	24982133	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164 M part	OE	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Cajanek.Nigg.PNAS.2014	24982133	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164 C term	OE	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Schmidt.Pereira.JCB.2012	23253480	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164 full length	OE	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Schmidt.Pereira.JCB.2012	23253480	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164 N term	OE	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Schmidt.Pereira.JCB.2012	23253480	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164 M part	OE	NA	No change	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Schmidt.Pereira.JCB.2012	23253480	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	CEP164 C term	OE	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Schmidt.Pereira.JCB.2012	23253480	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Less in centrosc	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Humbert.Seo.PNAS.2012	23150559	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Chaki.Hildebrandt.Cell.2012	22863007	IMCD3 cells	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Graser.Nigg.JBC.2007	17954613	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Pejskova.Cajanek.JCB.2019	32348467	hTERT-RPE1	*CEP164/NPHP15*	NA	NA	KD siRNA	NA	Less ciliated cells	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Supplementary Table S1. Primary data from the literature search. ASD: Autism spectrum disorder, BBS: Bardet-Biedl syndrome, JBTS: Joubert syndrome, NPHP: Nephronopthisis, OE: Overexpression PCD: Primary cilia dyskinesia, PKD: Polycystic kidney disease.

Gene names (HGNC)	#references	#selected
BBS1	203	7
BBS2/RP74	142	2
BBS3/ARL6	98	2
BBS4	138	6
BBS5	60	3
BBS6/MKKS	245	5
BBS7	62	2
BBS8/TTC8	72	5
BBS9/PTHB1	68	2
BBS10	68	3
BBS11/TRIM32	185	1
BBS12	45	0
BBS13/MKS1	116	6
BBS14/CEP290	303	17
BBS15/WDPCP	23	1
BBS16/SDCCAG8	47	2
BBS17/LZTFL1	37	2
BBS18/BBIP1	13	1
BBS19/IFT27	36	3
BBS20/IFT172	61	7
BBS21/C8ORF37	16	0
BBS22/IFT74	33	1
BBS23/CEP19	9	0
BBS24/SCAPER	22	1
BBS25/SCLT1	20	3
BBS26/CEP164	55	15
Total	**2177**	**97**

Supplementary Table S2. Reference counts (total and selected) for each BBS gene during the literature search

Name	Date of puncture	Sex	Passage number
ctrl1	09/02/2017 (39 years)	M	P8
ctrl2	12/04/2007 (53 years)	F	P14
ctrl3	12/04/2007 (30 years)	F	P11
ctrl4	05/04/2016 (37 years)	F	P9
ctrl5	21/04/2010 (68 years)	F	P6
BBS1(1)	10/03/2021 (32 years)	M	P3
BBS1(2)	06/01/2021 (68 years)	F	P4
BBS1(3)	05/01/2022 (37 years)	M	P4
BBS1(4)	12/2012 (38 years)	M	P5
BBS10(1)	20/01/2021 (10 years)	F	P4
BBS10(2)	15/11/2021 (36 years)	F	P4
BBS10(3)	19/11/2021 (28 years)	F	P5
BBS10(4)	04/08/2021 (28 years)	F	P7
IFT172(1)	08/06/2021 (39 years)	F	P4
IFT172(2)	06/04/2021 (5 years)	M	P4

Supplementary Table S3. List of skin derived fibroblasts cell lines.

Family	Name	cDNA	Protein	Variant type	Phenotype	Reference
X.29	*BBS1*(1)	c.[479G>A];[479G>A]	p.[R160Q];[R160Q]	Frameshift due to splice effect	RP, Ob, brachydactyly, slow ideation	(3,4)
XVIII.24	*BBS1*(2)	c.[1169T>G];[1169T>G]	p.[M390R];[M390R]	Missense	RP, Ob, P, Re	(5)
XX.2	*BBS1*(3)	c.[1169T>G];[1169T>G]	p.[M390R];[M390R]	Missense	RP, Ob, P, ID, learning difficulties	(5)
XX.6	*BBS1*(4)	c.[1169T>G];[insSVA]	p.[M390R];[SVA_F]	Missense/Retrotransposon insertion	RP, P, learning disability, slow ideation	(6)
XXI.18	*BBS10*(1)	c.[271dup];[271dup]	p.[C91Lfs*5];[C91Lfs*5]	Frameshift	Ob, PAP, motor delay, Re	(7)
XI.10	*BBS10*(2)	c.[271dup];[271dup]	p.[C91Lfs*5];[C91Lfs*5]	Frameshift	RP, Ob, P, language delay, cardiac anomaly	(7)
XI.17	*BBS10*(3)	c.[145C>T];[145C>T]	p.[R49W];[R49W]	Missense	RP, PAP, ID, learning disabilities, language delay, slow ideation, atrial septal defect, scoliosis	(7)
XXII.10	*BBS10*(4)	c.[145C>T];[271dup]	p.[R49W];[C91Lfs*5]	Missense/Frameshift	RP, PAP, slow ideation, Re, scoliosis	(7)
XXIX.19	*IFT172*(1)	c.[1091del];[5179T>C]	p.[G364Efs*19];[C1727R]	Frameshift/missense	RP, Ob, brachydactyly, delayed acquisition, Re	This study
XXX.13	*IFT172*(2)	c.[281_287delinsT];[3951+180A>G]	p.[(L94_G96delinsIle))];[K1317_A1318ins10*]	Indel/splice	RP, Ob, PAP, delayed acquisition, micropenis	This study

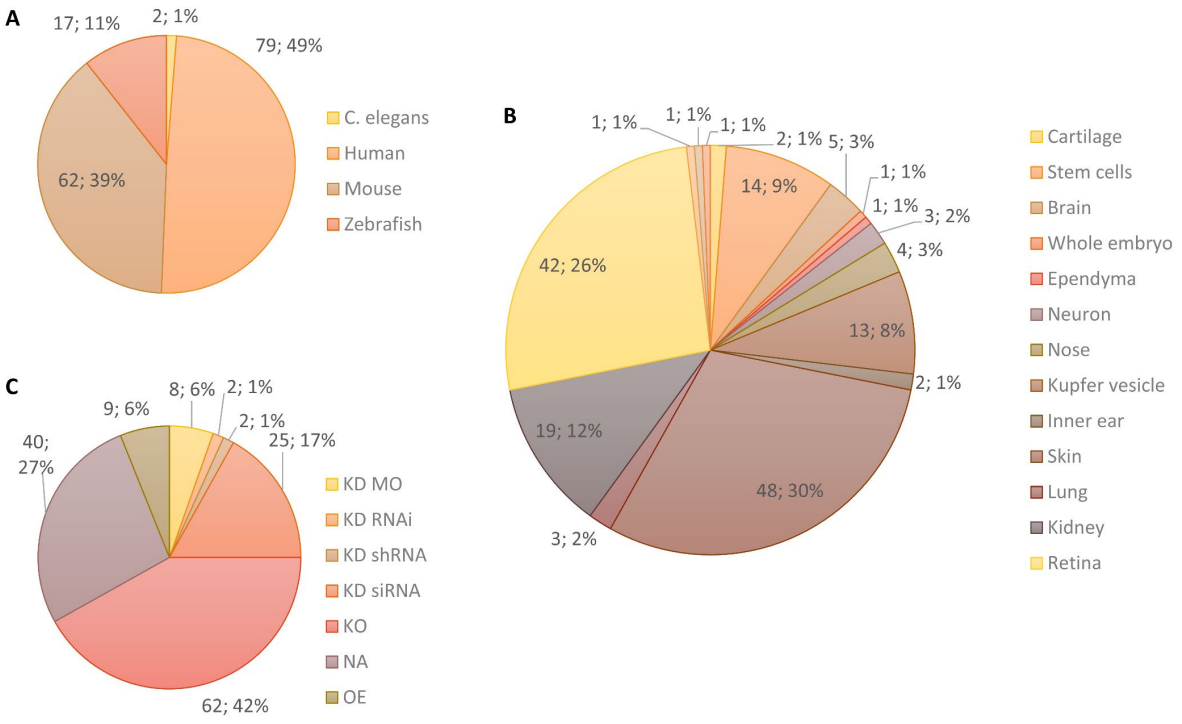
Supplementary Table S4. Phenotypic and variants information for the patients. Reference sequence: *BBS1*: NM_024649.4, *BBS10*: NM_024685.3, *IFT172*: NM_015662.2. RP: retinitis pigmentosa, Ob: obesity, P: polydactyly, PAP: Post axial polydactyly, ID: intellectual disability, Re: Renal anomalies

Antibody	Species	Dilution	Reference
Anti-ARL13B	Mouse	1/500	Sc-515784, Santa cruz biotechnology
Anti-γTUBULIN	Rabbit	1/500	PA5-34815, Invitrogen
Anti-mouse (Alexa Fluor™ 488) secondary	Goat	1/1000	A11001, Invitrogen
Anti-rabbit (Alexa Fluor™ 594) secondary	Donkey	1/1000	A21207, Invitrogen

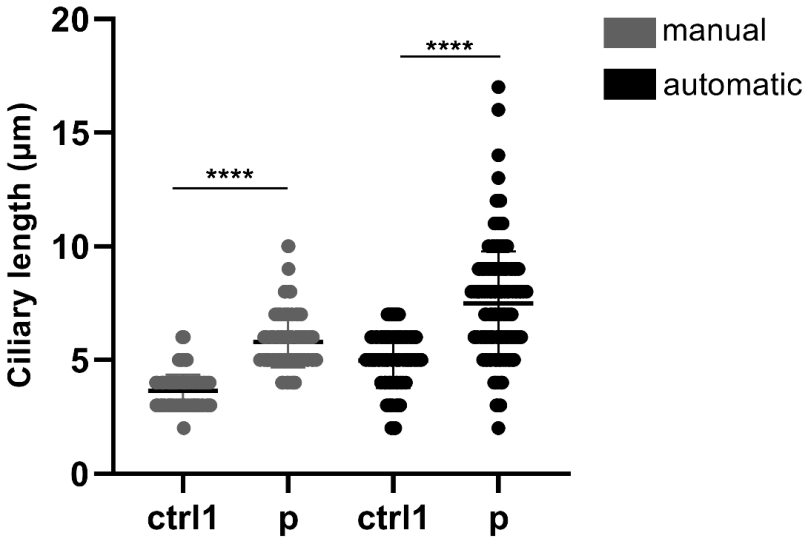
Supplementary Table S5. List of antibodies used for immunofluorescence in this study.

Application	Gene name (HGVS)	Exon	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Size
cDNA	*GLI1*	7 to 9	CTGCAGCCAGGAATTTGACT	CGAGGCGTGAGTATGACTTCC	224bp
	PTCH1	2-3 to 3	GTGGAAGTTGGAGGACGAGT	AGTCCAGGTGTTGTAGGAGC	154bp
	GAPDH	4-5 to 6	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197bp

Supplementary Table S6. List of primers used in this study.



Supplementary Figure S1. Distribution of the experiments according to the species (A), the tissue (B) and the mutation technique (C). KD: knockdown, KO: knockout, MO: morpholino, NA: not available, OE: overexpression,



Supplementary Figure S2. Automated primary cilia length analysis. Comparison of cilia length analyzed manually and automatically with a macro developed using the Fiji software. Selected images of one control and one patient with longer cilia were taken with the IncuCyte S3 using the 20X objective. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (*: $p < 0.1$, ****: $p < 0.0001$)

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. juill 2012;9(7):676-82.
2. Karam A, Delvallée C, Estrada-Cuzcano A, Geoffroy V, Lamouche JB, Leuvrey AS, et al. WGS Revealed Novel BBS5 Pathogenic Variants, Missed by WES, Causing Ciliary Structure and Function Defects. Int J Mol Sci. janv 2023;24(10):8729.
3. Redin C, Le Gras S, Mhamdi O, Geoffroy V, Stoetzel C, Vincent MC, et al. Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alström syndromes. J Med Genet. août 2012;49(8):502-12.
4. Schmid F, Glaus E, Barthelmes D, Fliegauf M, Gaspar H, Nürnberg G, et al. U1 snRNA-mediated gene therapeutic correction of splice defects caused by an exceptionally mild BBS mutation. Hum Mutat. juill 2011;32(7):815-24.
5. Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, Shastri M, Yen H jan, Beck JS, et al. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. Nat Genet. août 2002;31(4):435-8.
6. Delvallée C, Nicaise S, Antin M, Leuvrey AS, Nourisson E, Leitch CC, et al. A BBS1 SVA F retrotransposon insertion is a frequent cause of Bardet-Biedl syndrome. Clin Genet. févr 2021;99(2):318-24.
7. Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, et al. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. Nat Genet. mai 2006;38(5):521-4.

IV.

<u>Projet 3</u> : Application de la « boite à outil ciliopathie » pour valider des variants de gènes responsables de maladies génétiques rares avec une atteinte du cil primaire.

Le projet portant sur *PIK3C2A*

I. Introduction

A. La famille des PI3K

La famille des PI3K

Les phosphoinositides 3-kinases (PI3K) sont une famille conservée de lipides kinases découvertes au début des années 1980, dont la composition (en modules fonctionnels) et la structure tridimensionnelle ne sont résolues que depuis une quinzaine d'années. Les PI3K font partie d'un réseau plus large de kinases et de phosphatases qui sont exprimées de manière abondante et qui jouent un rôle important au cours du développement de l'organisme (Mountford et al., 2015). En général, les complexes catalysent la phosphorylation des phosphatidylinositol (PI) (des phospholipides membranaires) sur la position 3 du groupement inositol permettant ainsi la formation de seconds messagers impliqués dans une variété de voies de signalisation (Boukhalfa et al., 2020).

L'étude de ces PI3K présente un grand intérêt car leurs produits lipidiques jouent un rôle clé dans la signalisation intracellulaire qui contrôle de nombreux processus telles que la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette et le trafic membranaire. Par contre, la dérégulation des voies de signalisation dépendantes de ces kinases est impliquée dans un large spectre de pathologies telles que le cancer, le diabète, les maladies inflammatoires, les maladies métaboliques et les maladies cardiovasculaires. Malgré leur homologie de structure et la production commune de certains 3-phosphoinositides, chacune des isoformes présente des fonctions spécifiques et non redondantes qui ont pu être déterminées suite à la génération de modèles de souris déficientes pour chacune de ces kinases (souris KO) ou déficientes pour leur activité kinase elle-même (souris *kinase-dead* ou *knock-in*) (Lupieri et al., 2015).

La famille PI3K comprend 8 isoformes hautement conservées au cours de l'évolution réparties en trois classes I (A et B), II (α, β et γ) et III en fonction de leur structure protéique, leur spécificité de substrat lipidique et leur mode de régulation. (Vanhaesebroeck et al., 2010) (Figure 40). En général, ces enzymes réalisent 3 réactions différentes et transforment le PI (PtdIns) en PI(3)P, le PI(4)P en PI(3,4)P2 et le PI(4,5)P2 en PI(3,4,5)P3. Chaque classe possède des substrats préférentiels et cela est dû à la spécificité structurale de la cavité catalytique de chaque classe de PI3K (Djordjevic and Driscoll, 2002). La classe I et III fonctionnent comme des hétérodimères associant une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice/adaptatrice, alors que les PI3K de classe II fonctionnent de façon différente avec des monomères.

Parmi les différents phosphoinositides phosphorylés, PI3P est le seul produit qui peut être généré directement ou indirectement par toutes les classes de PI3K *in vivo* (Jean and Kiger, 2012). Par exemple, les PI3K de classe I produisent des PI(3,4,5)P3 qui peuvent être convertis en PI3P par des phosphatases agissant sur les vésicules endocytaires (Shin et al., 2005). L'unique isoforme de la classe III, VPS34, est responsable d'une fraction majeure du PI3P produit sur les vésicules endocytaires, où il contrôle la génération d'autophagosomes (Backer, 2008) ainsi que l'ancrage et la fusion des endosomes (Christoforidis et al., 1999). Les PI3K de classe II produisent également du PI3P, d'une façon spécifique ils contrôlent cette production

dans le compartiment de recyclage endocytaire (ERC) à la base du cil primaire. Ils sont impliquées dans le trafic intracellulaire des membranes, l'endocytose, l'exocytose (Falasca and Maffucci, 2012) et l'autophagie (Devereaux et al., 2013).
Chez la drosophile, le seul homologue de classe II, Pi3k68D, est nécessaire pour le tri endosomal du compartiment endocytaire vers la membrane plasmique, probablement via la régulation des niveaux de PI3P (Jean et al., 2012).

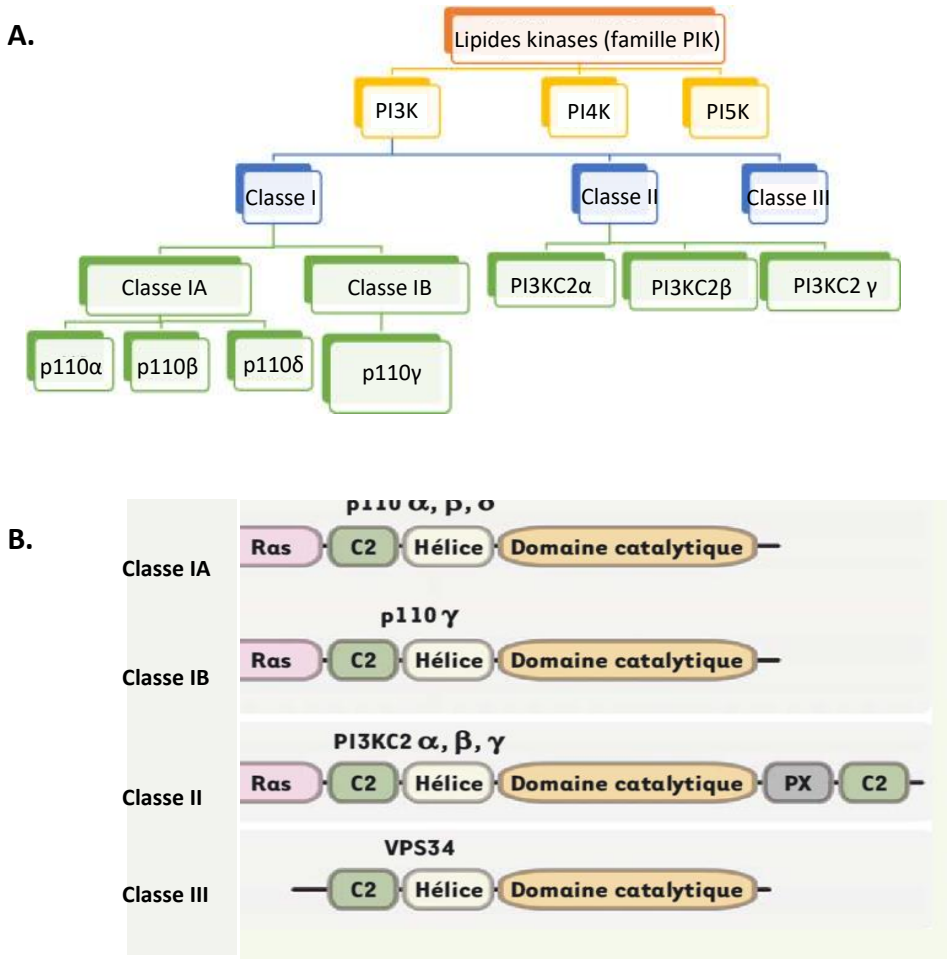


Figure 40 : La famille des PI3K. A. Représentation des différentes classes de la famille des lipides kinases PIK (adapté de Elmenier *et al*. 2019). **B.** Les trois classes de PI3K chez les mammifères. Représentation des domaines catalytiques et des domaines d'interaction protéiques ou lipidiques. p85 : sous-unité régulatrice p85, Ras : domaine de liaison à la protéine Ras, C2 : domaine de liaison aux phospholipides, PX : domaine phox (adapté de Viaud *et al*. 2015).

- Les trois classes sont les suivants :

1. <u>Les PI3K de classe I</u>

Cette classe est la plus étudiée et se compose de 4 isoformes. PI3Kα et la PI3Kβ présentent un profil d'expression ubiquitaire, alors que les isoformes PI3Kδ et PI3Kγ sont majoritairement

exprimées dans les cellules hématopoïétiques. Elles sont divisées en deux sous classes IA et IB en fonctions de leur mode de régulation.

- La classe IA est composée des 3 isoformes PI3Kα, PI3Kβ et PI3Kδ composée d'une sous-unité catalytique p110 (110kDa) (p110α, p110β et p110δ) codées par 3 gènes différents associés à une sous-unité régulatrice/adaptatrice générées par expression et épissages alternatifs de trois gènes différents appelés p85α (qui génère par épissage alternatif les protéines p85α, p55α et p50α), p85β et p55δ.
- La classe IB est composée d'une seule isoforme : PI3Kγ formée d'une sous unité catalytique p110γ associée à une sous-unité régulatrice p101 ou p84/p87 (Fougerat et al., 2009).

Les sous-unités catalytiques p110 des différentes isoformes de classe I présentent un domaine commun de liaison à la sous-unité régulatrice en N-terminal ABD (Adaptator Binding Domain), un domaine de liaison à Ras (RBD, Ras Binding Domain), un domaine C2 de liaison aux membranes, un domaine hélicoïdal à la fonction inconnue et un domaine d'activité catalytique qui présente une similitude avec le domaine catalytique des protéines kinases (Scheeff and Bourne, 2005).

2. Les PI3K de classe II

Ce sont des protéines de 170kDa composées de trois isoformes codées par des gènes différents : la PI3KCIIα, la PI3KCIIβ et la PI3KCIIγ. La PI3KCIIα et la PI3KCIIβ présentent un profil d'expression ubiquitaire, tandis que l'expression de la PI3KCIIγ semble être limitée aux glandes exocrines telles que le foie, le pancréas, le rein, le sein et les glandes salivaires. le spécifique de cette classe de kinase esg la présence d'un domaine C2 à l'extrémité C-terminale (Figure 40B) qui a la particularité de ne pas posséder les résidus aspartate qui coordonnent la liaison au Ca^{2+} des domaines C2 classiquement dépendant de cet ion (Newton, 1995). La classe II de PI3K peut ainsi lier *in vitro* les lipides indépendamment de la présence de Ca^{2+} (Arcaro et al., 2000). La grande région N-terminale contient un domaine de liaison à Ras (petite GTPases, joue un rôle dans la transmission du signal) en commun avec les isoformes de classe I. Cette classe de PI3K a aussi la particularité de posséder un domaine PX qui lie le PI(4,5)P2 *in vitro*.
De façon plus spécifique, la PI3KCIIα présente une extension qui facilite sa liaison à la clathrine (protéine structurelle constituant l'enveloppe de certains vésicules) tandis que celle de l'isoforme PI3KCIIβ présente un domaine riche en proline capable de lier l'intersectine (protéine qui permet la liaison avec le cytosquelette d'actine) (Aung et al., 2019; Das et al., 2007; Gaidarov et al., 2005; Heng and Maffucci, 2022).

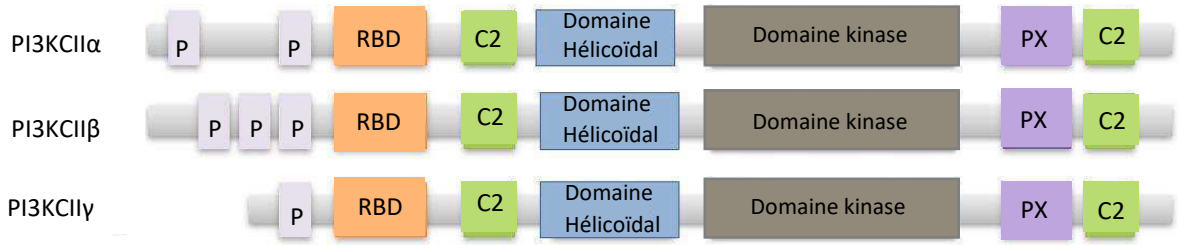


Figure 41 : Structure des isoformes de PI3K classe II. La classe II des PI3K est composé de 3 isoformes α, β et γ. Les monomères de PI3K de classe II ne nécessitent pas de sous-unité régulatrice pour exercer leur activité lipide kinase. Les trois isoformes divergent par le nombre de séquences riches en prolines en position N-terminale, mais possèdent toutes les 3 un domaine RBD, 2 domaines C2, un domaine hélicoïdal, un domaine d'activité kinase et un domaine PX. Le pourcentage d'identité de séquence est de 50% entre la PI3KCIIα /PI3KCIIβ et de 35% entre la PI3KCI α /PI3KCIIγ. P : Proline, RBD : Ras Binding Domain, C2 : domaine de liaison aux phospholipides, PX : Phox domain.

3. Les PI3K de classe III

Cette classe est composée d'une unique isoforme, VPS34 (Vacuolar Protein Sorting 34) qui présente un profil d'expression ubiquitaire. Sa structure se compose d'un domaine catalytique, d'un domaine en super hélice et d'un domaine C2. Son recrutement et son activation nécessitent son association avec une protéine sérine-thréonine kinase découverte chez la levure p150 (150KDa) ou VPS15 appelée aussi PIK3R4 (sous unité régulatrice n°4 de la phosphatidyl-insotiol 3 kinase). Le complexe VPS15-VPS34 joue un rôle important dans l'autophagie et dans le transport des vacuoles cytoplasmiques (Backer, 2016; Pampliega et al., 2013). Une étude réalisée au laboratoire en 2016 rapporte pour la première fois un rôle inédit de VPS15 dans le fonctionnement du cil primaire. Un variants pathogène a été identifié dans ce gène à l'état homozygote chez une patiente qui présentent un phénotype typique de ciliopathie. Les expériences réalisées dans le but de comprendre le rôle de VPS15 dans le cil ont permis de mettre en évidence la localisation de VPS15 dans le cis golgi où il interagit avec GM130 (une protéine marqueur du cis golgi) pour former un complexe. Ce complexe semble interagir avec IFT120 au niveau du cis golgi permettant son chargement dans les vésicules contenant des protéines ciliaires qui transitent depuis le cis golgi ver le cil le long des microtubules. L'implication de VPS15 dans le fonctionnement du cil primaire serait donc associé à un mécanisme IFT20 dépendant (Stoetzel et al., 2016).

B. Les pathologies associées au défaut du métabolisme des PI

Les dysfonctionnements ou les mutations dans les PI3K (phosphoinositide 3-kinase) sont associés à un certain nombre de maladies, notamment des cancers et des maladies génétiques rares. Les défauts du métabolisme des PI peuvent affecter un large éventail de systèmes organiques et entraîner des troubles neuromusculaires, squelettiques, rénaux, de la croissance oculaire et immunitaires, entre autres. Les défauts du métabolisme des PI conduisent à d'autres syndromes tels que le syndrome de Lowe (un trouble lié à l'X) et le syndrome de

Joubert, qui sont causés par des mutations dans l'inositol polyphosphate 5-phosphatases OCRL et INPP5E, respectivement. Les symptômes du syndrome de Lowe comprennent la déficience intellectuelle, la cataracte et l'insuffisance rénale (Prosseda et al., 2017). Le phénotype associé aux variants pathogènes de l'INPP5E est très différent et comprend l'hypo-dysplasie du vermis cérébelleux, le colobome, l'hypotonie, l'ataxie et la dysrégulation respiratoire néonatale (Radha Rama Devi et al., 2020; Travaglini et al., 2013). Il a été démontré que l'OCRL joue un rôle dans la maintenance des cils et que le syndrome de Lowe implique un dysfonctionnement ciliaire (Luo et al., 2012). Comme d'autres exemples, des variants dans *PIK3CA* (classe I des PI3K) ont été trouvés chez des patients atteints de syndromes de surcroissance tels que le syndrome de CLOVES et le syndrome PROS (PIK3CA-related overgrowth spectrum). Ces syndromes se caractérisent par une croissance disproportionnée globale ou associée à d'autres anomalies, notamment des malformations vasculaires et des troubles neurologiques et/ou viscéraux. Ces anomalies sont liées à une activation anormale de la voie PI3K-AKT-mTOR causée par une mutation activatrice en mosaïque du gène *PIK3CA* (Keppler-Noreuil et al., 2015; Martinez-Lopez et al., 2017; Venot et al., 2018). En outre, certaines études ont suggéré un rôle potentiel de PI3K dans certains types de cancer, tels que le cancer du sein et le carcinome hépatocellulaire, et que la voie PI3K pourrait être une cible pour le traitement du cancer (Miricescu et al., 2021; Mishra et al., 2021). Il a été rapporté que les variants dans *PIK3CD* ont été associées à une immunodéficience dominante appelée le syndrome PI3K-delta activé (APDS, activated PI3K-delta syndrome) (Jamee et al., 2020). Les syndromes décrits ci-dessus ne sont que quelques exemples du large spectre des anomalies causées par un trouble du métabolisme des PI. Il est intéressant de noter qu'ils présentent une diversité de manifestations phénotypiques, soulignant le fait qu'il n'y a pas de redondance fonctionnelle entre les gènes connus pour réguler la même transformation enzymatique des PI.

Dans ce projet je me suis intéressé à la classe II des PI3K et plus précisément à *PIK3C2A*. Par la suite je vais développer la fonction de cette protéine au niveau cellulaire et précisément au niveau du cil primaire, ainsi que le syndrome dans lequel elle est impliquée.

C. PIK3C2A/PIK3C2α

PIK3C2A ou PIK3C2α (Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Type 2 Alpha) est une isoforme de la classe II des PI3K. Le gène *PIK3C2A* (NM_011083.2), situé sur le chromosome 11 (11p15.1) contient 35 exons et code pour une protéine de 1686 AA (190KDa) (NP_035213.2). Cette protéine présente une expression ubiquitaire * et une structure comme décrite ci-dessus (dans la partie les PI3K de classe II). Les fonctions des PI3K de classe II sont moins bien comprises que celles des PI3K de classe I et de classe III. Les PI3K de classe II sont impliquées dans une multitude de processus différents et leur fonction spécifique dans la cellule n'est pas encore complètement comprise. Cependant, des études génétiques et biochimiques récentes ont mis en évidence les rôles non redondants de l'isoforme α des PI3K de classe II (Lo et al., 2022).

Ces études montrent que PIK3C2A catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol (PI) et du PI(4)P en PI(3)P et PI(3,4)P2 respectivement dans des compartiments subcellulaires spécifique (Jean and Kiger, 2014). Ces produits sont des régulateurs essentiels de la dynamique membranaire et la compréhension de leur rôle permet d'éclaircir la façon dont PIK3C2A influence la dynamique des vésicules et des complexes de signalisation (Aki et al., 2015; Yoshioka et al., 2012). Cette enzyme joue donc un rôle dans divers processus cellulaires, notamment le trafic vésiculaire, l'endocytose, l'exocytose, l'angiogenèse, le réarrangement du cytosquelette et l'autophagie. Elle présente une localisation large dans la cellule non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau de l'appareil de Golgi et dans les différents d'endosomes (allant des endosomes précoces aux vésicules de recyclage). Cette large distribution provient de sa structure protéique complexe contenant plusieurs domaines impliqués dans les interactions protéine-protéine et protéine-lipide qui lui confère un rôle majeur au cours du trafic endocytaire et exocytaire de récepteurs et plus récemment décrit dans le processus d'autophagie (Campa et al., 2015; Devereaux et al., 2013; Merrill et al., 2017). Chez les mammifères PIK3C2A joue un rôle important dans les cellules endothéliales, où elle favorise le trafic endosomal via l'activation de RhoA (Ras homolog family member A) et la régulation des niveaux de PI3P. Ce processus est nécessaire au ciblage de l'endothélium vasculaire (VE)-cadhérine sur les jonctions serrées et, par conséquent, à la maturation des cellules endothéliales et à l'intégrité des vaisseaux (Yoshioka et al., 2012). PIK3C2A joue des rôles multiples au niveau de différents compartiments membranaires et plus particulièrement au niveau de la membrane plasmiqueen permettant la production de PI(3,4)P2. Ce lipide est crucial pour la maturation des puits recouverts de clathrine et pour l'endocytose médiée par la clathrine (une protéine structurelle constituant l'enveloppe de certaines vésicules).

1. Rôle de PIK3C2A dans le cil primaire

Il est intéressant de noter que le trafic vésiculaire et le métabolisme des PI (PtdIns) phosphorylés convergent dans l'organisation et le maintien fonctionnel du cil primaire. De ce fait, en plus de son rôle au niveau cellulaire, PIK3C2A apparaît comme un acteur clé dans l'assemblage et la fonction du cil primaire, notamment dans la régulation de la voie SHH. Une étude menée en 2014 par Franco *et al* montre que PIK3C2A produit du PI3P dans le but d'assurer un trafic péricentriolaire responsable de la localisation et de l'activation de Rab11 et Rab8 à la base du cil, deux GTPases essentielles à la biogenèse de cet organelle (Franco et al., 2014). PI3KC2A contrôle la production de PI3P dans le compartiment de recyclage endocytaire (ERC) situé à la base du cil primaire (figure 42A).

L'ERC est un compartiment dans lequel s'effectue un tri sélectif entre les molécules qui seront dégradées et celles qui seront recyclées vers la membrane plasmique. Ce pool spécifique de PI3P dans les ERC est nécessaire pour activer la cascade Rab11/Rab8 et promouvoir la translocation de SMO vers l'axonème ciliaire. Rab11 et Rab8 sont des GTPases spécifiques de la famille des Rab qui par une cascade d'événements permettent la délivrance et l'ancrage des

vésicules sécrétoires (provenant de l'appareil de golgi et des ERC) à la base du cil primaire (Yoshimura et al., 2007). La cascade s'enchaîne comme suit, PIK3C2A produit PI3P au niveau des ERC. A la base du cil PI3P active Rab11 qui s'associe directement à Rab8 et stimule sont activation par Rabin8 (Feng et al., 2012) (Figure 42B). L'activation de Rab8 est essentielle pour l'entrée des protéines cargos impliquées dans l'élongation et la fonction du cil dans le compartiment ciliaire. Ainsi, une perte de PIK3C2A ou le dysfonctionnement de cette protéine se traduit par une absence de PI3P dans les ERC, une inactivation de Rab11, une localisation défectueuse de Rab8 à la base du cil et donc une inactivation de Rab8 qui finalement induit la réduction de l'élongation du cil (un cil plus court sera produit). Pour confirmer cette l'implication de PIK3C2A dans la cascade Rab11/Rab8, des expériences ont été réalisées sur des cellules MEF (mouse embryonic fibroblasts) KO *Pik3c2α*$^{-/-}$, les résultats montrent qu'en absence de Pik3c2a, la quantité de Pi3p à la base du cil diminue d'une façon importante, le pourcentage de Rab8 dans les cils réduits sévèrement par rapport au cellules wild type (WT, 70% de Rab8 dans le cil) et les cils de ces cellules sont plus court. Tous ces résultats confirment que Pik3c2a favorise la fonction de Rab8 et influence ainsi l'élongation de cil (Franco et al., 2014).

En plus de son effet sur l'élongation du cil, il a été démontré que PI3KC2A affecte l'internalisation des récepteurs membranaires tels que TGFβ et VEGFR2, il est donc envisageable de supposer une implication similaire dans l'internalisation de SMO dans le cil primaire.

Des études ont montré que dans les cellules NIH 3T3 (lignée cellulaire dérivée de fibroblastes embryonnaires de souris) KO *Pik3c2α*$^{-/-}$, la quantité du récepteur SMO dans les cils primaires, après stimulation de la voie Hh, était significativement réduit par rapport aux cellules WT. Inversement, la transfection du mutant constitutivement actif de Rab11 (GFP-Rab11Q70L) ainsi que du mutant *PI3KC2αcIII* activant Rab11 a permis de normaliser la localisation ciliaire de SMO lors de la stimulation de la voie Hh dans les cellules déficientes en *Pik3c2α* $^{-/-}$ montrant ainsi que la cascade PI3KC2α/Rab11 est nécessaire pour une translocation ciliaire efficace de SMO et une activation normale de la voie Hh. De manière intéressante, l'utilisation du SAG (Smo Agoniste) pour activer la voie Hh dans les même cellules (NIH 3T3 *Pik3c2α* $^{-/-}$), permet une activation normale de cette dernière. La stimulation par le SAG, différente de celle par le ligand endogène Sonic Hedgehog (SHH), est capable d'activer les cibles en aval de Hh sans nécessiter la translocation de SMO dans les cils. Ceci confirme que la régulation de la voie Hh par *Pik3c2α* se fait à travers la cascade Pi3p-Rab11-Rab8 permettant l'acheminement de protéines cargos et de récepteurs membranaires dans le cil dont SMO.

En accord avec le rôle de PIK3C2A dans cet organite, des études ont été réalisé sur des embryons de souris *Pik3c2α* $^{-/-}$ qui présentent une mortalité à la mi-gestation et des signes d'altération de la signalisation Hh. Ceci est dû à l'accumulation défectueuse de l'effecteur de la voie Hh Smoothened (Smo) sur la membrane des cellules *Pik3c2α* $^{-/-}$. Ce processus nécessite

l'activation de Rab11, car seul Rab11 constitutivement actif est capable de restaurer la signalisation Hh dans les cellules *Pik3c2α* $^{-/-}$ (Franco et al., 2014) (Figure 42B).
L'ensemble de ces résultats illustre que les phospholipides ciliaires métabolisés par ces différentes phosphatases et kinases jouent le rôle d'un « code barre » qui assure l'assemblage, la stabilité et le fonctionnement du cil. Ce code doit être minutieusement régulé pour garantir l'intégrité du cil primaire nécessaire au développement embryonnaire ou l'intégrité tissulaire à l'âge adulte.

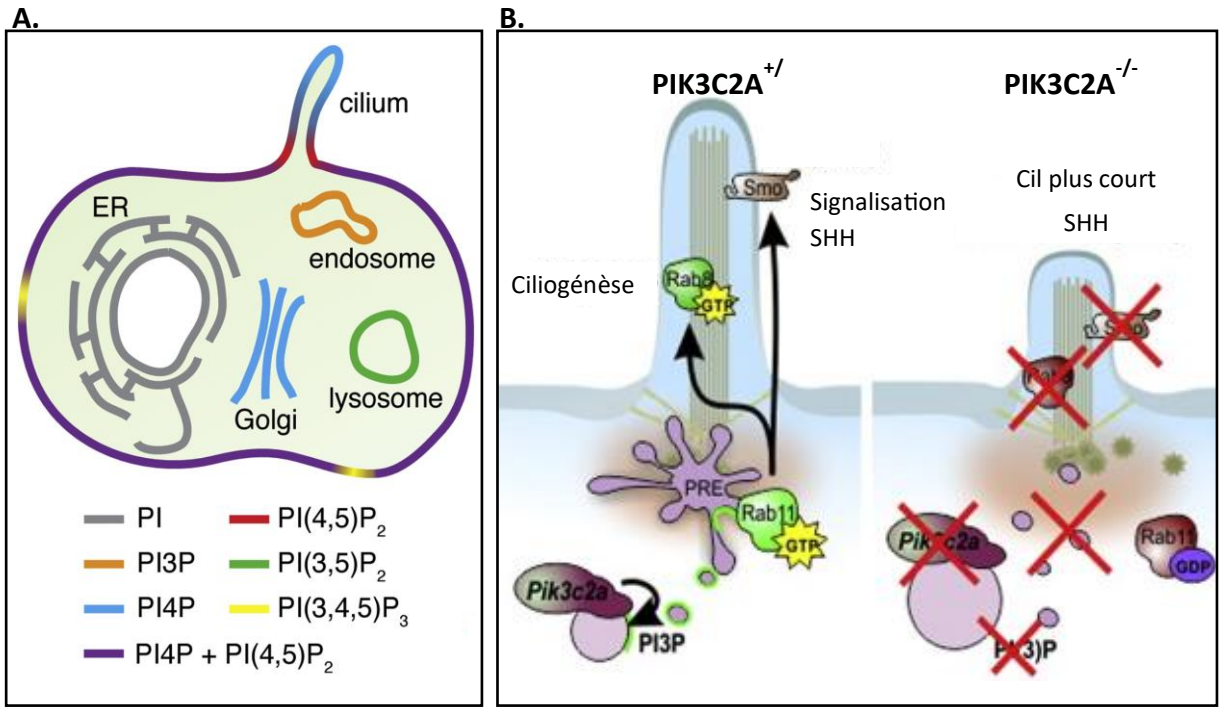


Figure 42 : Rôle de PIK3C2A dans le cil primaire. A. Représentation de la localisation des phosphoinositides dans des membranes cellulaires distinctes (ER : réticulum endoplasmique). PI3P un des produits de PIK3C2A est surtout concentré dans l'endosome à la base du cil primaire (Nakadsu *et al.* 2015). **B.** PIK3C2A produit PI3P qui s'accumule dans le compartiment de recyclage endocytaire (PRE : pericentriolar recycling endocytic compartment) et active la voir Rab11/Rab8 qui joue un rôle dans l'élongation du cil et dans l'activation de la voie SHH à travers la translocation de Smo dans le cil. L'absence de PIK3C2A induit des problèmes dans l'élongation du cil et dans la régulation de la voie SHH (adapté de *Franco et al.* 2014).

2. Le syndrome lié à *PIK3C2A*

Dans une étude réalisée en 2019 par Tiosano *et al*, *PIK3C2A* a été associé pour la première fois à un nouveau syndrome mendélien causé par à un trouble du métabolisme des PI. Il s'agit du syndrome OCSKD (oculoskeletodental syndrome, MIM#618440), caractérisée par une cataracte congénitale, une surdité, une petite taille, des traits faciaux grossiers et des anomalies du squelette. Il a été d'abord identifié dans trois familles consanguines, dont les 5 patients présentaient des variants dans *PIK3C2A* à l'état homozygote. Des tests cellulaires sur les fibroblastes de peau des patients ont permis d'associer les variants dans *PIK3C2A* à un dysfonctionnement ciliaire. Les résultats ont montré des altérations des cils primaires

notamment au niveau de leur élongation (des cils plus courts par rapport au contrôles) confirmant ainsi le rôle de PIK3C2A à la base du cil comme discuté précédemment (Tiosano et al., 2019). Une deuxième étude (Galarreta et al., 2022) a identifié deux nouveaux patients d'une même famille porteurs de variants dans le même gène avec un phénotype semblable au syndrome déjà décrit permettant ainsi d'élargir le spectre du syndrome lié à *PIK3C2A*.

II. Synopsis

A ce jour, seulement 7 patients issus de 4 familles ont été rapportés avec des variants dans le gène *PIK3C2A* et atteints du syndrome OCSKD. Le cas que nous rapportons ici est le 8ème cas mondial (5ème famille) porteur de variants dans le gène *PIK3C2A*. La patiente présente une cataracte congénitale et une surdité. Le séquençage de l'exome de la patiente et de ses parents a permis d'identifier chez cette dernière deux nouveaux variants à l'état hétérozygote. Le premier variant (c.1024C>T, p.(Arg342*)) est un variant pathogène (classe 5). C'est une substitution qui crée un codon stop prématuré dans l'exon 1 permettant de suggérer une absence d'expression de l'allèle porteur. Le deuxième variant (c.3695T>C, p.(Phe1232Ser)) est une substitution d'une phénylalanine en sérine dans l'exon 23, c'est un variant de signification incertaine (VSI). L'analyse de l'exome ayant été réalisé par ailleurs, j'ai tout d'abord déterminé le statut biallélique des variants, la co-ségrégation familiale par des techniques de PCR et de séquençage Sanger. Les variants sont bien en *trans* et hérités de chacun des parents (c.1024C>T du père et c.3695T>C de la mère) qui sont des porteurs hétérozygotes de chaque variant.

Dans un premier temps, j'ai réalisé des tests fonctionnels pour déterminer l'effet des variants sur l'expression du gène et de la protéine ainsi que sur la fonction de la protéine. Les résultats que j'ai obtenus m'ont permis de confirmer la pathogénicité des variants permettant ainsi de reclasser le VSI en variant probablement pathogène (classe 4). Ce résultat permet d'apporter un diagnostic moléculaire à la famille et de manière très importante de pouvoir bénéficier d'un conseil génétique dans le cas d'un nouveau projet parental.

Dans un second temps, dans le but d'examiner l'impact de ces variants sur le cil primaire, j'ai appliqué la « boite à outils ciliopathie » en réalisant les tests cellulaires déjà décrits sur les fibroblastes cutanés de la patiente. La patiente présente un taux normal de cellules ciliées, des cils plus courts, une voie SHH plus active et une prolifération cellulaire moins importante. Ces résultats montrent que les variations du gène *PIK3C2A* causent des altérations ciliaires et cellulaires confirmant l'importance du rôle de PIK3C2A au niveau du cil primaire et de la régulation des processus cellulaire notamment la prolifération.

Ainsi avec cette étude nous rapportons un 8ème cas présentant des variants dans le gène *PIK3C2A* associés à un dysfonctionnement du cil. Cette étude va permettre d'élargir le spectre du syndrome causé par *PIK3C2A* et de compléter les connaissances sur les troubles du métabolisme des PI. Ceci permettra également de montrer l'importance du rôle de PIK3C2A et des PI3K de classe II en général dans la régulation de la signalisation cellulaire et la formation du cil primaire. Ce projet fait l'objet d'un article qui sera soumis prochainement.

III. Article

Refining the *PIK3C2A* related phenotype genotype charaterization and link with functional SHH primary cilia defect

Adella Karam[1†], Clarisse Delvallée[1†], Bénédicte Gérard[2], Elodie Javey[2], Pascal Kessler[3], Valérie Pelletier[4], Jean-Baptiste Lamouche[5], Nicolas Le May[1], Jean Muller*[1,2,5] and Hélène Dollfus*[1,4,5].

1. Laboratoire de Génétique médicale, UMR_S INSERM U1112, Institut de Génétique Médicale d'Alsace (IGMA), Université de Strasbourg, Strasbourg, France.
2. Laboratoires de Diagnostic Génétique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.
3. Université de Strasbourg, Inserm UMS 38, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg,
4. Centre de Référence pour les affections rares en génétique ophtalmologique, CRMR CARGO, Filière SENSGENE (FSMR), Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France.
5. Unité Fonctionnelle de Bioinformatique Médicale appliquée au diagnostic (UF7363), Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France,
6. Service de Génétique Médicale, Institut de Génétique Médicale d'Alsace (IGMA), Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

[†]The first two authors contributed equally to this work.
[*]The last two authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: Jean Muller/Hélène Dollfus
Email address: jeanmuller@unistra.fr/dollfus@unistra.fr

ABSTRACT

PIK3C2A is a class II member of Phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) family of lipid kinases that catalyses the phosphorylation of phosphatidylinositol (PI) into PI(3)P and the phosphorylation of PI(4)P into PI(3,4)P2. These second messenger lipids regulate a wide range of downstream signaling pathways involved in many physiological functions and cellular processes, including cell proliferation, growth, survival, motility, and metabolism. PIK3C2A is also involved in the regulation of primary cilia formation and maintenance and in the regulation of receptor-mediated endocytosis at the base of the cilium. *PIK3C2A* was first related to a disease in 2019 and patients are characterized by short stature, coarse facial features, ocular and skeletal abnormalities defining a novel OCSKD syndrome (Oculoskeletodental). We describe here the 5th family (8th wordwide case) presenting a *PIK3C2A*-related syndrome characterized by congenital cataract and deafness.

Exome sequencing of the patient and her parents revealed two novel compound heterozygous variants in *PIK3C2A* of which one required functional testing to reclassify from class 3 (uncertain significant) to class 4 (probably pathogenic). Cellular studies of patient's derived-skin-fibroblasts revealed a normal PIK3C2A protein level but a defective enzyme. Ciliary and cellular phenotype studies showed impaired cilia formation and function, as the patient had shorter cilia and a defective SHH signaling pathway activation, in addition the patient cells demonstrated reduced proliferative capacity.

This study will expand the spectrum of *PIK3C2A*-related syndrome and will enrich the knowledge of PI metabolism disorders.

Keywords: *PIK3C2A* gene, PI metabolism disorders, primary cilium, sonic hedgehog signaling pathway

INTRODUCTION

Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) are members of a large protein family that catalyzes the phosphorylation of phosphatidylinositol (PI), allowing the formation of second messengers for a variety of signaling pathways (Boukhalfa et al., 2020; Ja et al., 2006). Based on structure and substrate specificity, this family can be divided into three classes (Vanhaesebroeck et al., 2010). PIK3C2A is a typical class II member of PI3K family that is adundantly expressed with important functions during organism development (Mountford et al., 2015). The functions of class II PI3Ks are less well understood than those of class I and class III PI3Ks. PIK3C2A is generally thought to catalyse the phosphorylation of phosphatidylinositol (PI) and PI(4)P into PI(3)P and PI(3,4)P2 respectively (Jean and Kiger, 2014). Thus this enzyme plays a role in a variety of cellular processes, including vesicular trafficking, endocytosis, exocytosis, angiogenesis, cytoskeletal rearrangement, and autophagy (Boukhalfa et al., 2020; C et al., 2010; Devereaux et al., 2013; Falasca and Maffucci, 2012; Yoshioka et al., 2012). PIK3C2A is also involved in the regulation of primary cilia formation and maintenance, which are antenna-like organelles that protrude from the surface of many cell types and play important roles in sensory signaling and cell signaling pathways (Franco et al., 2014). These pathways control many physiological functions and cellular processes, including cell proliferation, growth, survival, motility, and metabolism (Ja et al., 2006; Wadhwa et al., 2017). Among those the Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway is one of the most studied pathways in vertebrates that is connected and strictly dependent on an intact primary cilium. Interestingly in mouse, lack of PIK3C2A has been associated with defects in primary cilium elongation, reduction of SHH signaling alteration and ultimately impairment of embryonic development (Franco et al., 2014).

Several disorders have been related to PI metabolism and pathogenic variations in PI3K genes have been associated with various diseases including cancers. PI metabolism defects may affect a wide range of organ systems that can lead to neuromuscular, skeletal, renal, eye growth and immune disorders as well as others. Interestingly, VPS15/PIK3R4, which belongs to PI3K class III, was implicated for the first time in ciliopathy in a study carried out in 2016. This study highlighted the role of VPS15 in the cilium, which is associated with an IFT20-dependent mechanism. Abnormalities of the ciliary phenotype were detected in the patient carrying a homozygous pathogenic variant in VPS15 and presenting a typical ciliopathy phenotype (Stoetzel et al., 2016). PI metabolism defects leads to other syndromes such as Lowe's syndrome (an X-linked disorder) and Joubert syndrome which are caused by mutations in the inositol polyphosphate 5-phosphatases *OCRL* and *INPP5E,* respectively. Lowe's syndrome symptoms include intellectual disability, cataracts, and renal failure (Attree et al., 1992; Leahey et al., 1993; Prosseda et al., 2017). The phenotype associated with pathogenic variants in *INPP5E* is quite different and includes cerebellar vermis hypo-dysplasia, coloboma, hypotonia, ataxia, and neonatal breathing dysregulation (Radha Rama Devi et al., 2020; Travaglini et al., 2013). It has been demonstrated that *OCRL* plays a role in cilia maintenance and that Lowe syndrome involves ciliary dysfunction (Luo et al., 2012). As other examples, *PIK3CA* variants have been found in patients with overgrowth syndromes such as CLOVES syndrome and PROS (PIK3CA-related overgrowth spectrum). These syndromes are characterized by global or localized disproportionate growth associated with other anomalies, including vascular malformations and neurological and/or visceral disorders. These anomalies are related to abnormal PI3K-AKT-mTOR pathway activation caused by mosaic activating mutation in gene *PIK3CA* (Keppler-Noreuil et al., 2015; Martinez-Lopez et al., 2017; Venot et

al., 2018). In addition, some studies have demonstrated the implication of PI3K in certain types of cancer, such as breast cancer and hepatocellular carcinoma and that PI3K pathway may be a target for cancer therapy (Miricescu et al., 2021; Mishra et al., 2021). The syndromes described above are just a few examples of the broad spectrum of the anomalies causes by PI metabolism disorder. Interestingly, they display a diversity of phenotypic manifestations, underlining the fact that there is no functional redundancy between genes known to regulate the same enzymatic transformation of PI.

In 2019, *PIK3C2A* was associated for the first time to a novel rare syndromic disorder called Oculoskeletodental syndrome (OCSKD MIM#618440) involving neurological, visual (cataracts), skeletal, growth (short stature), and occasionally hearing impairments. These recurrent features were identified in five patients from three unrelated consanguineous families, and due to homozogous loss-of-function (LoF) variants in *PIK3C2A* thus to supposed complete deficiency of the PIK3C2A enzyme. In addition, PIK3C2A deficiency was demonstrated in patient derived-skin fibroblasts with assicated impaired primary cilia formation and function and reduced cell proliferation capacity (Tiosano et al., 2019). In 2022, another report identified two siblings from a nonconsanguineous family harboring compound heterozygous loss-of-function variants in *PIK3C2A*. Patients showed a constellation of features similar to those originally described, but new findings emerged, including intrafamilial variability and proteinuria present in only one sibling. This report extented the phenotype of the *PIK3C2A* related syndrome by presenting two new cases (Galarreta et al., 2022).

Herein, an additional case of this ultra OCSKD phenotype is demonstrated to be related to *PIK3C2A*. The patient is the only daughter of a nonconsanguineous European Caucasian family with compound heterozygous variants in *PIK3C2A*. Functional tests revealed the pathogenicity of the variants and shed light on the PIK3C2A cellular phenotype. Furthermore, this study expands the clinical and mutational spectrum of the *PIK3C2A*-related syndrome and enrich the knowledge of PI metabolism related disorders.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Studies on ciliopathies have been approved by our Institutional Review Board "Comité de Protection des Personnes" (EST IV, NDC-20142222) and written informed consent for research and publication was obtained from each participant. We declare that the present research complies with the declaration of Helsinki.

Whole Exome Sequencing

Whole exome sequencing was performed on the proband from family V (II.1) and a pool of mixed father and mothers samples. DNA Sequence capture was performed using the Twist human core exome (Twist Bioscience). Sequencing was performed on a HiSeq4000 instrument (Illumina, San Diego, CA, United States) to generate 100-bp paired-end reads following the manufacturer's protocols. Our in house bioinformatics pipeline (STARK18 v0.9.18.2) was applied to the raw data and the 37,124,067 validated and unique reads could be obtained after alignment to the reference human genome (GRCh37/hg19) using BWA v0.7.5a (Li and Durbin, 2009) leading to 97.1% of the bases covered at least by 10x. The UnifiedGenotyper and HaplotypeCaller from the GATK toolkit v3.8-1-0 were used to call both single nucleotide variants (SNV) and small insertion/deletions (indel) (DePristo et al., 2011). The annotation and ranking of the 60,672 SNV/indel were performed using VaRank 1.4.3 (Geoffroy et al., 2015) in combination with the Alamut Batch standalone software 1.11 and corresponding database v12012022 (Sophia Genetics) (Supplementary Table S1). Very stringent filtering criteria were applied to filter out non-pathogenic variants including (i) allele frequency >1% in public variation databases such as the 1000Genomes (Altshuler et al., 2015), gnomAD v2.2 (Lek et al., 2016) or our internal exome database, (ii) variants in 5′ and 3′ UTR, downstream, upstream or intronic locations and synonymous without pathogenic prediction of local splice effect, (iii) benign and likely benign variant in ClinVar. Structural variants were called using CANOES (Backenroth et al., 2014) and annotated by AnnotSV 3.1 (Geoffroy et al., 2021). Each candidate variations were also checked using the Integrative Genomics Viewer (IGV) software (Thorvaldsdottir et al., 2013).

Cell Culture

Primary dermal derived fibroblasts from the patient (II.1) and control individuals were obtained by skin biopsy according to a protocol previously described (Scheidecker et al., 2014) (Supplementary Table S2). The fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glutamax (21885-025 Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin–streptomycin (PS) (all from Gibco). To induce ciliogenesis, the fibroblasts were grown in serum-reduced media (0.1% FCS) for 48h. To induce SHH pathway stimulation, the fibroblasts were stimulated with smoothened agonist (SAG, Abcam ab145866) at a final concentration of 100 nM for 48 h with and without serum starvation.

Cell Proliferation Assay

To measure cell proliferation, cells were detached using trypsin and counted with an Automated Cell Counter (LUNA-FL™). Cells were plated in triplicate in 24-well plates (10^4 cells/well). IncuCyte® NucLight Rapid Red reagent was added in each well to fluorescently label the nucleus of living cells (Sartorius Cat# 4717). Viability was measured by with IncuCyte S3-Sartorius on a duration of 10 days with images acquisition every 2H. Each measurement

was normalized to day 0 (measured the day after plating) and expressed as a fold increase. Three independent experiments were performed. Statistical analysis was done using GraphPad Prism software. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test. ns: non-significant** $p < 0.01$.

Genomics DNA extraction, PCR, Sanger sequencing

Confirmation of the two variants and segregation was performed by Sanger sequencing on genomic DNA. DNA was extracted from blood cells using a DNeasy Blood & Tissue Kit (ref 69504, Qiagen). DNA concentration was evaluated by spectrophotometry (Eppendorf Bio Photometer Plus). Two pairs of primers were designed on either side of the variants. Genomic PCRs were carried out with diluted DNA to 10 ng/reaction, diluted Tag DNA polymerase (2U/reaction), and PCR mix 5× to 1×. Sequences were obtained using Sanger sequencing after PCR amplification and fragments' purification (membrane placed under vacuum for 10 min). Bidirectional sequencing of the purified PCR products (with the appropriate primers) was performed by the GATC Sequencing Facilities (Konstanz, Germany).

Confirmation of the non-expression of the allele with nonsense variant by Sanger sequencing on cDNA. RNA extraction and reverse-transcription assay are described below. PCR was carried out using 10 ng of cDNA/reaction and Sanger sequencing was performed on purified PCR fragments as described before. Primers for both PCRs were designed using Ensembl (Martin et al., 2023), Primer3 (https://github.com/primer3-org, accessed in February 2020), the UCSC "in silico PCR" (Nassar et al., 2023) and NCBI primers (Sayers et al., 2022). Primers are available in Supplementary Table S3. PCR conditions are available upon request.

RNA Extraction, Reverse-Transcription, and Quantitative Real-Time PCR

RNA was extracted from skin-derived fibroblasts via QiaShredder (Qiagen, ref 79654) and RNeasy Minikit (Qiagen, ref 74104) kits. RNA concentration was evaluated by spectrophotometry (Eppendorf Bio Photometer Plus). cDNA was synthesized via an "iScript ™ c Synthesis Kit" (170-889, Bio-Rad, USA) according to the manufacturer's instructions with 500 ng of RNA. Quantitative real-time PCR was carried out with an iQTM SYBR Green Supermix (#170-8886, Bio-Rad) in a Bio-Rad CFX96/384™ Real-Time System in triplicate. cDNA was diluted to 1/10 and *PIK3C2A*, *GLI1*, *PTCH1* and *GAPDH* (house-keeping gene) primers were used at a concentration of 0.25 µM. The primers are available in **Supplementary Table S3**. The normalized fold expression of the target genes was calculated using the comparative cycle threshold (C_t) method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) by normalizing target messenger RNA (mRNA) C_t to those for *GAPDH* reference gene using CFX Manager Software Version 1.5 and Microsoft Excel calculations. Data are presented as relative expressions ± SEM. Statistical analyses were done using the GraphPad Prism software. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

Protein Extraction and Western Blot

Protein was extracted from skin-derived fibroblasts with a radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) containing Protease Inhibitor Cocktail (25×, Complete EDTA free, 05056489001, Roche). Protein quantification was performed with the Bradford test using an Eppendorf BioPhotometer Plus spectrophotometer. A total of 40 µg of protein was separated on 10% polyacrylamide homemade gel and transferred onto a PVDF membrane (0.2 µM, Trans-Blot Turbo, Transfer Pack, Bio-RaD, 1704156) using the TransblotR TurboTM Transfer System (Bio-Rad). After blocking in 5% milk–TBS1X–Tween 0.1% for 1 h at room temperature, the membrane was probed with the primary antibody overnight at 4 °C, followed by HRP-conjugated secondary antibody incubation for 1 h at room temperature. Chemiluminescent detection was performed using a ChemidocTM MP Imaging System (Bio-Rad) with PierceTM

ECL Western (ref 32209, Thermoscientific) and SuperSignal R West Femto Maximum Sensitivity Substrate (prod #34095, Thermoscientific) solutions. Quantification of bands was performed using Image Lab software 6.0.1 (Bio-Rad). PIK3C2A quantification data performed in triplicate were normalized to the reference cytoplasmic protein β-Tubulin. Antibodies used in this experiment are available in **Supplementary Table S4.**

Lipid Extraction and ELISA Assays

Determination of PIK3C2A activity using an ELISA test was done by quantifying the amount of PI3P found in patient's and control's skin fibroblasts. ELISA and lipid extractions were performed following the manufacturer's instructions (Echelon Biosciences Inc, K-3300). After following a non-radioactive lipid extraction protocol, the PI3P samples obtained from millions of cells are detected on a competitive ELISA. The cellular PI3P samples are mixed and incubated with a PI3P Detector protein, then added to a PI3P-coated microplate for competitive binding. A peroxidase-linked secondary detector and colorimetric detection is used to detect the PI3P protein binding to the plate. The absorbance was detected at 450nm on a plate reader. The colorimetric signal is inversely proportional to the amount of PI3P obtained. The assay is sensitive to 1.0 pmol PI3P. PI3P quantities were estimated by comparing the values from the wells containing PI3P extraction samples to the values in the standard curve. The experiment was performed on biological samples in triplicate and PI3P extracts were deposit in quadruplicate on the ELISA plate. Statistical analysis was done using GraphPad Prism software. *p*-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test). ns: non-significant, ****: $p < 0.0001$.

Immunofluorescence Analysis

The experiments carried out to induce ciliogenesis and to study the number of ciliated cells and cilia length were carried out as described in (Karam et al., 2023). To induce primary cilia formation, the fibroblasts were grown in serum-reduced media (0.1% FCS) for 48 h. Skin-derived fibroblasts were grown on 24-well plates (Falcon, 3226) and Lab-Tek8-well chamber slides (Thermo Scientific Nunc 15411). The fibroblasts were subsequently fixed in ice-cold methanol at −20 °C for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS 1×, and blocked in 10% FCS in PBS 1× for 1 h at room temperature. Incubation with primary antibodies diluted in 2% FCS was done for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C. Secondary antibody incubation was carried out for 1 h at room temperature. For those realized in Lab-Tek8-well, nuclei were visualized using Hoechst, and images were obtained using an inverted fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). For those realized on 24-well plates, images were obtained using an IncuCyte S3-Sartorius and were analyzed using ImageJ. Cilia frequency was calculated from the number of cells with a primary cilium divided by the total number of cells ($n = 400$ cells analyzed). *p*-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA ****: $p < 0.0001$. Primary cilia length was measured via IncuCyte software irrespective of the angle of orientation ($n = 400$ cilia). *p*-values and significance were determined using Kruskal–Wallis test ****: $p < 0.0001$. The number of cilia (n) measured consisted of pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment. PI3P around the cilia was detected in randomly chosen cells using the same exposure for each acquisition following its labeling with a specific anti-PI3P antibody (Echelo Z-P003). PI3P was quantified by measuring the number of the green spots and their surface area within a diameter of 8µm around the cilia. The analysis was performed with Fiji using an in-house developed macro to measure these data. Images were taken with an inverted confocal fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). Statistical analysis was done using GraphPad Prism software. Antibodies used in this experiment are available in **Supplementary Table S4**.

RESULTS

Index patient case history

Individual II.1 is the first child born to nonconsanguineous healthy parents. The daughter has a history of developmental abnormality associating an anorectal malformation with a suspected Hirschsprung's disease and a vaginal septum and a rectovestibular fistula treated by surgery . In her early childhood, clinodactyly of the 5th fingers was reported. She disclised the following morphological aspect of the face with a wide tip of the nose which contrasts with a certain degree of nasal root hypoplasia, an elongated, pointed chin, slightly coarse features with palpebral clefts that appear quite long and horizontal. She was diagnosed with right deafness due to right cochlear aplasia. She was referred to the CARGO (centre of reference for rare eye diseases) because of corneal clouding and an history of unoperated cataracts in the context of an unexplained syndromic presentation. Visual acuity was for the Rigth eye 5/10 (Monoyer chart equivalent of +0.5 LogMAr) and for the left eye 8/10 (Monoyer Chart équivalent of +0.1 LogMar) . Because of extreme photophobia an exam under general anesthesia was performed . Bilateral moderate cataracts associated to primary corneal clouding without glaucoma was observed . No retinal dystrophy was diagnosed but myelinated fibers observed

Identification and characterization of bialleleic variants in *PIK3C2A*

To identify the candidate gene for this family, whole exome sequencing was performe for the affected individual and for both parents. Sequencing analysis revealed two novel candidate variants in *PIK3C2A* (NM_002645.4): one nonsense variant in the first coding exon (c.1024C>T, p.(Arg342*)) and one missense in exon 24 (c.3695T>C, p.(Phe1232Ser)) (Figure 1). Both variant are absent from control populations and have been found inherited each by one of the parent (**Figure1B**). PIK3C2A is a 1,686 aminoacids long protein encoded from 33 exons and located on chromosome 11.

The first variant is a nonsense variant in exon 2 inherited from the father. This variant is classified as pathogenic (class 5) according to the ACMG (Richards et al., 2015). The nonsense variant is predicted to truncate 1,344 amino acids from the PIK3CA protein (96% of the protein length), including almost all the protein domains especially the catalytic kinase domain. Moreover given the position of the variant it should be subject to nonsense mediated decay (NMD) (Coban-Akdemir et al., 2018) with no detectable expression of the allele harboring this variant. To confirm this hypothesis, RNA expression levels of the *PIK3C2A* gene was evaluated by RTqPCR (Figure2A). A significant decreased level of *PIK3C2A* mRNA from the patient's skin fibroblasts could be observed compared to healthy controls suggesting indeed that this allele is not expressed (Figure 2A). To confirm that the decreased expression level is only due to this allele, Sanger sequencing of the cDNA was performed. The sequence revealed only the second variant at the homozygous state and no signal for the other variant (**Figure 2B**). In other words, the only expressed allele is the one carrying the missense variant.

The second variant is a missense in exon 24 inherited from the mother. This variant is of uncertain significance (class 3) without further investigation and causes a substitution of the phenylalanine at position 1232 by a serine. The PIK3C2A protein is composed of several domains according to SMART (Letunic et al., 2021) including a RAS binding domain (RBD, 409-512), two Ca^{2+} binding motif (C2, 674-783 and 1573-1677), the PI3K accessory (PI3Ka, 861-1048) and catalytic domains (PI3Kc, 1134-1396) and a PHOX domain (PX, 1422-1534) (**Figure 1D**). The missense is located at a highly evolutionary conserved position (Supplementary Figure S1A). Protein modelling of the mutant protein highlights the possible LoF effect within

the kinase catalytic domain of the protein within due to the strong physicochemical impact (Supplementary Figure S1B-D). Bioinformatics predictions are in favor of a variant that affects the protein function (Supplementary methods).
Before studying the protein function, we first evaluated the protein expression level of PIK3C2A. Western blots were performed on total protein extracts from patient's and control's skin fibroblasts. The results show no difference in the protein expression level between the patient's and the control's fibroblasts (despite RNA decreased level) (**Figure 2C and D**). These results show that there is a compensation at the level of protein translation. The patient cells may respond by increasing the stability of certain mRNA molecules (the ones harboring the missense variant), which can help to maintain their levels and support continued protein translation.

Non-functional PIK3C2A leads to impaired PI metabolism

To evaluate the function of the remaining PIK3C2A allele, we tought to examine the PI metabolism using 2 independent methods. First, looking at the localization and quantification of PI3P spots at the base of the primary cilium by immunofluorescence assay, showed a decreased level of PI3P at the base of the patient's primary cilia compared to controls **(Figure 3A and B)**. Second, quantifying the level of PI3P throughout the cell using a dedicated ELISA assay showed a decreased level of PI3P in the patient skin fibroblasts compared to controls **(Figure 3C)**. Altogether these results strongly suggest that the PIK3C2A protein in patient cells is unable to generate PI3P, indicating a defective kinase activity. Taking into account that the only protein expressed is the one carrying the missense variant demonstrate the effect on the function and prompted us to reclassify the variant into class 4 (likely pathogenic).

Non-functional PIK3C2A has no effect on ciliogenesis but affects ciliary length and function as well as cell proliferation

To analyze primary cilia assembly in cells of this patient harboring bi-allelic *PIK3C2A* variants, ciliogenesis was induced by using serum-starvation-mediated cell-cycle arrest in confluent skin derived fibroblasts from the patient and controls as described previously (Karam et al., 2023). The primary cilium was visualized by immunostaining with antibodies targeted ARL13B and acetylated γ tubulin for the basal body **(Figure 4A)**. To determine the normal state of ciliogenesis, five control samples were investigated. No significant differences were observed between them, and all had more than 60% of their cells ciliated. The controls were thus pooled for comparison with the *PIK3C2A* patient's fibroblasts. Immunofluorescence analysis in the patient's skin-derived fibroblasts revealed a normal number of ciliated cells compared to controls. Indeed, when grown in ciliary conditions (0.1% FCS), the percentage of ciliated cells in the patient's cells was not altered (77% for both) (**Figure 4C**). However, looking at the ciliary morphology, a significant difference in cilia length could be observed. Indeed, the patient's cells harbored cilia significantly shorter than those of controls (~2µm vs. 3–4µm) (**Figure 4D**). *PIK3C2A* variants identified in our patient led to a normal cilium formation and a longer cilia length. These results indicate that a functional PIK3C2A protein is important for normal cilium length in fibroblast cells.
To test the effect of PIK3C2A on the function of the primary cilium, the SHH pathway's activity in patient and control cells was questioned using a smoothened agonist (SAG) to activate Hh signaling with and without inducing ciliogenesis (**Supplementary figure S**). The expression levels of GLI1 and PTCH1 (two Hh target genes) in response to Hh pathway activation were evaluated as a marker of Hh activity. Five controls were used—four of them showed a robust

significant induction of Hh target genes GLI1 and PTCH1 in response to SMO ligand stimulation in ciliogenesis conditions (0.1% FCS). By contrast, a strongly induced response to the SMO ligand was observed in patient cells, revealed by an increase of the Hh target genes' expression under the same conditions (**Figure 5**). These data indicated an alteration of the transduction of the Hh pathway in the patient's cells that was probably due to the primary cilia alteration caused by the presence of non-functinal PIK3C2A and therefore by the absence of PI3P at the base of the cilium. Finally cell proliferation assay showed that the proliferative capacity of PIK3C2A non-funtional cells was reduced compared to control cells (**Figure 6**).

DISCUSSION

Oculo Skeletal Dental syndrome (OCSKD MIM#618440) is an extremely rare autosomal recessive disease very recently defined by the association of cataracts, short stature with skeletal and craniofacial anomalies including dental features among other manifestations. OCSKD was recently demonstrated to be related to pathogenic variations in the *PIK3C2A* gene based to date on the description of 5 cases in 3 families (Tiosano et al., 2019) and completed by an additional family with 2 sibs (Galarreta et al., 2022). Table 1 compares the clinical features of this 8th case (5th family) with the 7 other cases. The common features are the short stature, the facial gestalt, the presence of cataracts, coarse facies , thick columella and alea nase and tip of the nose, thickened upper lip. The corneal aspect, the cataract as well as the broad nose was evocative of a metabolic storage disease but that has been previously ruled out. The functional consequences of the cataracts were moderate thus no surgery was proposed. The corneas were of cloudy apprerance however the intra ocular pressure was normal and no specific anomy was seen on slit lamp. As a novel assocaite feature we can note the occurrence of Hisrchprung disease as well as caudal developmental anomalies.

In this study we describe the identification of the 5th family and 8th patient with biallelic pathogenic variants in the *PIK3C2A* gene with OCSKD features (OCSKD MIM#618440). The first 3 families reported carried homozygous truncating variants including a large deletion encompassing 24 exons in *PIK3C2A* with no protein left. The 4th family was compound heterozygous for two nonsense *PIK3C2A* variants but no functional analysis was performed. Our patient is the first case presenting as a compound heterozygote status and for which funtional testing was performed proving pathogenicity as well as ciliary impact. Indeed, WES enabled us to identify two novel variants in *PIK3C2A* inherited from each parent. The first one is a nonsense variant in exon 2, (c.1024C>T, p.(Arg342*)), classified as a pathogenic variant (class 5). The second one is a missense in exon 24 (c.3695T>C, p.(Phe1232Ser)) classified as a variant of uncertain sifgnificance (class 3). Functional tests were used to demonstrate the impact of both variants and their effect on patient's cellular function. For the nonsense variant, as expected no expression of the allele harboring this variant could be observed. These findings confirmed that the only allele expressed is the one carrying the missense. Thus, any alteration of the PIK3C2A protein's function will be caused by this variant.

PIK3C2A is known to catalyze the phosphorylation of phosphatidylinositol (PI) into PI(3)P and the phosphorylation of PI(4)P into PI(3,4)P2. It was demonstrated that the distinct PI(3)P pool selectively produced by PIK3C2A and not by other class II PI3K enzymes (PIK3C2B and PIK3C2C), is concentrated at the pericentriolar recycling endocytic compartment (PRE) and promotes the activation of RAB11 and the RAB8-dependent pathway implicated in the cilium elongation and the translocation of SMO in the primary cilium, a process invovled in the activation of SHH signaling transduction cascade (Franco et al., 2014). Thus, as we were interested of the function of PIK3C2A at the base of the cilium, we decided to quantify PI(3)P for its implication in the ciliary elongation and function by ELISA and Immunofluorescence. This revealed a significant decreased level of PI(3)P throughout the cell and at the base of the cilium. These findings reveal that PIK3C2A has lost its kinase activity. This can be explained by the fact that the missense, located in the kinase domain, has a strong physicochemical impact (phenylalanine substituted by a serine) that impairs the kinase domain activity. This effect of the missense on the PIK3C2A protein confirms its pathogenicity allowing us to modify the classification to class 4 (probably pathogenic).

PIK3C2A-related disease is not the only disease associated with disturbances of PI metabolism as the list of these diseases is growing and includes Lowe's syndrome and Joubert syndrome (5-Phophatase) (Pendaries et al., 2003), *SHIP1*-related disorder and *SHIP2*-related type 2 diabetes (5-phosphatase) (Kerr et al., 2020), *PTEN*-related disorders (3-phosphatase) (Fruman et al., 2017), CLOVES syndrome (Kurek et al., 2012), Charcot-Marie-Tooth Disease Type 4B2 (McCray and Scherer, 2021) and others. Because of its diverse roles in intracellular processes and metabolism, *PIK3C2A* is associated with clinical findings affecting multiple organs including skeleton, eyes and brain.

For exemple congenital cataract is one of the main symptoms identified in 7 of the 8 reported patients (including ours). Interestingly, this early onset cataract was also oberved in the case of inositol polyphosphate-5-phosphatase K (*INPP5K*) deficiency and in the case of Lowe's syndrome (Bökenkamp and Ludwig, 2016; Osborn et al., 2017; Wiessner et al., 2017). It was demonstrated that *Pik3c2a*$^{-/-}$ zebrafish and mice develop lenticular anomalies and cataracts, and the cytokinetic abscission mediated by PI (3,4) P2 prevents cataract formation (Gulluni et al., 2021).

These findings suggests that PI metabolism and homeostasis is critical for lens development, and that the common phenotype is not only present between patients with *PIK3C2A*-related syndrome but also between patients with PI metabolism disorders. This phenotypic overlap may be due to the fact that some enzymes responsible for PI metabolism may have roles in the same cellular processes or at the level of the same organelles in the cell. For exemple both PIK3C2A and ORCL (the enzyme defective in Lowe's syndrome) are part of the same metabolic pathway as described by Kanehisa (Kanehisa et al., 2023) and are required for membrane trafficking and primary cilia formation (Franco et al., 2014; Mehta et al., 2014; Prosseda et al., 2017).

Primary cilia are evolutionary conserved microtubule-derived cellular organelles that protrude from the surface of many cell types and play important roles in sensory signaling and cell signaling pathways sush as the SHH pathway (Anvarian et al., 2019). This pathway is one of the most studied pathway in vertebrates and plays a crucial role in many physiological functions and cellular processes, including cell proliferation, growth, survival, limb development and left-right patterning during embryonic development (Carballo et al., 2018; Ja et al., 2006; Wadhwa et al., 2017). Abnormal phosphatidylinositol metabolism results in ciliary dysfunction (Bielas et al., 2009), loss of PIK3C2A have been already associated with defects in primary cilium elongation and SHH signaling alteration and ultimately impairment of embryonic development (Franco et al., 2014; Tiosano et al., 2019). Experiments performed on *Pik3c2a*$^{-/-}$ MEF (mouse embryonic fibroblasts) demonstrated that the lack of Pik3c2a alter the organization of the PRE (pericentriolar recycling endocytic) compartment around the ciliary base. The pool of PI3P in the PRE compartmement is significantly reduced preventing the activation of rab11/rab8 cascade required for cilia elongation and Smo translocation in the cilia (an early step for SHH activation). Pik3c2a deficient MEFs showed shorter cilia and a significant reduction in SHH-mediated target gene transcription *Gli1* and *Ptch1*. This SHH pathway impairment was also observed in *Pik3c2a* silenced NIH 3T3 cells, and it was rescued after a cell there transfection with wild type *Pik3c2a* (Franco et al., 2014). Accordincly to these resultats, our patient's fibroblasts with nonfunctional PIK3C2A showed a shorter cilia and an impaired SHH signaling pathway. No effect was detected on ciliogenesis as the number of ciliated cells was not reduced compared to controls. Contrasting with the results already reported concerning the reduction in SHH-mediated target gene transcription (*Gli1* and *Ptch1)*, we observed an increase in the expression of these two genes in our patient's cells.

Our results can be explained by the fact that we used SAG to activate the pathway. Indeed, SAG is a SMO Agonist that can activate SHH pathway independtly of SMO translocation in the cilium. Compared to controls, this important activation could be a compensatory response to the shorter cilia in patient cells. This correlation between SHH activation and the ciliary length was already reported by our group in another ciliopathy (Karam et al., 2023). Interestingly another PI3K gene (VPS15/PIK3R4) has been described as causing when defective a ciliopathy with shorter cilia but SHH pathway was not tested (Stoetzel et al., 2016). Further studies are needed to clarify this aspect of compensation between cilium length and SHH signaling pathway. Interestingly, the reduction of proliferation capacity of our patient's cells supports the result observed by Tiosano *et al* for the 5 patients and confirms the important role of PIK3C2A in more general cellular processes.

In summary, our study expands the spectrum of *PIK3C2A*-syndrome allowing to consolidate the phenotype and mutation spectrum of the disease. This phenotypic consistency has been maintained despite the fact that the molecular and protein profiles were different from those already reported. This article sheds light on the importance of the physiological role of PIK3C2A and PI metabolism in general. Once again we have highlighted the important role of PIK3C2A in the primary cilium elongation, by providing additional information on its role in the regulation of SHH signaling pathway and how *PIK3C2A* mutation causes alteration of these two aspects. Futher investigations are needed to extend our knowledge of PIK3C2A relation with the primary cilium in order to determine primary and secondary effects on it due to *PIK3C2A* defects.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL

Data generated or analyzed during this study are included in the published article and the corresponding supplementary data. The raw sequencing data generated in the course of this study are not publicly available due to the protocol and the corresponding consents used that did not include such information. All variants have been submitted to ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) and are accessible using the following accessions numbers:.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patient and her family for their participation. Whole exome sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the 'France Génomique' consortium (ANR-10-INBS-0009). We would like also to acknowledge the members of the diagnostic laboratories at the University Hospital in Strasbourg for technical assistance. The authors would like to thank the BiGEst-ICube Platform for assistance.

FUNDING

This work was supported by the following grants: Agence de la biomédecine "AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique 2022", CREGEMES (Centre Régional de Génétique Médicale de Strasbourg) and the following institutions: University of Strasbourg and Strasbourg University Hospital.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

TABLES AND FIGURES

Family	**Family I**		**Family II**		**Family III**	**Family IV**		**Family V**
Patient	**case 1**	**case 2**	**case 3**	**case 4**	**case 8**	**case 6**	**case 7**	
cDNA	c.[585T>G];[585T>G]		c.[(0+1_1-1)_(4007+1_4008-1)del];[(0+1_1-1)_(4007+1_4008-1)del]		c.[1640+1G>T];[1640+1G>T]	c.[1555C>T];[4381delC]		c.[1024C>T];[3695T>C]
Protein	p.[(Tyr195*)];[(Tyr195*)]		p[0];[0]		p.[(Asn483_Arg547delinsLys)];[(Asn483_Arg547delinsLys)]	p.[(Arg519*)];[(Arg1461Glufs*31)]		p.[(Arg342*)];[(Phe1232Ser)]
Consanguinity	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**
Age (years)	13	8	2	10	20	5	2	10
Sex								
Height	−3.3 SD	−2.3 SD	−2.5 SD	−4.8 SD	−2.5 SD	−2.5 SD	−1.3 SD	
Weight	−0.2 SD	−1.7 SD	−0.2 SD	−3.9 SD	−1.9 SD	−1.3 SD	−0.96 SD	
Head circumference	−0.25 SD	NR	+0.9 SD	−1.1 SD	+0.5 SD	−0.23 SD	0.43 SD	
Congenital cataract	+	+	+	+	+	+	-	+
Secondary glaucoma	+	+	+	+	+	+	-	
Hearing loss	+	-	-	+ (Bilateral moderate CHL)	+ (SNHL)	+ (bilateral SNHL)	-	+
Coarse facial appearance	+	+	+	+	+	+	+	+
Epicanthal folds	+	+			+	+	+	
Thick columella/alae nasi			+	+		+	+	
Scoliosis/skeletal abnormalities	+	+	+	+	+	+	+	
Broad thumbs	NR	NR	NR	NR	+	+	+	
Fifth finger clinodactyly	NR	NR	NR	NR	+	+	+	+
Teeth abnormalities	+	+	+	+	+	+	+	
Calcium abnormalities	Hypocalcemia, nephrocalcinosis	Nephrocalcinosis	-	Hypocalcemia	Newborn hypercalcemia, hypercalciuria, childhood nephrocalcinosis	-	-	
Hypothyroidism	-	-	-	+	+ (diagnosed at 20 yo)	-	-	
Developmental delay	+	+	Special education instruction	Special education instruction		+	+	
Brain Abnormalities	Stroke (right caudate nucleus)	Stroke (right corpus striatum)			White matter lesions	Restricted diffusion in periventricular white matter		
Genitourinary findings				Cryptorchidism, shawl scrotum	Right kidney agenesis	Cryptorchidism	Persistent proteinuria	
Reference	(Tiosano et al., 2019)		(Tiosano et al., 2019)		(Tiosano et al., 2019)	(Galarreta et al., 2022)		This study

Table 1. Mutational and clinical features of patients with *PIK3C2A* related syndrome. F: female, M: male, Y: yes, N: no, CHL: conductive hearing loss, SNHL: sensorineural hearing loss.

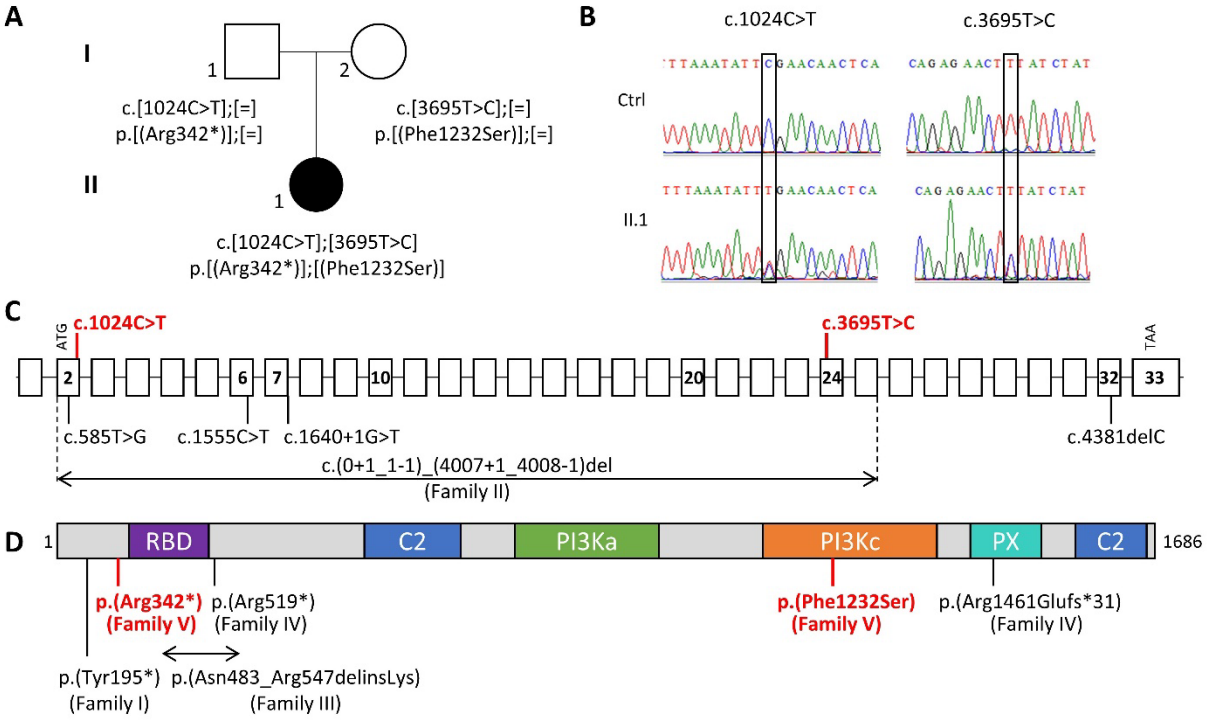


Figure 1. Identification of two variants in *PIK3C2A* for a family explored by WES.

(A) Pedigree of the family including one affected daughter (II.1). (B) Sanger sequencing and segregation. Sanger sequencing was performed on genomic DNA to confirm the variants and to assess the biallelic status of the variants. PIK3C2A gene and protein structure. (C) Schematic of PIK3C2A gene (NM_002645.4) and (D) protein (AC:O00443, ID:P3C2A_HUMAN) including known pathogenic variations already reported (black) and those from our family (red) (Galarreta et al., 2022; Tiosano et al., 2019).

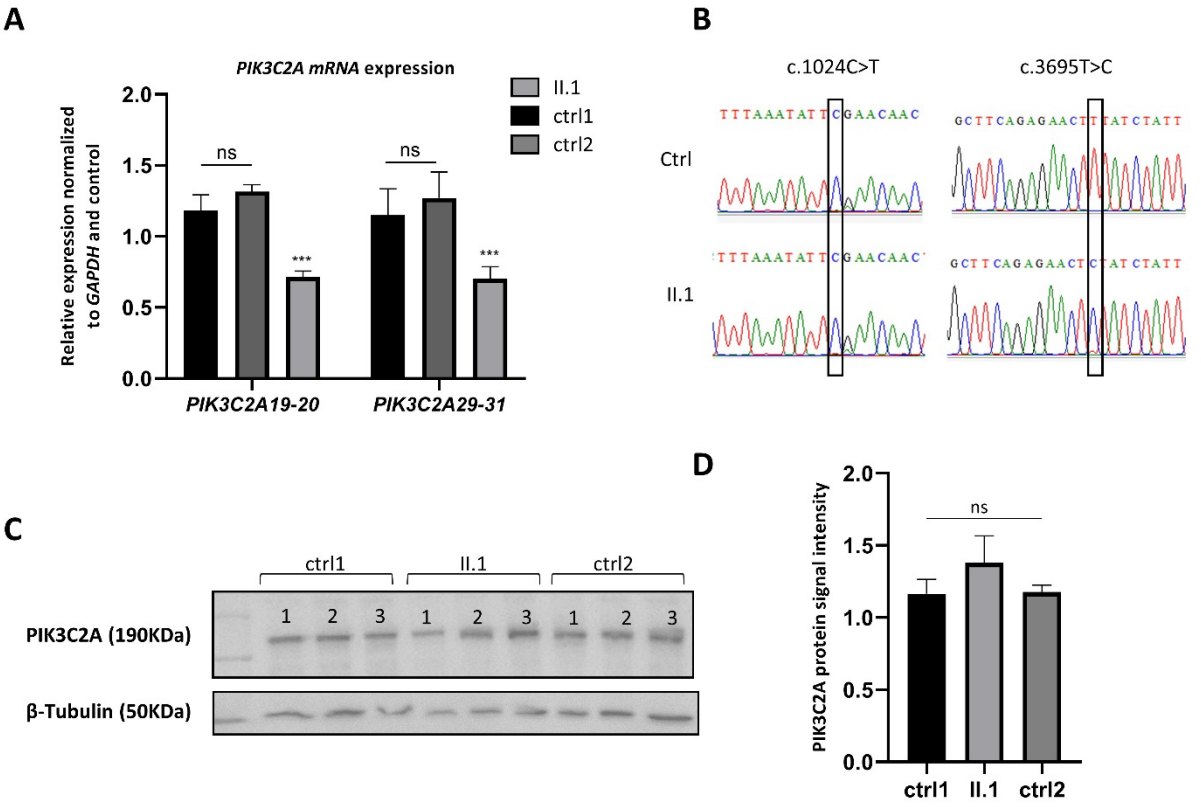


Figure 2. mRNA and protein levels of PIK3C2A in patient's skin fibroblasts.

(A) Quantitative real-time PCR was performed on RNA extracted from fibroblasts of the patient and two healthy unrelated control, using two pairs of primers amplifying between exons 19-20 and exons 29-31. PIK3C2A expression data were performed in triplicate. The normalized fold expression of the target genes was calculated using the comparative cycle threshold (Ct) method (2−ΔΔCt method) by normalizing target mRNA Ct to those a reference gene (*GAPDH*). Data are presented as relative expressions ± SEM (ANOVA, ns: non-significant, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$). (B) Sanger sequencing was performed on cDNA to confirm that the decreased level of PIK3C2A mRNA expression is due to the expression of only one allele (the allele carrying the nonsense variant (c.1024C>T, p.(Arg342*)) is not expressed). (C) PIK3C2A protein expression in whole cell lysates from skin-derived fibroblasts from the patient and two healthy controls was revealed by Western blot using an anti-PIK3C2A antibody and an anti-β-Tubulin antibody for the loading control. (D) Densitometry of western blot results was performed using ImageJ. Results are shown with the data combined from three separate experiments performed on biological triplicates. p-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA, ns: non-significant.

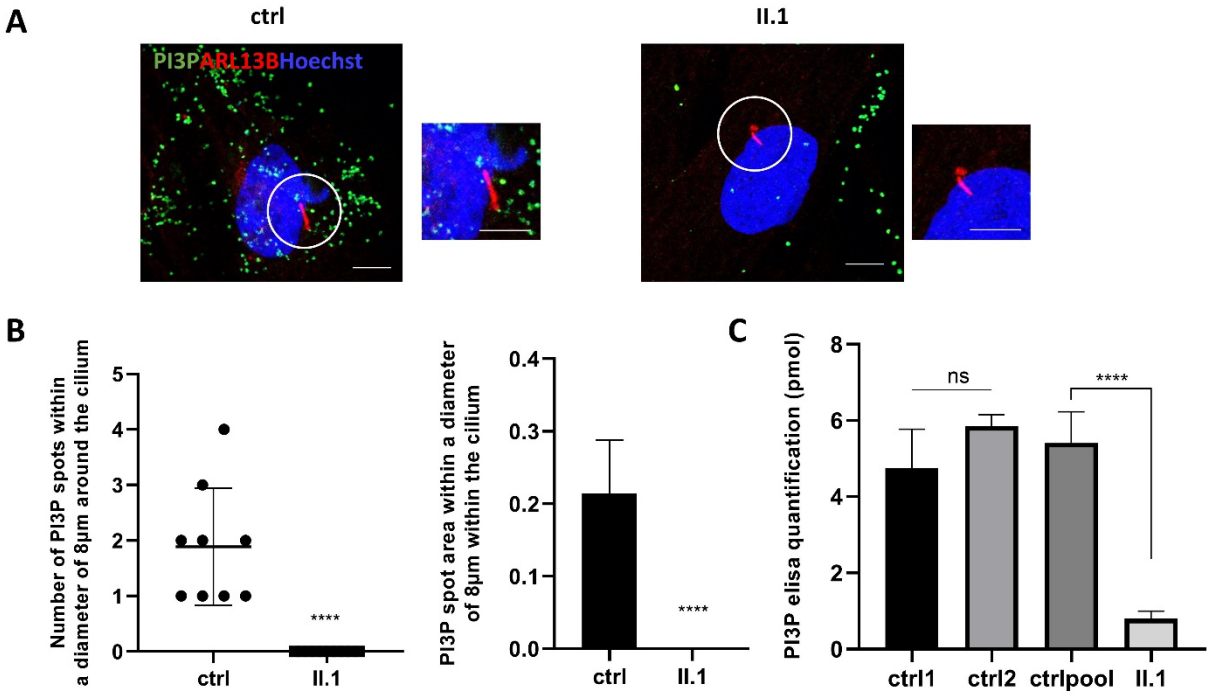


Figure 3. Non-functional PIK3C2A in patient skin fibroblasts. Altered PI metabolism in patient skin fibroblasts.

(A) Immunofluorescence analysis of PI3P localization at the base of the primary cilium. Primary cilia were labeled with an anti-ARL13B antibody (red), PI3P with anti-PI3P antibody (green), and the nucleus was visualized with Hoechst staining (blue). Images were taken with an inverted confocal fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). Scale bars 10 µm. (B) Quantification of the number of the green spots corresponding to PI3P within a diameter of 8µm around the cilia (left panel) and measurement of the surface area of each spot (right panel). The analysis was performed with Fiji using a developed macro to quantify these data using n=3 independent experiments and 10 cells per genotype for each experiment. p-values and significance were determined using t-test ****: $p < 0.0001$. (C) Quantification of PI3P was analysed by ELISA assay on phospholipid extracts from controls and patient's skin fibroblasts. The experiment was performed on biological samples in triplicate and PI3P extracts were deposited in quadruplicate on the ELISA plate n=3. p-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test). ns: non-significant, ****: $p < 0.0001$

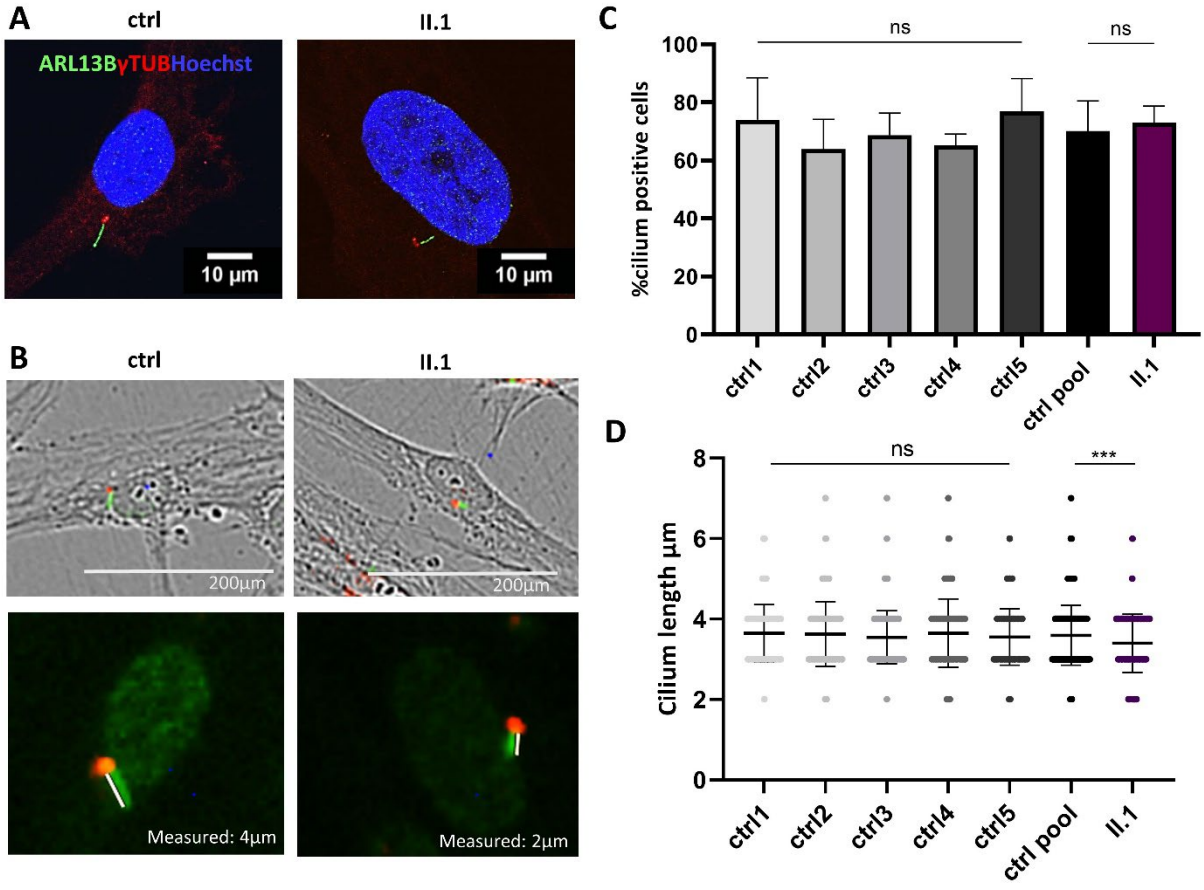


Figure 4. Functional assessment of PIK3C2A variations/Ciliary defects due PIK3C2A variants in patient skin fibroblasts.

(A) Representative images of ciliogenesis in skin-derived fibroblasts from controls and the patient. Primary cilia were labeled with an anti-ARL13B antibody (green), the basal body with anti-γ-Tubulin antibody (red) and the nucleus was visualized with Hoechst staining (blue). Images were taken with an inverted confocal fluorescence microscope (Zeiss LSM 800, 63× oil immersion objective). Scale bars 10 µm. (B) Ciliated cells were counted on serum-deprived (48 h) controls and the patient's skin-derived fibroblasts fixed for immunofluorescence and stained with an anti-ARL13B (green) antibody. Images were taken with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing a combined visualization of phase (cells) and fluorescence (cilia). (C) Percentage of patient's skin fibroblasts with cilia. The percentage of ciliated cells was calculated by dividing PC counts by cellular counts (n = 400 cells analyzed for each of the controls and the patient). *p*-values and significance were determined using ordinary one-way ANOVA, ns: non-significant (for II.1 nsp= 0,9936) , ****: $p < 0.0001$. (D) Quantification of primary cilia length (n = 400 cells analyzed for each of the controls and patient). *p*-values and significance were determined using the Kruskal–Wallis test ****: $p < 0.0001$ (for II.1 ****: $p = 0.0005$) . In (C,D), the measured number of cilia (n) represents pooled data from two separate experiments performed on biological triplicates of each sample in each experiment.

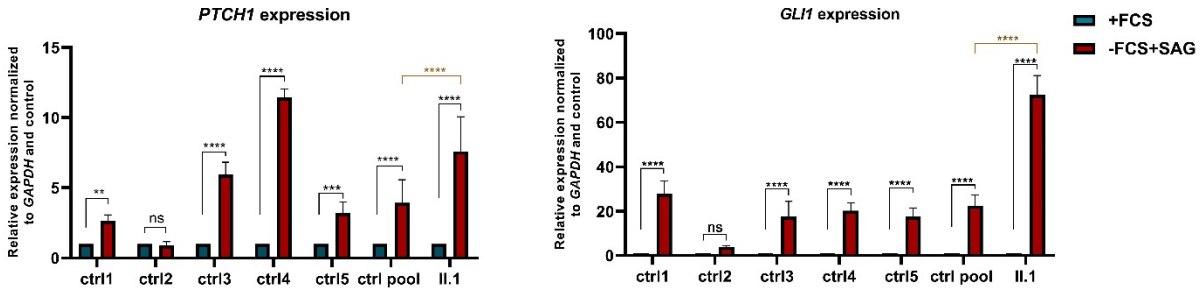


Figure 5. Hh-signaling transduction alteration in PIK3C2A patient skin fibroblasts.

Assessment of Hh-signal transduction by quantification of the expression levels of two Hh target genes (PTCH1 and GLI1) on Hh-stimulated cells (+SAG) from controls and the patient with (-FCS) and without (+FCS) inducing ciliogenesis. The expression of both genes was normally induced in controls except in control 2, whereas an important induction was found in the patient. The expression data performed with biological triplicates were normalized to the reference gene GAPDH mRNA expression data, and the values were presented as relative expression levels ± SEM. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ns: non-significant, **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$.

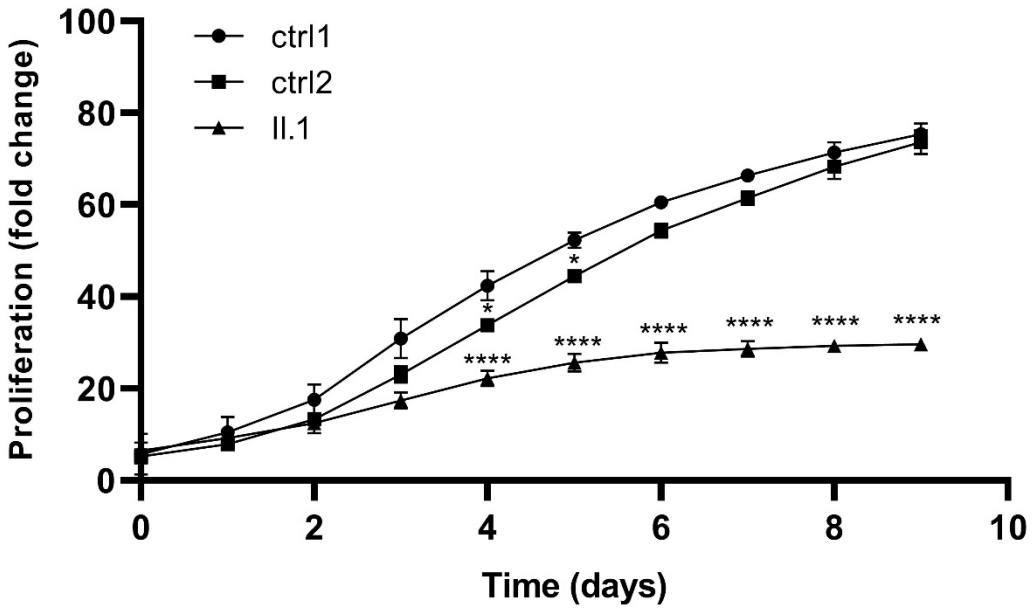


Figure 6. *PIK3C2A* variants causes delayed proliferation rates in the patient's skin-fibroblasts.

Proliferation curve of primary skin fibroblasts from the patient and two unrelated healthy controls. The analysis was performed with an Incucyte S3 Sartorius (20× objective), allowing to evaluate the proliferation of cells in 24-well plats in time (9 days). Values are reported as the mean ± SEM from 3 independent experiments. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (*: $p < 0.1$, ****: $p < 0.0001$).

REFERENCES

Altshuler, D.M., Durbin, R.M., Abecasis, G.R., Bentley, D.R., Chakravarti, A., Clark, A.G., Donnelly, P., Eichler, E.E., Flicek, P., Gabriel, S.B., Gibbs, R.A., Green, E.D., Hurles, M.E., Knoppers, B.M., Korbel, J.O., Lander, E.S., Lee, C., Lehrach, H., Mardis, E.R., Marth, G.T., McVean, G.A., Nickerson, D.A., Schmidt, J.P., Sherry, S.T., Wang, J., Wilson, R.K., Gibbs, R.A., Boerwinkle, E., Doddapaneni, H., Han, Y., Korchina, V., Kovar, C., Lee, S., Muzny, D., Reid, J.G., Zhu, Y.M., Wang, J., Chang, Y.Q., Feng, Q., Fang, X.D., Guo, X.S., Jian, M., Jiang, H., Jin, X., Lan, T.M., Li, G.Q., Li, J.X., Li, Y.R., Liu, S.M., Liu, X., Lu, Y., Ma, X.D., Tang, M.F., Wang, B., Wang, G.B., Wu, H.L., Wu, R.H., Xu, X., Yin, Y., Zhang, D.D., Zhang, W.W., Zhao, J., Zhao, M.R., Zheng, X.L., Lander, E.S., Altshuler, D.M., Gabriel, S.B., Gupta, N., Gharani, N., Toji, L.H., Gerry, N.P., Resch, A.M., Flicek, P., Barker, J., Clarke, L., Gil, L., Hunt, S.E., Kelman, G., Kulesha, E., Leinonen, R., McLaren, W.M., Radhakrishnan, R., Roa, A., Smirnov, D., Smith, R.E., Streeter, I., Thormann, A., Toneva, I., Vaughan, B., Zheng-Bradley, X., Bentley, D.R., Grocock, R., Humphray, S., James, T., Kingsbury, Z., Lehrach, H., Sudbrak, R., Albrecht, M.W., Amstislavskiy, V.S., Borodina, T.A., Lienhard, M., Mertes, F., Sultan, M., Timmermann, B., Yaspo, M.L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Fulton, L., Fulton, R., Sherry, S.T., Ananiev, V., Belaia, Z., Beloslyudtsev, D., Bouk, N., Chen, C., Church, D., Cohen, R., Cook, C., Garner, J., Hefferon, T., Kimelman, M., Liu, C.L., Lopez, J., Meric, P., O'Sullivan, C., Ostapchuk, Y., Phan, L., Ponomarov, S., Schneider, V., Shekhtman, E., Sirotkin, K., Slotta, D., Zhang, H., McVean, G.A., Durbin, R.M., Balasubramaniam, S., Burton, J., Danecek, P., Keane, T.M., Kolb-Kokocinski, A., McCarthy, S., Stalker, J., Quail, M., Schmidt, J.P., Davies, C.J., Gollub, J., Webster, T., Wong, B., Zhan, Y.P., Auton, A., Campbell, C.L., Kong, Y., Marcketta, A., Gibbs, R.A., Yu, F.L., Antunes, L., Bainbridge, M., Muzny, D., Sabo, A., Huang, Z.Y., Wang, J., Coin, L.J.M., Fang, L., Guo, X.S., Jin, X., Li, G.Q., Li, Q.B., Li, Y.R., Li, Z.Y., Lin, H.X., Liu, B.H., Luo, R.B., Shao, H.J., Xie, Y.L., Ye, C., Yu, C., Zhang, F., Zheng, H.C., Zhu, H.M., Alkan, C., Dal, E., Kahveci, F., Marth, G.T., Garrison, E.P., Kural, D., Lee, W.P., Leong, W.F., Stromberg, M., Ward, A.N., Wu, J.T., Zhang, M.Y., Daly, M.J., DePristo, M.A., Handsaker, R.E., Altshuler, D.M., Banks, E., Bhatia, G., del Angel, G., Gabriel, S.B., Genovese, G., Gupta, N., Li, H., Kashin, S., Lander, E.S., McCarroll, S.A., Nemesh, J.C., Poplin, R.E., Yoon, S.C., Lihm, J., Makarov, V., Clark, A.G., Gottipati, S., Keinan, A., Rodriguez-Flores, J.L., Korbel, J.O., Rausch, T., Fritz, M.H., Stuetz, A.M., Flicek, P., Beal, K., Clarke, L., Datta, A., Herrero, J., McLaren, W.M., Ritchie, G.R.S., Smith, R.E., Zerbino, D., Zheng-Bradley, X., Sabeti, P.C., Shlyakhter, I., Schaffner, S.F., Vitti, J., Cooper, D.N., Ball, E.V., Stenson, P.D., Bentley, D.R., Barnes, B., Bauer, M., Cheetham, R.K., Cox, A., Eberle, M., Humphray, S., Kahn, S., Murray, L., Peden, J., Shaw, R., Kenny, E.E., Batzer, M.A., Konkel, M.K., Walker, J.A., MacArthur, D.G., Lek, M., Sudbrak, R., Amstislavskiy, V.S., Herwig, R., Mardis, E.R., Ding, L., Koboldt, D.C., Larson, D., Ye, K., Gravel, S., Swaroop, A., Chew, E., Lappalainen, T., Erlich, Y., Gymrek, M., Willems, T.F., Simpson, J.T., Shriver, M.D., Rosenfeld, J.A., Bustamante, C.D., Montgomery, S.B., De La Vega, F.M., Byrnes, J.K., Carroll, A.W., DeGorter, M.K., Lacroute, P., Maples, B.K., Martin, A.R., Moreno-Estrada, A., Shringarpure, S.S., Zakharia, F., Halperin, E., Baran, Y., Lee, C., Cerveira, E., Hwang, J., Malhotra, A., Plewczynski, D., Radew, K., Romanovitch, M., Zhang, C.S., Hyland, F.C.L., Craig, D.W., Christoforides, A., Homer, N., Izatt, T., Kurdoglu, A.A., Sinari, S.A., Squire, K., Sherry, S.T., Xiao, C.L., Sebat, J., Antaki, D., Gujral, M., Noor, A., Ye, K., Burchard, E.G., Hernandez, R.D., Gignoux, C.R., Haussler, D., Katzman, S.J., Kent, W.J., Howie, B., Ruiz-Linares, A., Dermitzakis, E.T., Devine, S.E., Goncalo, R.A., Kang, H.M., Kidd, J.M., Blackwell, T., Caron, S., Chen, W., Emery, S., Fritsche, L., Fuchsberger, C., Jun, G., Li, B.S., Lyons, R., Scheller, C., Sidore, C., Song, S.Y., Sliwerska, E., Taliun, D., Tan, A., Welch, R., Wing, M.K., Zhan, X.W., Awadalla, P., Hodgkinson, A., Li, Y., Shi, X.H., Quitadamo, A., Lunter, G., McVean, G.A., Marchini, J.L., Myers, S., Churchhouse, C., Delaneau, O., Gupta-Hinch, A., Kretzschmar, W., Iqbal, Z., Mathieson, I., Menelaou, A., Rimmer, A., Xifara, D.K., Oleksyk, T.K., Fu, Y.X., Liu, X.M., Xiong, M.M., Jorde, L., Witherspoon, D., Xing, J.C., Eichler, E.E., Browning, B.L., Browning, S.R., Hormozdiari, F., Sudmant, P.H., Khurana, E., Durbin, R.M., Hurles, M.E., Tyler-Smith, C., Albers, C.A., Ayub, Q., Balasubramaniam, S., Chen, Y., Colonna, V., Danecek, P., Jostins, L., Keane, T.M., McCarthy, S., Walter, K., Xue, Y.L., Gerstein, M.B., Abyzov, A., Balasubramanian, S., Chen, J.M., Clarke, D., Fu, Y., Harmanci, A.O., Jin, M., Lee, D., Liu, J., Mu, X.J., Zhang, J., Zhang, Y., Li, Y.R., Luo, R.B., Zhu, H.M., Alkan, C., Dal, E., Kahveci, F., Marth, G.T., Garrison, E.P., Kural, D., Lee, W.P., Ward, A.N., Wu, J.T., Zhang, M.Y., McCarroll, S.A., Handsaker, R.E., Altshuler, D.M., Banks, E., Del Angel, G., Genovese, G., Hartl, C., Li, H., Kashin, S., Nemesh, J.C., Shakir, K., Yoon, S.C., Lihm, J., Makarov, V., Degenhardt, J., Korbel, J.O., Fritz, M.H., Meiers, S., Raeder, B., Rausch, T., Stuetz, A.M., Flicek, P., Casale, F.P., Clarke, L., Smith, R.E., Stegle, O., Zheng-Bradley, X., Bentley, D.R., Barnes, B., Cheetham, R.K., Eberle, M., Humphray, S., Kahn, S., Murray, L., Shaw, R., Lameijer, E.W., Batzer, M.A., Konkel, M.K.,

Walker, J.A., Ding, L., Hall, I., Ye, K., Lacroute, P., Lee, C., Cerveira, E., Malhotra, A., Hwang, J., Plewczynski, D., Radew, K., Romanovitch, M., Zhang, C.S., Craig, D.W., Homer, N., Church, D., Xiao, C.L., Sebat, J., Antaki, D., Bafna, V., Michaelson, J., Ye, K., Devine, S.E., Gardner, E.J., Abecasis, G.R., Kidd, J.M., Mills, R.E., Dayama, G., Emery, S., Jun, G., Shi, X.H., Quitadamo, A., Lunter, G., McVean, G.A., Chen, K., Fan, X., Chong, Z.C., Chen, T.H., Witherspoon, D., Xing, J.C., Eichler, E.E., Chaisson, M.J., Hormozdiari, F., Huddleston, J., Malig, M., Nelson, B.J., Sudmant, P.H., Parrish, N.F., Khurana, E., Hurles, M.E., Ben B. l. a. c. k. b. u. r. n. e., ., Lindsay, S.J., Ning, Z.M., Walter, K., Zhang, Y.J., Gerstein, M.B., Abyzov, A., Chen, J.M., Clarke, D., Lam, H., Mu, X.J., Sisu, C., Zhang, J., Zhang, Y., Gibbs, R.A., Yu, F.L., Bainbridge, M., Challis, D., Evani, U.S., Kovar, C., Lu, J., Muzny, D., Nagaswamy, U., Reid, J.G., Sabo, A., Yu, J., Guo, X.S., Li, W.S., Li, Y.R., Wu, R.H., Marth, G.T., Garrison, E.P., Leong, W.F., Ward, A.N., del Angel, G., DePristo, M.A., Gabriel, S.B., Gupta, N., Hartl, C., Poplin, R.E., Clark, A.G., Rodriguez-Flores, J.L., Flicek, P., Clarke, L., Smith, R.E., Zheng-Bradley, X., MacArthur, D.G., Mardis, E.R., Fulton, R., Koboldt, D.C., Gravel, S., Bustamante, C.D., Craig, D.W., Christoforides, A., Homer, N., Izatt, T., Sherry, S.T., Xiao, C.L., Dermitzakis, E.T., Abecasis, G.R., Kang, H.M., McVean, G.A., Gerstein, M.B., Balasubramanian, S., Habegger, L., Yu, H.Y., Flicek, P., Clarke, L., Cunningham, F., Dunham, I., Zerbino, D., Zheng-Bradley, X., Lage, K., Jespersen, J.B., Horn, H., Montgomery, S.B., DeGorter, M.K., Khurana, E., Tyler-Smith, C., Chen, Y., Colonna, V., Xue, Y.L., Gerstein, M.B., Balasubramanian, S., Fu, Y., Kim, D., Auton, A., Marcketta, A., Desalle, R., Narechania, A., Sayres, M.A.W., Garrison, E.P., Handsaker, R.E., Kashin, S., McCarroll, S.A., Rodriguez-Flores, J.L., Flicek, P., Clarke, L., Zheng-Bradley, X., Erlich, Y., Gymrek, M., Willems, T.F., Bustamante, C.D., Mendez, F.L., Poznik, G.D., Underhill, P.A., Lee, C., Cerveira, E., Malhotra, A., Romanovitch, M., Zhang, C.S., Abecasis, G.R., Coin, L., Shao, H.J., Mittelman, D., Tyler-Smith, C., Ayub, Q., Banerjee, R., Cerezo, M., Chen, Y., Fitzgerald, T., Louzada, S., Massaia, A., McCarthy, S., Ritchie, G.R., Xue, Y.L., Yang, F.T., Gibbs, R.A., Kovar, C., Kalra, D., Hale, W., Muzny, D., Reid, J.G., Wang, J., Dan, X., Guo, X.S., Li, G.Q., Li, Y.R., Ye, C., Zheng, X.L., Altshuler, D.M., Flicek, P., Clarke, L., Zheng-Bradley, X., Bentley, D.R., Cox, A., Humphray, S., Kahn, S., Sudbrak, R., Albrecht, M.W., Lienhard, M., Larson, D., Craig, D.W., Izatt, T., Kurdoglu, A.A., Sherry, S.T., Xiao, C.L., Haussler, D., Abecasis, G.R., McVean, G.A., Durbin, R.M., Balasubramaniam, S., Keane, T.M., McCarthy, S., Stalker, J., Chakravarti, A., Knoppers, B.M., Abecasis, G.R., Barnes, K.C., Beiswanger, C., Burchard, E.G., Bustamante, C.D., Cai, H.Y., Cao, H.Z., Durbin, R.M., Gerry, N.P., Gharani, N., Gibbs, R.A., Gignoux, C.R., Gravel, S., Henn, B., Jones, D., Jorde, L., Kaye, J.S., Keinan, A., Kent, A., Kerasidou, A., Li, Y.R., Mathias, R., McVean, G.A., Moreno-Estrada, A., Ossorio, P.N., Parker, M., Resch, A.M., Rotimi, C.N., Royal, C.D., Sandoval, K., Su, Y.Y., Sudbrak, R., Tian, Z.M., Tishkoff, S., Toji, L.H., Tyler-Smith, C., Via, M., Wang, Y.H., Yang, H.M., Yang, L., Zhu, J.Y., Bodmer, W., Bedoya, G., Ruiz-Linares, A., Cai, Z.M., Gao, Y., Chu, J.Y., Peltonen, L., Garcia-Montero, A., Orfao, A., Dutil, J., Martinez-Cruzado, J.C., Oleksyk, T.K., Barnes, K.C., Mathias, R.A., Hennis, A., Watson, H., McKenzie, C., Qadri, F., LaRocque, R., Sabeti, P.C., Zhu, J.Y., Deng, X.Y., Sabeti, P.C., Asogun, D., Folarin, O., Happi, C., Omoniwa, O., Stremlau, M., Tariyal, R., Jallow, M., Joof, F.S., Corrah, T., Rockett, K., Kwiatkowski, D., Kooner, J., Hien, T.T., Dunstan, S.J., Hang, N.T., Fonnie, R., Garry, R., Kanneh, L., Moses, L., Sabeti, P.C., Schieffelin, J., Grant, D.S., Gallo, C., Poletti, G., Saleheen, D., Rasheed, A., Brook, L.D., Felsenfeld, A., McEwen, J.E., Vaydylevich, Y., Green, E.D., Duncanson, A., Dunn, M., Schloss, J.A., Wang, J., Yang, H.M., Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Garrison, E.P., Kang, H.M., Korbel, J.O., Marchini, J.L., McCarthy, S., McVean, G.A., Abecasis, G.R., Consortium, G.P., 2015. A global reference for human genetic variation. Nature 526, 68-+. https://doi.org/10.1038/nature15393

Anvarian, Z., Mykytyn, K., Mukhopadhyay, S., Pedersen, L.B., Christensen, S.T., 2019. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. Nat Rev Nephrol 15, 199–219. https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9

Attree, O., Olivos, I.M., Okabe, I., Bailey, L.C., Nelson, D.L., Lewis, R.A., Mclnnes, R.R., Nussbaum, R.L., 1992. The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. Nature 358, 239–242. https://doi.org/10.1038/358239a0

Backenroth, D., Homsy, J., Murillo, L.R., Glessner, J., Lin, E., Brueckner, M., Lifton, R., Goldmuntz, E., Chung, W.K., Shen, Y., 2014. CANOES: detecting rare copy number variants from whole exome sequencing data. Nucleic Acids Res. 42, e97. https://doi.org/10.1093/nar/gku345

Bielas, S.L., Silhavy, J.L., Brancati, F., Kisseleva, M.V., Al-Gazali, L., Sztriha, L., Bayoumi, R.A., Zaki, M.S., Abdel-Aleem, A., Rosti, R.O., Kayserili, H., Swistun, D., Scott, L.C., Bertini, E., Boltshauser, E., Fazzi, E., Travaglini, L., Field, S.J., Gayral, S., Jacoby, M., Schurmans, S., Dallapiccola, B., Majerus, P.W., Valente, E.M., Gleeson, J.G., 2009. Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies. Nat Genet 41, 1032–1036. https://doi.org/10.1038/ng.423

Bökenkamp, A., Ludwig, M., 2016. The oculocerebrorenal syndrome of Lowe: an update. Pediatr Nephrol 31, 2201–2212. https://doi.org/10.1007/s00467-016-3343-3

Boukhalfa, A., Nascimbeni, A.C., Ramel, D., Dupont, N., Hirsch, E., Gayral, S., Laffargue, M., Codogno, P., Morel, E., 2020. PI3KC2α-dependent and VPS34-independent generation of PI3P controls primary cilium-mediated autophagy in response to shear stress. Nat Commun 11, 294. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14086-1

C, K., Ek, M., Ae, S., 2010. PI3KC2α, a class II PI3K, is required for dynamin-independent internalization pathways. Journal of cell science 123. https://doi.org/10.1242/jcs.071712

Carballo, G.B., Honorato, J.R., de Lopes, G.P.F., Spohr, T.C.L. de S. e, 2018. A highlight on Sonic hedgehog pathway. Cell Commun Signal 16, 1–15. https://doi.org/10.1186/s12964-018-0220-7

Coban-Akdemir, Z., White, J.J., Song, X., Jhangiani, S.N., Fatih, J.M., Gambin, T., Bayram, Y., Chinn, I.K., Karaca, E., Punetha, J., Poli, C., Boerwinkle, E., Shaw, C.A., Orange, J.S., Gibbs, R.A., Lappalainen, T., Lupski, J.R., Carvalho, C.M.B., 2018. Identifying Genes Whose Mutant Transcripts Cause Dominant Disease Traits by Potential Gain-of-Function Alleles. The American Journal of Human Genetics 103, 171–187. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.06.009

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., McKenna, A., Fennell, T.J., Kernytsky, A.M., Sivachenko, A.Y., Cibulskis, K., Gabriel, S.B., Altshuler, D., Daly, M.J., 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nature Genetics 43, 491–498. https://doi.org/10.1038/ng.806

Devereaux, K., Dall'Armi, C., Alcazar-Roman, A., Ogasawara, Y., Zhou, X., Wang, F., Yamamoto, A., Camilli, P.D., Paolo, G.D., 2013. Regulation of Mammalian Autophagy by Class II and III PI 3-Kinases through PI3P Synthesis. PLOS ONE 8, e76405. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076405

Falasca, M., Maffucci, T., 2012. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. Biochemical Journal 443, 587–601. https://doi.org/10.1042/BJ20120008

Franco, I., Gulluni, F., Campa, C.C., Costa, C., Margaria, J.P., Ciraolo, E., Martini, M., Monteyne, D., De Luca, E., Germena, G., Posor, Y., Maffucci, T., Marengo, S., Haucke, V., Falasca, M., Perez-Morga, D., Boletta, A., Merlo, G.R., Hirsch, E., 2014. PI3K Class II α Controls Spatially Restricted Endosomal PtdIns3P and Rab11 Activation to Promote Primary Cilium Function. Developmental Cell 28, 647–658. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.022

Fruman, D.A., Chiu, H., Hopkins, B.D., Bagrodia, S., Cantley, L.C., Abraham, R.T., 2017. The PI3K Pathway in Human Disease. Cell 170, 605–635. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029

Galarreta, C.I., Kennedy, C., Blair, D.R., Slavotinek, A., 2022. Expanding the phenotype of PIK3C2A related syndrome: Report of two siblings with novel features and genotype. American Journal of Medical Genetics Part A 188, 2724–2731. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62881

Geoffroy, V., Guignard, T., Kress, A., Gaillard, J.-B., Solli-Nowlan, T., Schalk, A., Gatinois, V., Dollfus, H., Scheidecker, S., Muller, J., 2021. AnnotSV and knotAnnotSV: a web server for human structural variations annotations, ranking and analysis. Nucleic Acids Research. https://doi.org/10.1093/nar/gkab402

Geoffroy, V., Pizot, C., Redin, C., Piton, A., Vasli, N., Stoetzel, C., Blavier, A., Laporte, J., Muller, J., 2015. VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants. PeerJ 3, e796. https://doi.org/10.7717/peerj.796

Gulluni, F., Prever, L., Li, H., Krafcikova, P., Corrado, I., Lo, W.-T., Margaria, J.P., Chen, A., De Santis, M.C., Cnudde, S.J., Fogerty, J., Yuan, A., Massarotti, A., Sarijalo, N.T., Vadas, O., Williams, R.L., Thelen, M., Powell, D.R., Schueler, M., Wiesener, M.S., Balla, T., Baris, H.N., Tiosano, D., McDermott, B.M., Perkins, B.D., Ghigo, A., Martini, M., Haucke, V., Boura, E., Merlo, G.R., Buchner, D.A., Hirsch, E., 2021. PI(3,4)P2-mediated cytokinetic abscission prevents early senescence and cataract formation. Science 374, eabk0410. https://doi.org/10.1126/science.abk0410

Ja, E., J, L., Lc, C., 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nature reviews. Genetics 7. https://doi.org/10.1038/nrg1879

Jean, S., Kiger, A.A., 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. J Cell Sci 127, 923–928. https://doi.org/10.1242/jcs.093773

Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., Ishiguro-Watanabe, M., 2023. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. Nucleic Acids Res 51, D587–D592. https://doi.org/10.1093/nar/gkac963

Karam, A., Delvallée, C., Estrada-Cuzcano, A., Geoffroy, V., Lamouche, J.-B., Leuvrey, A.-S., Nourisson, E., Tarabeux, J., Stoetzel, C., Scheidecker, S., Porter, L.F., Génin, E., Redon, R., Sandron, F., Boland, A., Deleuze, J.-F., Le May, N., Dollfus, H., Muller, J., 2023. WGS Revealed Novel BBS5 Pathogenic Variants,

Missed by WES, Causing Ciliary Structure and Function Defects. International Journal of Molecular Sciences 24, 8729. https://doi.org/10.3390/ijms24108729

Keppler-Noreuil, K.M., Rios, J.J., Parker, V.E.R., Semple, R.K., Lindhurst, M.J., Sapp, J.C., Alomari, A., Ezaki, M., Dobyns, W., Biesecker, L.G., 2015. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. Am J Med Genet A 167A, 287–295. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36836

Kerr, W.G., Pedicone, C., Dormann, S., Pacherille, A., Chisholm, J.D., 2020. Small molecule targeting of SHIP1 and SHIP2. Biochemical Society Transactions 48, 291–300. https://doi.org/10.1042/BST20190775

Kurek, K.C., Luks, V.L., Ayturk, U.M., Alomari, A.I., Fishman, S.J., Spencer, S.A., Mulliken, J.B., Bowen, M.E., Yamamoto, G.L., Kozakewich, H.P.W., Warman, M.L., 2012. Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. Am J Hum Genet 90, 1108–1115. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.05.006

Leahey, A.-M., Charnas, L.R., Nussbaum, R.L., 1993. Nonsense mutations in the OCRL-1 gene in patients with the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. Human Molecular Genetics 2, 461–463. https://doi.org/10.1093/hmg/2.4.461

Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E.V., Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B., Tukiainen, T., Birnbaum, D.P., Kosmicki, J.A., Duncan, L.E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., Cooper, D.N., Deflaux, N., DePristo, M., Do, R., Flannick, J., Fromer, M., Gauthier, L., Goldstein, J., Gupta, N., Howrigan, D., Kiezun, A., Kurki, M.I., Moonshine, A.L., Natarajan, P., Orozco, L., Peloso, G.M., Poplin, R., Rivas, M.A., Ruano-Rubio, V., Rose, S.A., Ruderfer, D.M., Shakir, K., Stenson, P.D., Stevens, C., Thomas, B.P., Tiao, G., Tusie-Luna, M.T., Weisburd, B., Won, H.-H., Yu, D., Altshuler, D.M., Ardissino, D., Boehnke, M., Danesh, J., Donnelly, S., Elosua, R., Florez, J.C., Gabriel, S.B., Getz, G., Glatt, S.J., Hultman, C.M., Kathiresan, S., Laakso, M., McCarroll, S., McCarthy, M.I., McGovern, D., McPherson, R., Neale, B.M., Palotie, A., Purcell, S.M., Saleheen, D., Scharf, J.M., Sklar, P., Sullivan, P.F., Tuomilehto, J., Tsuang, M.T., Watkins, H.C., Wilson, J.G., Daly, M.J., MacArthur, D.G., Exome Aggregation Consortium, 2016. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature 536, 285–291. https://doi.org/10.1038/nature19057

Letunic, I., Khedkar, S., Bork, P., 2021. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. Nucleic Acids Res 49, D458–D460. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937

Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. Bioinformatics 25, 1754–1760. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324

Luo, N., West, C.C., Murga-Zamalloa, C.A., Sun, L., Anderson, R.M., Wells, C.D., Weinreb, R.N., Travers, J.B., Khanna, H., Sun, Y., 2012. OCRL localizes to the primary cilium: a new role for cilia in Lowe syndrome. Hum Mol Genet 21, 3333–3344. https://doi.org/10.1093/hmg/dds163

Martin, F.J., Amode, M.R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A.G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S.K., Bignell, A., Boddu, S., Branco Lins, P.R., Brooks, L., Ramaraju, S.B., Charkhchi, M., Cockburn, A., Da Rin Fiorretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., Donaldson, S., El Houdaigui, B., El Naboulsi, T., Fatima, R., Giron, C.G., Genez, T., Ghattaoraya, G.S., Martinez, J.G., Guijarro, C., Hardy, M., Hollis, Z., Hourlier, T., Hunt, T., Kay, M., Kaykala, V., Le, T., Lemos, D., Marques-Coelho, D., Marugán, J.C., Merino, G.A., Mirabueno, L.P., Mushtaq, A., Hossain, S.N., Ogeh, D.N., Sakthivel, M.P., Parker, A., Perry, M., Piližota, I., Prosovetskaia, I., Pérez-Silva, J.G., Salam, A.I.A., Saraiva-Agostinho, N., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sinha, S., Sipos, B., Stark, W., Steed, E., Sukumaran, R., Sumathipala, D., Suner, M.-M., Surapaneni, L., Sutinen, K., Szpak, M., Tricomi, F.F., Urbina-Gómez, D., Veidenberg, A., Walsh, T.A., Walts, B., Wass, E., Willhoft, N., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Chakiachvili, M., Flint, B., Giorgetti, S., Haggerty, L., Ilsley, G.R., Loveland, J.E., Moore, B., Mudge, J.M., Tate, J., Thybert, D., Trevanion, S.J., Winterbottom, A., Frankish, A., Hunt, S.E., Ruffier, M., Cunningham, F., Dyer, S., Finn, R.D., Howe, K.L., Harrison, P.W., Yates, A.D., Flicek, P., 2023. Ensembl 2023. Nucleic Acids Res 51, D933–D941. https://doi.org/10.1093/nar/gkac958

Martinez-Lopez, A., Blasco-Morente, G., Perez-Lopez, I., Herrera-Garcia, J. d., Luque-Valenzuela, M., Sanchez-Cano, D., Lopez-Gutierrez, J. c., Ruiz-Villaverde, R., Tercedor-Sanchez, J., 2017. CLOVES syndrome: review of a PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). Clinical Genetics 91, 14–21. https://doi.org/10.1111/cge.12832

McCray, B.A., Scherer, S.S., 2021. Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease: from Common Pathogenic Mechanisms to Emerging Treatment Opportunities. Neurotherapeutics 18, 2269–2285. https://doi.org/10.1007/s13311-021-01099-2

Mehta, Z.B., Pietka, G., Lowe, M., 2014. The Cellular and Physiological Functions of the Lowe Syndrome Protein OCRL1. Traffic 15, 471–487. https://doi.org/10.1111/tra.12160

Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I.-I., Badoiu, S.C., Stefani, C., Greabu, M., 2021. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. International Journal of Molecular Sciences 22, 173. https://doi.org/10.3390/ijms22010173

Mishra, R., Patel, H., Alanazi, S., Kilroy, M.K., Garrett, J.T., 2021. PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects. Int J Mol Sci 22, 3464. https://doi.org/10.3390/ijms22073464

Mountford, J.K., Petitjean, C., Putra, H.W.K., McCafferty, J.A., Setiabakti, N.M., Lee, H., Tønnesen, L.L., McFadyen, J.D., Schoenwaelder, S.M., Eckly, A., Gachet, C., Ellis, S., Voss, A.K., Dickins, R.A., Hamilton, J.R., Jackson, S.P., 2015. The class II PI 3-kinase, PI3KC2α, links platelet internal membrane structure to shear-dependent adhesive function. Nat Commun 6, 6535. https://doi.org/10.1038/ncomms7535

Nassar, L.R., Barber, G.P., Benet-Pagès, A., Casper, J., Clawson, H., Diekhans, M., Fischer, C., Gonzalez, J.N., Hinrichs, A.S., Lee, B.T., Lee, C.M., Muthuraman, P., Nguy, B., Pereira, T., Nejad, P., Perez, G., Raney, B.J., Schmelter, D., Speir, M.L., Wick, B.D., Zweig, A.S., Haussler, D., Kuhn, R.M., Haeussler, M., Kent, W.J., 2023. The UCSC Genome Browser database: 2023 update. Nucleic Acids Res 51, D1188–D1195. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1072

Osborn, D.P.S., Pond, H.L., Mazaheri, N., Dejardin, J., Munn, C.J., Mushref, K., Cauley, E.S., Moroni, I., Pasanisi, M.B., Sellars, E.A., Hill, R.S., Partlow, J.N., Willaert, R.K., Bharj, J., Malamiri, R.A., Galehdari, H., Shariati, G., Maroofian, R., Mora, M., Swan, L.E., Voit, T., Conti, F.J., Jamshidi, Y., Manzini, M.C., 2017. Mutations in INPP5K Cause a Form of Congenital Muscular Dystrophy Overlapping Marinesco-Sjögren Syndrome and Dystroglycanopathy. Am J Hum Genet 100, 537–545. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.019

Pendaries, C., Tronchère, H., Plantavid, M., Payrastre, B., 2003. Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. FEBS Lett 546, 25–31. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00437-x

Prosseda, P.P., Luo, N., Wang, B., Alvarado, J.A., Hu, Y., Sun, Y., 2017. Loss of OCRL increases ciliary PI(4,5)P2 in Lowe oculocerebrorenal syndrome. J Cell Sci 130, 3447–3454. https://doi.org/10.1242/jcs.200857

Radha Rama Devi, A., Naushad, S.M., Lingappa, L., 2020. Clinical and Molecular Diagnosis of Joubert Syndrome and Related Disorders. Pediatric Neurology 106, 43–49. https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.01.012

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., ; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine 17, 405–423. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Sayers, E.W., Bolton, E.E., Brister, J.R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D.C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., Wang, J., Williams, R., Trawick, B.W., Pruitt, K.D., Sherry, S.T., 2022. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Res 50, D20–D26. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112

Scheidecker, S., Etard, C., Pierce, N.W., Geoffroy, V., Schaefer, E., Muller, J., Chennen, K., Flori, E., Pelletier, V., Poch, O., Marion, V., Stoetzel, C., Strähle, U., Nachury, M.V., Dollfus, H., 2014. Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). J Med Genet 51, 132–136. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101785

Stoetzel, C., Bär, S., De Craene, J.-O., Scheidecker, S., Etard, C., Chicher, J., Reck, J.R., Perrault, I., Geoffroy, V., Chennen, K., Strähle, U., Hammann, P., Friant, S., Dollfus, H., 2016. A mutation in VPS15 (PIK3R4) causes a ciliopathy and affects IFT20 release from the cis-Golgi. Nat Commun 7, 13586. https://doi.org/10.1038/ncomms13586

Thorvaldsdottir, H., Robinson, J.T., Mesirov, J.P., 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Briefings in Bioinformatics 14, 178–192. https://doi.org/10.1093/bib/bbs017

Tiosano, D., Baris, H.N., Chen, A., Hitzert, M.M., Schueler, M., Gulluni, F., Wiesener, A., Bergua, A., Mory, A., Copeland, B., Gleeson, J.G., Rump, P., Meer, H. van, Sival, D.A., Haucke, V., Kriwinsky, J., Knaup, K.X., Reis, A., Hauer, N.N., Hirsch, E., Roepman, R., Pfundt, R., Thiel, C.T., Wiesener, M.S., Aslanyan, M.G., Buchner, D.A., 2019. Mutations in PIK3C2A cause syndromic short stature, skeletal abnormalities, and cataracts associated with ciliary dysfunction. PLOS Genetics 15, e1008088. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008088

Travaglini, L., Brancati, F., Silhavy, J., Iannicelli, M., Nickerson, E., Elkhartoufi, N., Scott, E., Spencer, E., Gabriel, S., Thomas, S., Ben-Zeev, B., Bertini, E., Boltshauser, E., Chaouch, M., Roberta Cilio, M., de Jong, M.M., Kayserili, H., Ogur, G., Poretti, A., Signorini, S., Uziel, G., Zaki, M.S., Johnson, C., Attié-Bitach, T., Gleeson, J.G., Valente, E.M., 2013. Phenotypic spectrum and prevalence of INPP5E mutations in Joubert

Syndrome and related disorders. Eur J Hum Genet 21, 1074–1078. https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.305

Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., Bilanges, B., 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 329–341. https://doi.org/10.1038/nrm2882

Venot, Q., Blanc, T., Rabia, S.H., Berteloot, L., Ladraa, S., Duong, J.-P., Blanc, E., Johnson, S.C., Hoguin, C., Boccara, O., Sarnacki, S., Boddaert, N., Pannier, S., Martinez, F., Magassa, S., Yamaguchi, J., Knebelmann, B., Merville, P., Grenier, N., Joly, D., Cormier-Daire, V., Michot, C., Bole-Feysot, C., Picard, A., Soupre, V., Lyonnet, S., Sadoine, J., Slimani, L., Chaussain, C., Laroche-Raynaud, C., Guibaud, L., Broissand, C., Amiel, J., Legendre, C., Terzi, F., Canaud, G., 2018. Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. Nature 558, 540–546. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0217-9

Wadhwa, B., Makhdoomi, U., Vishwakarma, R., Malik, F., 2017. Protein kinase B: emerging mechanisms of isoform-specific regulation of cellular signaling in cancer. Anticancer Drugs 28, 569–580. https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000496

Wiessner, M., Roos, A., Munn, C.J., Viswanathan, R., Whyte, T., Cox, D., Schoser, B., Sewry, C., Roper, H., Phadke, R., Marini Bettolo, C., Barresi, R., Charlton, R., Bönnemann, C.G., Abath Neto, O., Reed, U.C., Zanoteli, E., Araújo Martins Moreno, C., Ertl-Wagner, B., Stucka, R., De Goede, C., Borges da Silva, T., Hathazi, D., Dell'Aica, M., Zahedi, R.P., Thiele, S., Müller, J., Kingston, H., Müller, S., Curtis, E., Walter, M.C., Strom, T.M., Straub, V., Bushby, K., Muntoni, F., Swan, L.E., Lochmüller, H., Senderek, J., 2017. Mutations in INPP5K, Encoding a Phosphoinositide 5-Phosphatase, Cause Congenital Muscular Dystrophy with Cataracts and Mild Cognitive Impairment. Am J Hum Genet 100, 523–536. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.024

Yoshioka, K., Yoshida, K., Cui, H., Wakayama, T., Takuwa, N., Okamoto, Y., Du, W., Qi, X., Asanuma, K., Sugihara, K., Aki, S., Miyazawa, H., Biswas, K., Nagakura, C., Ueno, M., Iseki, S., Schwartz, R.J., Okamoto, H., Sasaki, T., Matsui, O., Asano, M., Adams, R.H., Takakura, N., Takuwa, Y., 2012. Endothelial PI3K-C2α, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. Nat Med 18, 1560–1569. https://doi.org/10.1038/nm.2928

SUPPLEMENTARY DATA

Multiple sequence alignment

Multiple protein sequences alignment of human PIK3C2A together with metazoan PIK3C2A and PIK3C2B. Proteins were extracted from the eggNOG database (v 4.5.1) (Huerta-Cepas et al., 2015). The complete liste is: 6239.F39B1.1, 400682.PAC_15717107, 45351.EDO45977, 7668.SPU_025524-tr, 7739.XP_002590193.1, 6669.EFX89515, 7165.AGAP011036-PA, 7227.FBpp0075818, 7460.GB48994-PA, 7955.ENSDARP00000110942, 8090.ENSORLP00000013515, 9031.ENSGALP00000000882, 9612.ENSCAFP00000014201, 10090.ENSMUSP00000076911, 9601.ENSPPYP00000000347, 9606.ENSP00000356155, 7955.ENSDARP00000120821, 8090.ENSORLP00000001586, 9031.ENSGALP00000009863, 9612.ENSCAFP00000036143, 10090.ENSMUSP00000126092, 9601.ENSPPYP00000003968, 9606.ENSP00000265970. Sequences were aligned using Clustal O as a guide (Sievers and Higgins, 2018) and then manually refined. Species were ordered according to the NCBI taxonomy thanks to the phyloT online tool (https://phylot.biobyte.de/). Alignment is displayed thanks to Jalview (Waterhouse et al., 2009). The missense is highlighted below the alignment with a "*". The Phe1232Ser is a highly conserved aminoacid position in the kinase domain of the protein (Supplementary Figure S1A).

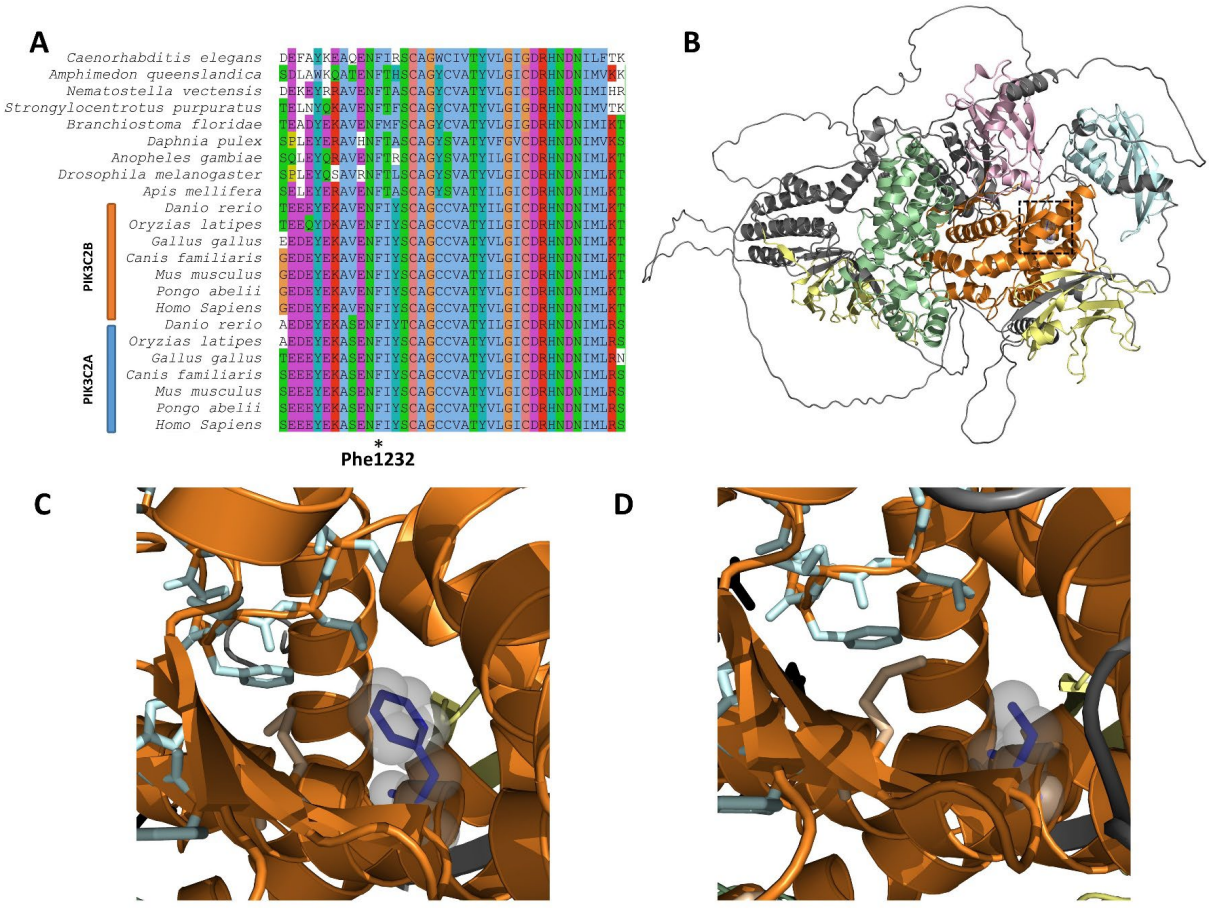
3D modelling

PIK3C2A (AC:O00443) structural model (AF-O00443-F1) has been predicted using the AlphaFold software (Jumper et al., 2021). The PI3Ka and PI3Kc domains have very high (pLDDT > 90) confidence. Important functional residues within the PI3Ka and PI3Kc domains have been annotated based on the following scheme: the ATP binding residues (1111, 1114-1116, 1118, 1129, 1131, 1134, 1165, 1176-1180, 1185, 1188, 1252, 1254, 1264, 1265), the catalytic loop residues (1244-1252) and the activation loop residues (1265-1292) (Walker et al., 2000, 1999).

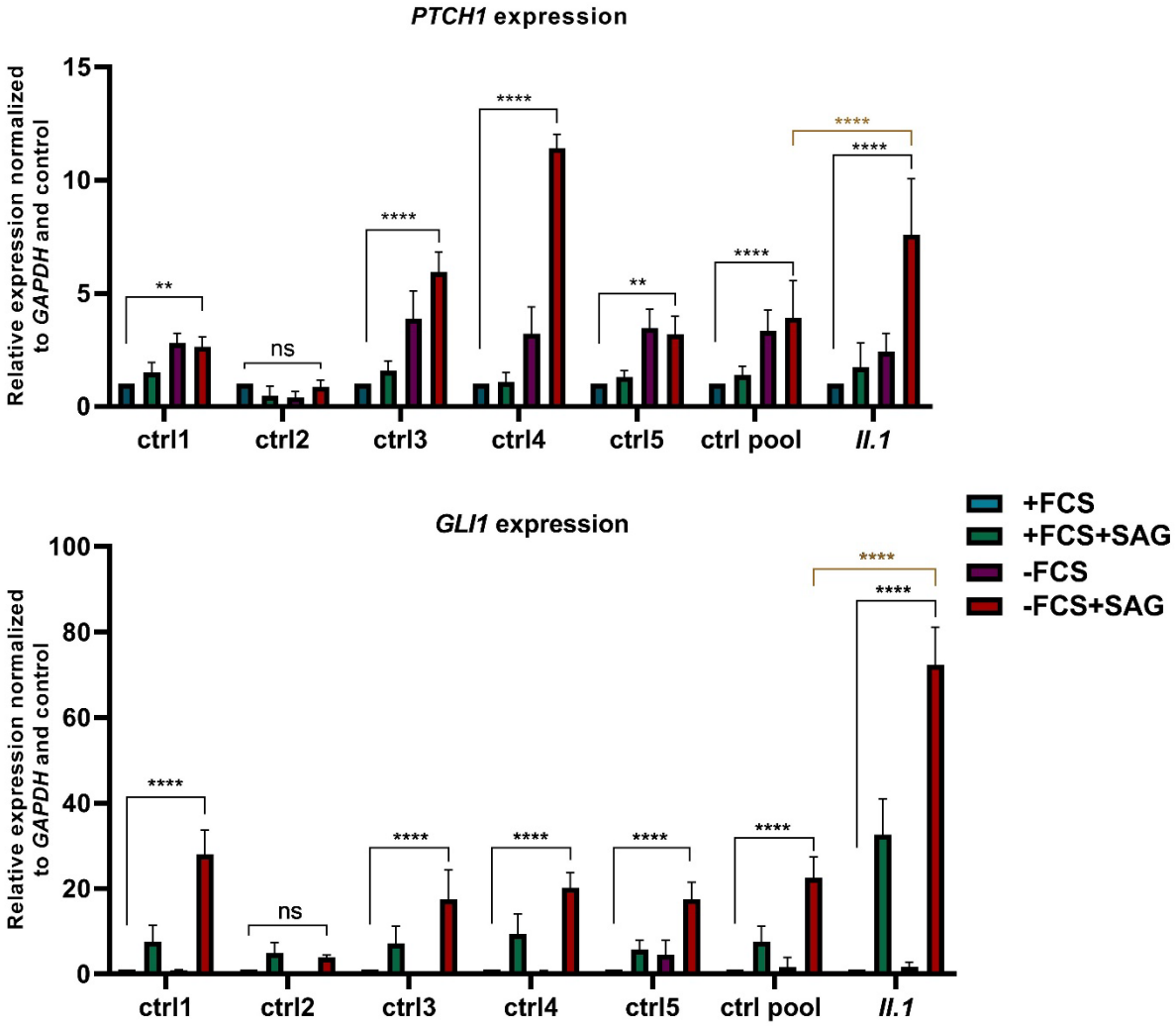
In order to observe the effect of the Phe1232Ser missense variant, a 3D model was generated using AlphaFold2. As a control, the wildtype 3D model of PIK3C2 has been regenerated. A singularity container was setup (Singularity v3.6.4) containing all necessary elements to run AlphaFold (v2.1.0). All databases provided by the authors have been download and the small bfd database was used to reduce the huge amount of data storage regrouping part of the 2.5 billions of protein sequences. Analysis were made on a 1.47 To RAM with 64 CPU on a GNU/Linux 4.15.0-197-generic x86_64 server with Ubuntu 18.04.3. Due to issues in the computational steps, and according to the developers' advices, the last relaxation step was skipped. All other parameters were set to default.

Bioinformatics prediction

To assess the effect of Phe1232Ser missense several bioinformatics predictions have been applied. All these methods have proposed a possible deleterious effect of such a change including CADD (v1.6) with a Phred score of 32 (Raw score: 4.399001)(Rentzsch et al., 2019), REVEL (v2021-05-03) and a score of 0.975 (Ioannidis et al., 2016), PolyPhen2 probably damaging for both prediction models (HumDiv:1.0 and HumVar:0.99) (Adzhubei et al., 2010), SIFT (v6.2.0): deleterious (score: 0.00, median: 3.11) (Kumar et al., 2009).



Supplementary Figure S1. Multiple sequence alignment and 3D modelling of the missense variant. (A) Multiple sequence alignments of PIK3C2A and PIK3C2B proteins from different metazoan species showing the strict conservation of the amino acid at position 1232. (B) Alphafold structural model of the PIK3C2B protein (AC:O00443). Located in the PI3Kc domain position 1232 is highlighted using a black dashed rectangle. PIK3C2B protein domains are described as following: RBD (lightpink), C2 domains (paleyellow), PI3Ka (palegreen), PI3Kc (orange) and PX (palecyan) and the Phe1232. (C) Zoom to the position Phe1232 within the PI3Kc domain and (D) to the substituted Ser on the generated model. Important functional residues have been highlighted (sticks) ATP binding residues (wheat), catalytic loop residues (black) and activation loop residues (palecyan).



Supplementary Figure S2. SHH-signaling transduction alteration in PIK3C2A patient's skin fibroblasts.

Assessment of SHH-signal transduction by quantification of the expression levels of two SHH target genes (*PTCH1* and *GLI1*) from controls and the patient in four different conditions, with and without inducing ciliogenesis (+/- FCS) and SHH activation (+/- SAG). The expression of both genes was normally induced in controls except in control 2, whereas an important induction was found in the patient. The expression data performed with biological triplicates were normalized to the reference gene *GAPDH* mRNA expression data, and the values were presented as relative expression levels ± SEM. *p*-values and significance were determined using a two-way ANOVA test (Tukey's multiple comparison test). ns: non-significant, **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$.

Localisation/effect	Total	Homozygous	Heterozygous
5'UTR	941	315	626
3'UTR	1368	471	897
Upstream	796	317	479
Downstream	608	269	339
Frameshift	272	101	171
Start loss	40	10	30
Stop gain	152	24	128
Stop loss	19	6	13
In-frame	396	119	277
Intron	26672	9311	17361
Missense	12470	3556	8914
Splice site	129	30	99
Synonymous	12383	3950	8433
Intergenic	4075	1722	2353

Supplementary Table S1. Distribution of the 60672 SNV/indel identified using the WES in the index case.

Name	Type	Date of puncture	Sex	Passage numbers
Ctrl1	Skin fibroblasts	09/02/2017 (39 years)	M	P8
Ctrl2	Skin fibroblasts	12/04/2007 (53 years)	F	P14
Ctrl3	Skin fibroblasts	12/04/2007 (30 years)	F	P11
Ctrl4	Skin fibroblasts	05/04/2016 (37 years)	F	P9
Ctrl5	Skin fibroblasts	21/04/2010 (68 years)	F	P6
II.1	Skin fibroblasts	10/05/2022 (8 years)	F	P4

Supplementary Table S2. List of controls and the patient with some related information.

Application	Gene name (HGVS)	Exon	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Size
gDNA	*PIK3C2A*		AGCCTAAGGTGGATAATGTGGA	GGCAGGAGAAGGGTGTGAA	426bp
			TCCCAGTTTGTATGCTATTGAGA	TATGTTCAAATGGAGCCGCG	409bp
cDNA	*PIK3C2A*	2 to 3	TCAAAAGTCAGCAATCTACAGGT	TGGCAAACTACTGGTCCCAT	345bp
		22 to 24-25	TTTCAAATGTCTCTCAACTGGC	CCGATCCCTTTTGAAGCTG	347bp
		19 to 20	CCAGACAGGTTGTTCTCCAA	AGAACTGAAGAAGGAACACGAC	134bp
		29 to 31	CGGATGTAGCAGAGTGTGATCT	TGGATAATTTCACAGCTCCTCC	144bp
	GLI1	7 to 9	CTGCAGCCAGGAATTTGACT	CGAGGCGTGAGTATGACTTCC	224bp
	PTCH1	2-3 to 3	GTGGAAGTTGGAGGACGAGT	AGTCCAGGTGTTGTAGGAGC	154bp
	GAPDH	4-5 to 6	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197bp

Supplementary Table S3. List of primers used in this study.

Application	Antibody	Species	Dilution	Reference
WB	Anti-PIK3C2A	Rabbit	1/1500	22028-1-AP Proteintech
	Anti-βTUBULIN	Rabbit	1/2500	2128 Cell signaling
	Anti-mouse (HRP linked) secondary	Horse	1/2000	7076 Cell signaling
	Anti-rabbit (HRP linked) secondary	Donkey	1/2000	7074 Cell signaling
IF	Anti-ARL13B	Mouse	1/500	Sc-515784, Santa Cruz biotechnology
	Anti-ARL13B	Rabbit	1/200	17711-1-AP, Proteintech
	Anti-Tubulin	Rabbit	1/500	PA5-34815, Invitrogen
	Anti-PI3P	Mouse	1/200	Z-P003, Echelon Biosciences Inc
	Anti-mouse (Alexa Fluor™ 488) secondary	Goat	1/500	A11001, Invitrogen
	Anti-rabbit (Alexa Fluor™ 594) secondary	Donkey	1/500	A21207, Invitrogen

Supplementary Table S4. List of antibodies used in this study.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods 7, 248–9. https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248

Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M.C., Rattei, T., Mende, D.R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2015. eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. Nucleic Acids Research 44, D286–D293. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1248

Ioannidis, N.M., Rothstein, J.H., Pejaver, V., Middha, S., McDonnell, S.K., Baheti, S., Musolf, A., Li, Q., Holzinger, E., Karyadi, D., Cannon-Albright, L.A., Teerlink, C.C., Stanford, J.L., Isaacs, W.B., Xu, J., Cooney, K.A., Lange, E.M., Schleutker, J., Carpten, J.D., Powell, I.J., Cussenot, O., Cancel-Tassin, G., Giles, G.G., MacInnis, R.J., Maier, C., Hsieh, C.-L., Wiklund, F., Catalona, W.J., Foulkes, W.D., Mandal, D., Eeles, R.A., Kote-Jarai, Z., Bustamante, C.D., Schaid, D.J., Hastie, T., Ostrander, E.A., Bailey-Wilson, J.E., Radivojac, P., Thibodeau, S.N., Whittemore, A.S., Sieh, W., 2016. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. Am J Hum Genet 99, 877–885. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.016

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature 596, 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P.C., 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc 4, 1073–1081. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86

Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G.M., Shendure, J., Kircher, M., 2019. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. Nucleic Acids Research 47, D886–D894. https://doi.org/10.1093/nar/gky1016

Sievers, F., Higgins, D.G., 2018. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. Protein Science 27, 135–145. https://doi.org/10.1002/pro.3290

Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P.T., Wymann, M.P., Williams, R.L., 2000. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. Mol Cell 6, 909–919. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(05)00089-4

Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., Williams, R.L., 1999. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. Nature 402, 313–320. https://doi.org/10.1038/46319

Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics 25, 1189–1191. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033

Le projet portant sur *CDK10*

I. Introduction

A. Le gène *CDK10*

Le gène *CDK10* (Cyclin Dependent Kinase 10) situé sur le chromosome 16 (16q24.3) code une sérine-thréonine kinase de 41kDa qui est exprimé d'une manière ubiquitaire et mise en évidence dans les années 2000. *CDK10* présente 7 isoformes issues de l'épissage alternatif aux extrémités 5' et 3' UTR du gène. L'isoforme principale (NM_052988.4) code pour une protéine de 350 AA (NP_919428.1) qui est majoritairement exprimée dans tous les tissus à l'exception du cerveau et du muscle (Sergère et al., 2000). Seule cette dernière est catalytiquement active et est capable d'être adressée dans le noyau grâce au signal de localisation nucléaire (NLS pour « Nuclear Localization Sequence ») qui se trouve à l'extrémité C-terminale (C-ter) de la protéine (Guen et al., 2017).

La protéine CDK10 appartient à la famille des kinases dépendantes des cyclines (CDK pour « Cyclin-Dependant Kinase »). Elle est caractérisée par deux domaines, le domaine Sérine-thréonine kinase qui s'étend sur 284 AA quasiment sur toute la protéine (de l'AA 39 à 323) et le domaine de liaison à l'ATP (ATP binding site) qui se situe en début de la protéine permettant, en partie, son activité catalytique (

Figure 43A).

En 2013, des études d'interactions protéiques ont permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine CDK10 et la cycline Q (initialement nommée cycline M, codé par le gène *CCNQ*). La cycline Q interagit avec CDK10 grâce à son domaine N-terminal (N-ter), permettant son activité catalytique kinase et assurant sa stabilité en empêchant sa dégradation par le protéasome (Guen et al., 2013; Robert et al., 2021) (Figure 43B).

CDK10 joue un rôle fondamental dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et elle participe activement à d'autres fonctions comme la régulation transcriptionnelle au cours de la prolifération cellulaire et du développement embryonnaire (Kasten and Giordano, 2001; Yu et al., 2012; Zehra et al., 2019). Comme certaines CDKs dites « transcriptionnelles », une étude récente retrouve le « Carboxy-Terminal Domain » (CTD) de l'ARN polymérase II comme étant un substrat de CDK10 expliquant son rôle dans la régulation de la transcription (Düster et al., 2022; Guen et al., 2017). Son rôle dans la prolifération cellulaire semble être variable et opposé en fonction de l'isoforme considérée. Certaines études ont montré que CDK10 assure un contrôle positif de la division cellulaire en agissant activement au niveau de la phase G2/M permettant la division de la cellule, notamment dans les tumeurs de telle sorte que certaine étude le considère une cible thérapeuthiques du cancer. Par contre d'autres études, considère que CDK10 n'a aucun effet sur la croissance tumorale d'ostéosarcomes murins (Bagella et al., 2006). Des expériences réalisées sur des fibroblastes cutanées humaines KO *CDK10*$^{-/-}$ n'ont mis en évidence aucune différence de prolifération et de progression du cycle cellulaire de ces dernières (Windpassinger et al., 2017). Il a été démontré, que par son activité de régulation transcriptionnelle et son activité kinase, CDK10 peu inhiber le facteur de transcription pro oncogénique ETS2 (V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2) réprimant ainsi la prolifération tumorale (Kasten and Giordano, 2001).

Pour conclure, selon les mécanismes complexes auxquelles CDK10 est soumise, elle peut à la fois réprimer et promouvoir la prolifération tumorale (Robert et al., 2020).

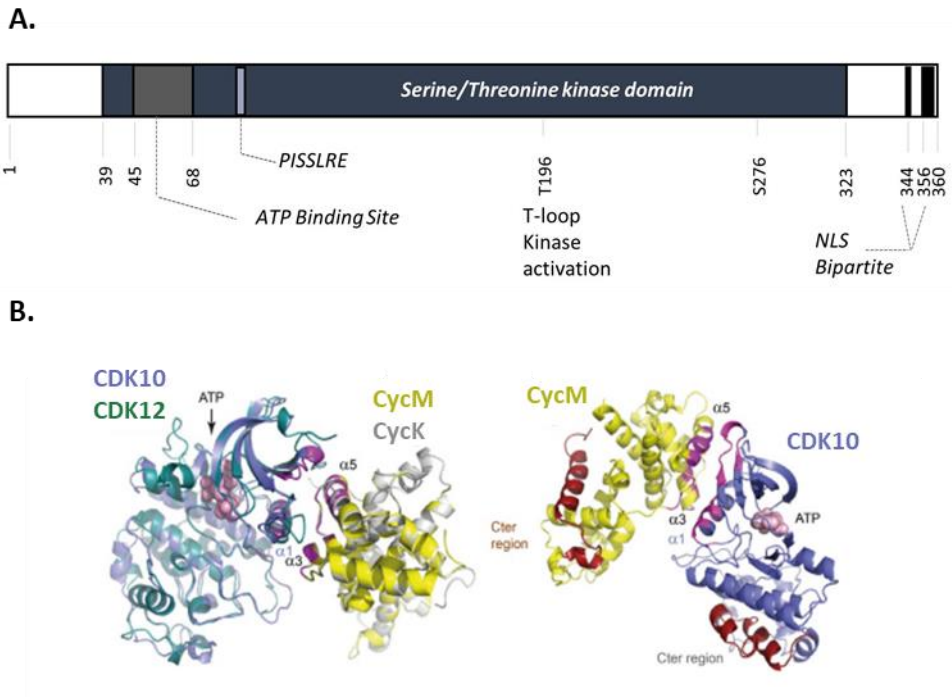


Figure 43 : CDK10. A. Représentation schématique des différents domaines protéiques de CDK10 avec la position des AA correspondants à leur début et à leur fin sur la protéine (Séquence de référence : NM_052988.4, GRCh37/hg19). **B.** Modèle structural basé sur la structure cristallographique du couple CDK12 (en vert) /Cycline K (en gris), représentant l'interface d'interaction (en violet) de l'hétérodimère CDK10 (en bleu) /Cycline Q (initialement cycline M) (en jaune), avec les différentes hélices α impliquées. A droite une vue obtenue après avoir réalisé une rotation de 180° à partir de la vue à gauche (Robert *et al*. 2021).

B. Rôle de CDK10 dans le cil primaire

CDK10 forme un hétérodimère avec la cycline Q, le couple CDK10/Cycline Q est localisé à la base du cil primaire, concentré au niveau du centriole mère et joue le rôle d'un répresseur de la ciliogénèse. Des études ont montré que des défauts d'expression de l'hétérodimère n'altèrent en rien l'intégrité du corps basal. En revanche, l'activité de l'hétérodimère en tant que suppresseur de la ciliogénèse passerait plutôt par une modulation de la dynamique de l'actine ayant pour conséquence une suppression de l'assemblage du cil (Guen et al., 2016). Le couple CDK10/Cycline Q phosphoryle la protéine PKN2 à la base du cil. PKN2 phosphorylé va à son tour activer la protéine RhoA, une GTPase enrichie au niveau du corps basal ciliaire impliquée dans le maintien des fibres de stress d'actine qui vas s'opposer à l'élongation du cil. Il a été déjà démontré que l'inhibition de RhoA permet de promouvoir la ciliogénèse (Hernandez-Hernandez et al., 2013) et que, à l'opposé, son hyperactivation empêche la polymérisation du réseau d'actine et ainsi l'élongation du cil. Cette dérégulation de RhoA a été rapporté dans de nombreuses ciliopathies « typiques » comme le syndrome de Bardet-Biedl (Guen et al., 2016). Des défauts d'expression de l'hétérodimère CDK10/CyclineQ favorisent

donc l'assemblage et l'élongation des cils primaires, *via* la perturbation du réseau d'actine, par le biais d'un axe de régulation PKN2-RhoA, sans promouvoir la sortie du cycle cellulaire. Des résultats similaires obtenus avec l'induction d'une version non phosphorylable de PKN2 ou avec une expression ectopique de RhoA, suggèrent que cette dernière est donc critique pour l'effet négatif de CDK10/Cycline Q sur la ciliogénèse (Figure 44).

L'absence d'expression de *CDK10* dans des lignées hTERT-RPE1 humaines (cellules immortalisées de l'épithélium pigmenté rétinien) (Guen et al., 2016) et des fibroblastes embryonnaires murines KO *Cdk10*$^{-/}$ (Windpassinger et al., 2017) conduit à l'augmentation du nombre de cellules ciliées pourvues de cils plus longs par rapport aux contrôles. A l'inverse, lorsque les défauts d'activité de CDK10 sont liés à des variations pathogènes présentes dans son domaine C-terminal (dans le signal de localisation nucléaire NLS), les cils observés sont plus courts voir absents, et ce à cause de la perte de fonctions nucléaires de la protéine et le gain de fonctions cytoplasmiques (notamment ciliaires) (Guen et al., 2018; Robert et al., 2021). D'autres études réalisées sur la souris KO *Cdk10*$^{-/-}$ ont mis en évidences des modifications d'expressions dans les gènes *BBS4* et *CEP290*. BBS4 interagit avec CEP290 et fait partie du BBSome. Ces résultats que le couple CDK10/Cycline Q pourrait aussi être impliqué dans le trafic ciliaire : une hypothèse qui reste à être démontrée.

Jusqu'à présent aucune étude sur cellules humaines de patients porteurs de variants dans le gène *CDK10* n'a permis de mettre en évidence une élongation du cil primaire. De même, aucune étude n'a montré l'impact de la version mutée de *CDK10* sur la fonction ciliaire et plus particulièrement sur la régulation de l'activation de la voie SHH qui est le plus souvent déréguler avec l'altération du cil (ciliogénèse et longueur du cil).

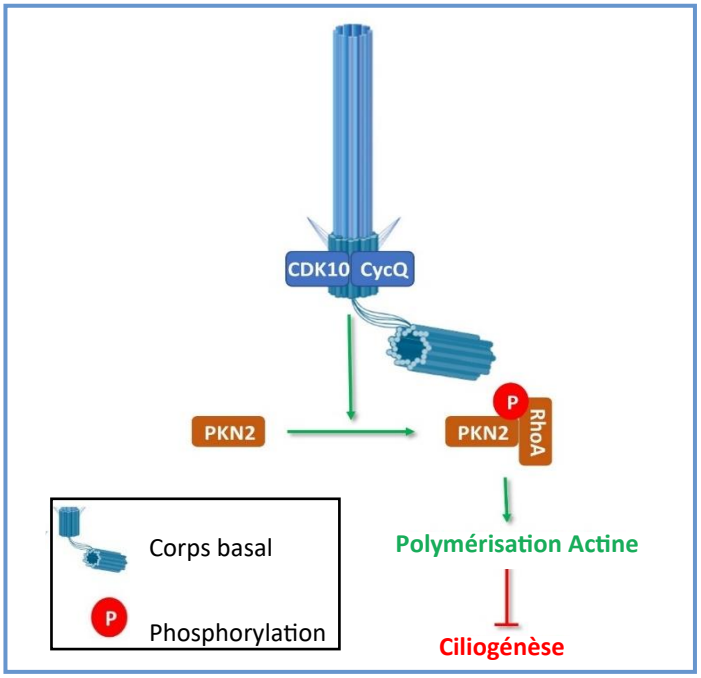


Figure 44 : Rôle de CDK10 dans le cil primaire. Modèle schématique de la régulation de la dynamique de l'actine et de la ciliogénèse par le couple CDK10/Cycline Q, localisé au niveau du corps basal ciliaire (Adapté de Guen *et al*. 2016, Biorender).

C. Le syndrome d'Al Kaissi

Le syndrome d'Al Kaissi (MIM#617694) est une maladie génétique ultra rare de description relativement récente avec un mode de transmission autosomique récessive. Le syndrome est causé par la mutation du gène *CDk10*, il s'agit d'un syndrome poly malformatif associant un retard de croissance pré et post-natal souvent majeur, une hypotonie avec un retard de développement psychomoteur, une déficience intellectuelle (DI) modérée à sévère et des anomalies cérébrales. D'autres atteintes son également observés comme les anomalies cardiaques et squelettiques avec des particularités morphologiques du visage et des extrémités. Certains phénotypes n'ont été observé que chez un seul patient comme la rétinopathie pigmentaire et une dysplasie multi kystique rénale observée chez un autre (Darcha et al., 2021; Windpassinger et al., 2017). A ce jour, seulement 14 patients issus de 9 familles ont été rapportés, ce qui fait que ce syndrome est très peu connu et pas suffisamment étudier. Le tableau clinique de ce syndrome ne présente pas d'anomalie totalement spécifique ce qui le rend difficilement détectable. Finalement, c'est l'association des différents syndromes et le diagnostic moléculaire qui permettent de confirmer le diagnostic clinique du syndrome.

A ce jour, 11 variants ont été rapportés dans le gène *CDK10* dont une large délétion, 8 variants tronquants (variants d'épissage, micro-délétion causant un frameshift) et 2 faux-sens (Darcha et al., 2021; Guen et al., 2018). Des tests fonctionnels ont été réalisé pour 3 (1 frameshift et 2 variants d'épissage) parmi les variants rapportés, les résultats ont montré que les variants d'épissage provoquent l'apparition d'exons tronqués et/ou la rétention d'introns, avec la présence d'un système de dégradation des ARN messagers (ARNm) non-sens (« Nonsense-Mediated Decay » (NMD)) confirmant ainsi leur caractère délétère. Sinon, les autres variants ont, jusqu'à présent, été rapportés sans aucune investigation supplémentaire permettant de préciser leur effet sur la fonction de la protéine (Lindeboom et al., 2019).

II. Synopsis

Pendant ma thèse, j'ai participé à l'encadrement de Manon Chrétien, interne en médecine qui a réalisé son Master 2 au cours d'une année de recherche au sein de notre laboratoire. Le projet porte sur le syndrome d'Al Kaissi causé par des variants biallélіques pathogènes du gène *CDK10*. Ce projet a été porté par Manon Chrétien qui a collecté la cohorte de patients atteints du syndrome d'Al Kaissi à partir d'un cas pris en charge par le service de génétique médicale à Strasbourg. Nous avons ainsi pu approfondir nos connaissances de ce syndrome qui fait partie des ciliopathies avec une atteinte *à priori* du cil primaire. Dans le cadre de ce projet, j'ai aidé à mettre en place et adapter la « boite à outils ciliopathies » pour un gène différent de ceux testés jusque-là. J'ai ainsi accompagné Manon tout au long de cette année, je lui ai transmis toutes les techniques que j'ai apprises et réalisées pendant ma thèse pour qu'elles les appliquent à son propre projet de recherche.

A ce jour seulement 14 patients issus de 9 familles ont été rapportés avec 11 variants dans le gène *CDK10*, ce qui fait que ce syndrome est finalement encore très peu connu et peu documenté. Au vu de la rareté du syndrome, nous avons décidé d'établir une cohorte de patients présentant des variants biallélіques du gène *CDK10* afin d'étendre le spectre clinique et mutationnel. Via différents appels à collaboration et notamment GeneMatcher, Manon Chrétien a pu mettre en place cette cohorte de patients qui se compose actuellement de 15 individus issus de 13 familles distinctes porteurs de 16 variants différents dont 7 sont considérés de signification incertaine (VSI).

L'objectif principal de ce projet était d'analyser les données génétiques et cliniques en les comparant à celles de la littérature et d'apporter des arguments fonctionnels *via* différentes techniques afin de pouvoir réinterpréter ces variations de signification incertaine et pouvoir ainsi établir un diagnostic moléculaire pour ces patients. Nous avons donc appliqué les tests fonctionnels permettant d'étudier l'expression génique, l'expression protéique et la fonction de CDK10 sur une sélection de patients dont une famille strasbourgeoise pour lesquels nous disposions les fibroblastes cutanés au laboratoire. J'ai donc formé et accompagné Manon Chrétien dans la réalisation des différentes expériences sur les fibroblastes cutanés des patients sélectionnés. Les études fonctionnelles ont permis de prouver la pathogénicité de 6 des 7 variants de signification incertaine. La pathogénicité des variants faux-sens a été démontré en mettant en évidence une diminution d'expression génique et/ou protéique, *via* la visualisation d'un défaut partiel de translocation nucléaire ou *via* la constatation d'une perte du phénotype d'interaction au moyen d'une étude en double-hybride dans la levure. Ces deux expériences ont été réalisée par Manon Chrétien dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Pierre Colas de Roscoff (UMR 8227). Pour les variants d'épissages, le séquençage de l'ADNc a permis de montrer une abolition du site canonique donneur d'épissage GT ou la présence de plusieurs transcrits alternatifs après électrophorèse sur gel d'agarose. Ces caractérisations fonctionnelles ont ainsi permis de reclasser les variants de signification incertaine (classe 3) en variants probablement pathogènes (classe 4). Ce travail a permis de résoudre 5 familles permettant ainsi d'avoir accès à un conseil génétique fiable.

Le syndrome d'Al Kaissi est de description récente et les données démontrant le lien entre le cil primaire et la protéine CDK10 restent rares. En outre, son appartenance au groupe des ciliopathies a été évoqué, mais reste encore à préciser, tant sur le plan clinique que biologique. La caractérisation de l'impact des variants sur le phénotype ciliaire et sur la voie SHH était donc l'objectif secondaire de cette étude. Pour cela nous avons appliqué la « boite à outils ciliopathie » sur la même sélection des 5 patients résolus. Certains patients présentaient une élongation du cil primaire confirmant ainsi le rôle répresseur de CDK10 sur la ciliogénèse. Une sous-activation de la voie SHH a été notamment observée chez tous les patients. Ces résultats renforcent l'appartenance du syndrome d'AI Kaissi au groupe hétérogène des ciliopathies.

Cette étude fait l'objet d'un article qui devrait être soumis prochainement.

III. Article

A *CDK10* allelic series further refines the Al Kaissi syndrome

Manon CHRETIEN[1,2], Adella KARAM[1], Sabine GENICOT[3], Pascal KESSLER[4], Benoit ARVEILER[5,6], Tania ATTIE BITACH[7], Sevcan BOZDOGAN[8], Theresa BRUNET[9,10], Daniel CALAME[11], Perrine CHARLES[12], Benjamin COGNE[13,14], Claude DARCHA[15], Anne-Catherine DOCK-BREGEON[3], Martin Elferink[16], Carole GOUMY[17], Evren GUMUS[18], Isabella HERMAN[11,19,20], Bertrand ISIDOR[13,14], Béatrice JOSSELIN[3], Kimia KAHRIZI[21], Boris KEREN[22], Fanny LAFFARGUE[23], James R. LUPSKI[20], Vincent MICHAUD[5,6], Jeremie MORTREUX[24], Hossein NAJMABADI[21], Marie-Emmanuelle NAUD[24], Renske OEGEMA[16], Davut PEHLIVAN[11], Juliette PIARD[25,26], Amélie PITON[27,28], Laure RAYMOND[24], Marcia RODRIGUES[29], Hans-Hilger ROPERS[30,31], Heide SEIDEL[9,10], Aurélien TRIMOUILLE[5,6], Dominik Sebastian WESTPHAL[9,10], Hélène DOLLFUS[1,2], Elise SCHAEFER[1,2*], Pierre COLAS[3*], Jean MULLER[1,28*]

[1]Laboratoire de Génétique Médicale, INSERM, UMR_S 1112, CRBS, Université de Strasbourg, France;
[2]Service de Génétique Médicale, IGMA, CRBS, Strasbourg, France;
[3]Sorbonne Université / CNRS UMR8227, Station Biologique, Roscoff, France;
[4]Université de Strasbourg, Inserm UMS 38, Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg, Faculté de Médecine, Strasbourg, France ;
[5]Rare Diseases Genetics and Metabolism, INSERM U1211, SBM Department, University of Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France;
[6]Department of Medical Genetics, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France.
[7]Service de Médecine génomique des maladies rares, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, France;
[8]Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Cukurova University, Adana, Turkiye;
[9]Institute of Human Genetics, School of Medicine & Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Germany;
[10]Dr. v. Hauner Children's Hospital, Department of Pediatric Neurology and Developmental Medicine, LMU - University of Munich, Munich, Germany;
[11]Pediatric Neurology and Developmental Neuroscience, Baylor College of Medicine, and Texas Children's Hospital, Houston, Texas, US;
[12]Service de Génétique Clinique et Médicale, Hôpital La Pitié Salpêtrière, Paris, France;
[13]Nantes Université, CHU de Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France
[14]Nantes Université, CHU de Nantes, Service de Génétique médicale, F-44000 Nantes, France
[15]Service d'Anatomopathologie, CHU Estaing, Clermont-Ferrand, France;
[16]Genetics, University Medical Centre Utrecht, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands;
[17]Service de Cytogénétique, CHU Estaing, Clermont-Ferrand, France;
[18]Medical Genetics Department, Medicine Faculty of Mugla Sitki Kocman University, Turkey;
[19]Department of Neurosciences, Boys Town National Research Hospital, Boys Town, NE 68010;
[20]Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, 77030;
[21]Genetics Research Center, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran;
[22]Département de Génétique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP Sorbonne Université; Paris, France;
[23]Service de Génétique Médicale, CHU Estaing, Clermont-Ferrand, France;
[24]Laboratoire Eurofins Biomnis, Lyon, France;
[25]Centre de Génétique Humaine, Centre Hospitalier Universitaire, Université de Franche-Comté, Besançon, France ;
[26]UMR 1231 GAD, Inserm, Université de Bourgogne Franche Comté, Dijon, France ;
[27]Department of Neurogenetics and Translational Medicine, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Illkirch, France;
[28]Laboratoires de Diagnostic Génétique, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France;
[29]Serviço de Genética Médica, Hospital de Santa Maria, CHU Lisboa Norte, Lisboa, Portugal;
[30]Institute of Human Genetics, University Medicine Mayance;
[31]Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany;

* These authors contributed equally to this work
‡ Corresponding authors: Jean Muller/Pierre Colas
Email address: jeanmuller@unistra.fr/colas@sb-roscoff.fr

ABSTRACT

Al Kaissi syndrome (#MIM617694) is an autosomal recessive disorder linked to the *CDK10* gene combining growth delay, intellectual disability, thin corpus callosum, morphological features and vertebral segmentation defects. The *CDK10* gene encodes a serine-threonine kinase that is thought to be involved in ciliogenesis, making Al Kaissi syndrome a ciliopathy. Since 2017, only 14 individuals have been reported in the literature, mostly carrying loss-of-function variations.

We report on the clinical, molecular and functional aspects of an international cohort of 15 patients including 9 new cases from 13 families, carrying variants in the *CDK10* gene. Functional characterizations of the variants were performed using skin fibroblasts and cell models.

Clinically, all our patients have a mild to severe intellectual disability (10/10). Some patients (9/14) had postnatal growth retardation. Eight of them (8/15) have hypoplasia of the corpus callosum. Finally, four individuals (4/9) have vertebral segmentation defects. At the molecular level, the pathogenicity of 7 variations of uncertain significance could be assessed including 3 missense, one in frame deletion, and three splice variants. As previously described (only on cell models and murine cells), we confirm in patients an elongation of primary cilia on human cells (skin fibroblasts).

This study describing the largest cohort of patients with Al Kaissi syndrome allows to broaden the clinical and molecular spectrum and finally allows a better understanding of its natural history and its membership in the heterogeneous group of ciliopathies.

Keywords: Al Kaissi syndrome, ciliopathy, *CDK10* biallelic variations, functional tests.

(Kahrizi et al., 2019)

INTRODUCTION

Ciliopathies form a group of rare genetic diseases characterized by defective primary or motile cilia. Primary cilia act as sensor organelles during embryonic development and are present at the surface of most differentiated cells (Sreekumar & Norris, 2019) (Mill, Christensen, & Pedersen, 2023). Ciliopathies present great clinical and molecular heterogeneities, yet with overlapping pathological manifestations (Hildebrandt, Benzing, & Katsanis, 2011) (Reiter & Leroux, 2017). Ciliogenesis is a dynamic cellular process that occurs during the quiescent phase of the cell cycle (G0) and that involves the actin cytoskeleton (Copeland, 2020). About 1000 proteins are thought to be involved in the elongation, stability and function of the primary cilium (Arnaiz, Cohen, Tassin, & Koll, 2014). Primary cilia play a central role in embryonic development, notably through their involvement in major regulatory pathways including Wnt (canonical or not), SHH (sonic hedgehog), PDGF, FGF, and Notch pathways (Pala, Alomari, & Nauli, 2017).

Al Kaissi syndrome (ALKAS; MIM: 617694) is a recently described clinical entity that is observed as an autosomal recessive trait, directly attributed to pathogenic biallelic variants in the *CDK10* gene that encodes cyclin-dependent kinase 10 (Windpassinger et al., 2017) (Guen et al., 2018). ALKAS is a polymalformative syndrome with major pre- and postnatal growth retardation, hypotonia with developmental delay, moderate to severe intellectual disability, thin *corpus callosum*, dysmorphic features of face and extremities (small hands, clinodactyly) and very specific skeletal abnormalities such as vertebral segmentation defects mainly involving the cervical spine. Congenital hypothyroidism and recurrent lower lung infections have also been repeatedly observed. A case of ALKAS with retinitis pigmentosa has been reported (Guen et al., 2018). These last elements echo ciliopathic phenotypes. Fourteen individuals from 9 unrelated families have been reported to date, carrying a large deletion, 8 truncating variants of the protein, or 2 missense variants (Karaca et al., 2015) (Windpassinger et al., 2017) (Guen et al., 2018) (Kahrizi et al., 2019) (Darcha et al., 2021) (**Supplementary Table 1**). As frequently observed with cyclin-dependent kinases (CDKs) (Colas, 2020), the mouse *Cdk10*$^{-/-}$ null model only partially recapitulates ALKAS, whilst presenting defects that have not been observed in patients with ALKAS (Windpassinger et al., 2017). However, the phenotypic description and the transcriptomic analysis of this mouse model, as well as neurogenesis studies performed in zebrafish (Yeh, Kao, Cheng, & Hsu, 2013), point to an essential role of CDK10 in vertebrate embryonic development.

CDK10 is a ubiquitously expressed serine-threonine kinase of 41 kDa that bears a C-terminal bipartite nuclear localization signal (NLS) (Sergere, Thuret, Le Roux, Carosella, & Leteurtre,

2000), in addition to the hallmarks of cyclin-dependent kinases (Guen, Gamble, Lees, & Colas, 2017). Located on chromosome 16, its coding gene is 9.5 kb long, comprises 13 exons, and is subjected to complex splicing events (Crawford et al., 1999) (**Supplementary Figure 1**). Cyclin M (recently renamed Cyclin Q) was identified as CDK10 activating subunit, and the CDK10/CycQ heterodimer was shown to phosphorylate the ETS2 oncoprotein, thereby contributing to its degradation by the proteasome (Guen et al., 2013). Loss-of-function variations in the *CCNQ* (formerly *FAM58A*) gene that encodes CycQ cause the STAR syndrome, a developmental defect that includes toe syndactyly, telecanthus, anogenital and renal malformations (Unger et al., 2008), reviewed in (Colas, 2020). The truncated forms of CycQ, if expressed at all in STAR patients, are unable to form a heterodimer with CDK10 and as expected from the absence of active CDK10 kinase, STAR patient-derived cells show increased levels of ETS2 protein (Guen et al., 2013). CDK10/CycQ also controls ciliogenesis and actin network dynamics through a PKN2-RhoA regulatory axis, and elongated cilia were observed in kidney sections of a STAR patient (Guen et al., 2016).

Here, we report the clinical and molecular data of 15 patients from 13 families (9 of which never reported), all presenting homozygous or compound heterozygous variations in the *CDK10* gene, and whose phenotypic findings suggest a clinical diagnosis of ALKAS. We also report the functional characterization of 9 variant alleles, 7 of which were considered as variants of uncertain significance (VUS). Finally, we provide an assessment of ciliogenesis and ciliary phenotypes in 5 patients' cell lines. This allelic series study extends the clinical and molecular spectrum of ALKAS and provides further biological insight into this neurodevelopmental disorder.

RESULTS

Cohort description and phenotypic analysis

We analyzed and compared the phenotypes of 15 individuals from 13 distinct families, 9 of which consanguineous and 4 of which already reported (Darcha et al., 2021) (Karaca et al., 2015) (Kahrizi et al., 2019) (Windpassinger et al., 2017) (**Figure 1A**). Patients are from various geographic origins with a few from European ancestry or Northern Africa as well as from Iran (**Table 1**). This analysis was performed to the extent of the availability of clinical and paraclinical explorations. The cohort includes a fetus and a patient who died at 3.5 months of life (**Table 1 and Table 2**). Detailed phenotypic description of the patients is available in **Supplementary Table 3** and **Supplementary Methods**.

The most common clinical features are high forehead (8/14), downslanted palpebral fissures (5/15), depressed nasal bridge (8/15), broad nasal tip (9/14), low-set and/or posteriorly rotated ears (15/15) with abnormally shaped ears (8/14), thin upper lip (9/15) and small chin (8/14). Patient D.II.1, who died 3.5 months after birth, presented clinical features suggesting a midline defect: hypotelorism, congenital nasal pyriform aperture stenosis and solitary median maxillary central incisor (Darcha et al., 2021). *Nevus flammeus*/angiomas (glabellar or lower back regions) were observed in 5 individuals. Finally, some anomalies of extremities are noted, including: small hands (6/13), bilateral clinodactyly of the fifth finger (4/13), deep palmar and/or plantar creases (4/13) and overlapping toes (4/13) (**Figure 1B, C and D**).

Eight individuals (8/13) presented with intrauterine growth retardation (IUGR) with an average of -2.9 SD (Standard Deviations) for height and -2.7 SD for weight. Nine patients (9/14) presented with postnatal growth retardation (average of -3.2 SD for height and -3.1 SD for weight). Only one of the patients (1/9) presented a microcephaly at birth and 3 patients (3/12) experienced slowly progressive microcephaly (average of -3 SD). Five patients (5/14) experienced feeding issues with iterative vomiting and gastrostomy for 3 of them (individuals A.II.2, I.II.3 and J.II.1). Development was delayed in most cases. More than half of the individuals had congenital hypotonia (10/14). Eleven individuals (11/13) presented a motor delay, ranging from an independent walking at 21 months to an absence of walking at the age of 12 years old. Five individuals (5/10) presented wide-based gait once acquired, 3 of them with muscular weakness. A language delay, mostly severe, was present in almost all individuals (12/13). All patients that could be evaluated (10/10) presented with mild to severe intellectual disability (ID). Some behavioral problems were observed (agitation, self-injury, stereotypies) (4/11). Four individuals (4/12) presented seizures with no etiological findings (one or two episodes, mostly in first months of life). Brain MRI (Magnetic Resonance Imaging) was often abnormal: eight patients (8/15) presented thin corpus callosum (sometimes with partial or complete agenesis) and six patients (6/15) presented enlarged cerebral ventricles/colpocephaly (**Figure 1E**). Several patients (4/9) exhibited spine anomalies, in particular a fusion of the posterior articular masses of the C2-C3 vertebrae. One of them had multilayered segmentation defects (M.II.4). Six individuals (6/12) had a sacral dimple (**Figure 1E**). Heart defects were frequent with atrial septal defect (ASD; 6/13), ventricular septal defect (VSD; 2/14) and pulmonary artery stenosis (2/14). Four individuals (4/13) presented a neonatal respiratory distress. Two individuals (2/12) had unilateral

multicystic dysplastic kidney. Audition tests were normal for all individuals evaluated. Ophthalmologic evaluations have revealed 3 individuals (3/12) with strabismus.

Identification of *CDK10* variations

We report 16 different variations in the *CDK10* gene, 10 of which have never been described before. These variations are distributed throughout the gene and include 4 missense variants, 1 inframe deletion, 3 splice variants, 3 large deletions (encompassing either the whole *CDK10* gene or several exons), 1 synonymous variant, 2 nonsense variants and 2 frame-shifting deletions (**Table 1, Figure 1A** and **Figure 2**). Among those variants, 7 were of uncertain significance (class 3) (Richards et al., 2015)) and required further analysis. Those variants included 4 missense variants whose amino acid positions are either moderately (p.Glu9Gln, individual L.II.1) or highly conserved (p.Leu151Pro, D.II.I; p.Leu154Pro, A.II.2; p.Arg357His, G.II.3 and G.II.4) during evolution. Although it affects a highly conserved amino acid, the pathogenicity of the inframe deletion p.Leu211del (individual A.II.2) is difficult to predict. The synonymous variant c.792G>A; p.Pro264=, affecting the last base of exon 10 (C.II.1) and the intronic variant c.87+5G>A (J.II.1) likely have a deleterious effect by affecting splicing. The Glu9Gln missense variant (L.II.1) may also have a potential effect on splicing with the addition of a potential exonic splice enhancer (**Supplementary Table 2**). In order to assess the pathogenicity of those variants of uncertain significance, we performed a number of functional assays described below.

***CDK10* variant gene expression analysis on patients' cell lines**

We quantified *CDK10* gene expression in the 5 skin fibroblast lines that could be obtained from patients. As previously observed (Windpassinger et al., 2017) (Guen et al., 2018), we readily detected *CDK10* expression in 2 control fibroblast lines, which presented no significant difference in expression level between them. In basal culture conditions (with serum), we detected a significant, ≥50% decrease of *CDK10* expression in patients A.II.2 and K.II.1 compared to controls, contrary to patients C.II.1 and J.II.1 that showed no significant difference. Cells from patient M.II.5 presented a complete loss of transcript expression, as expected from the large frameshift deletion affecting *CDK10* (**Figure 3 A**). We then performed a qualitative analysis of the *CDK10* transcripts. Because A.II.2 is a compound heterozygous patient, we set out to determine the contribution of both variants (c.[461T>C];[628_630del]) to the decreased expression. Gel electrophoresis of RT-PCR

products and cDNA sequencing revealed that both missense and inframe deletion alleles are expressed and yield single amplicons at the expected size (**Figure 3 B, a and b**). Hence, both alleles seem to contribute to the decreased *CDK10* expression in patient A.II.2.

Three of the 5 fibroblast cell lines available in this study carry homozygous variants for which bioinformatics predictions strongly suggest an effect on *CDK10* splicing. We thus examined by gel electrophoresis of RT-PCR products the *CDK10* splicing patterns in cells obtained from patients C.II.1 (synonymous variant affecting the last base of exon 10 c.792G>A; p.Pro264=), J.II.1 (intronic variant close to the splice donor site c.87+5G>A) and K.II.1 (intronic variant located in the canonical donor site c.608+1G>A). We used the latter to validate our approach, since functional analyses previously suggested alternative splicing with 3 possible transcripts (exon 8 and/or 10 skipping and intron 9 retention in particular) and revealed at least half-decreased expression (Windpassinger et al., 2017). For this variant, we obtained 2 main amplicons, possibly corresponding to two abnormally spliced transcripts (**Figure 3 C**). A similar analysis for patients C.II.1 and J.II.1 revealed the presence of a single amplicon, of lower abundance compared to the controls. However, Sanger sequencing of both variants confirmed the bioinformatics predictions by revealing the use of alternative splice donor sites further upstream the canonical sites abolished by the variations (**Figure 3 D and E**). These marked effects of these variants on the *CDK10* transcript probably impact the cognate proteins by producing a shifted reading frame. The variants carried by patients C.II.1 and J.II.1 can thus be described as c.792G>A, r.776_792del, p.(Ser259Argfs*45) and c.87+5G>A, r.50_87del, p.(Arg17Profs*11), respectively.

Predictive analysis of the structural consequences of the CDK10 missense variants

Missense variations can disrupt the three-dimensional structure of the affected protein or disrupt one or some of its interactions with macromolecules or other ligands. The former situation usually directs the misfolded protein to the proteasome, which will degrade it. The latter situation does not usually affects the level of expression of the protein but causes interaction-specific or ”edgetic” perturbations within regulatory networks (Sahni et al., 2015). To study the type of perturbations engendered by the 5 missense variations in our cohort, we first examined the positions of the affected amino acids in the structural model of the CDK10 / CycQ heterodimer that we recently built (Robert, Dock-Bregeon, & Colas, 2021) (**Figure 2 C**). We also aligned the protein sequence of CDK10 with the sequences of transcriptional CDKs (to which CDK10 belongs), and we reported on the alignment the secondary structure elements that were experimentally determined on CDK13 (Greifenberg

et al., 2016) (**Supplementary Figure 2**). Our structural model covers CDK10 residues 32 to 343 and thus does not include Glu9 and Arg357. However, AlphaFold (Jumper et al., 2021) predicts the formation of an amino-terminal hairpin formed by the interaction between 2 antiparallel β-sheets, stabilized by an interaction between Glu9 and Arg29 (**Figure 2 C**). The function exerted by this putative hairpin and the impact of the Glu9Gln substitution on its integrity remain unknown. Leu151 and Leu154 are located at the C-terminus of helix αE. The structural model suggests that they contribute to the cohesion of the kinase core, and more specifically to the parallelism of helices αE and αF (**Supplementary Figure 2 and Figure 2 D**). Leu210 belongs to a leucine–rich sequence (PELLLG) conserved in most transcriptional CDKs, which forms a short helical segment after the T-loop (**Supplementary Figure 2**). Deletion of any of the 3 successive Leucines is expected to severely compromise this small structural item adjacent to the WYR motif, which, in CDK2, has been shown to build the wall of the groove that accommodates the substrate (**Figure 2 E**). Since neither our model nor AlphaFold covers the carboxy-terminus of CDK10, the structural consequence of the Arg357His substitution cannot be predicted. However, this variation lies in the bi-partite NLS, a functional motif that is not expected to contribute to the proper folding of CDK10.

Expression and subcellular localization of CDK10 missense variants ectopically expressed in human cells

Because at least 3 missense variants are expected to disrupt the structure of CDK10, we examined the levels of expression of Myc-tagged CDK10 variants in an immortalized human retinal pigment epithelial cell line (hTERT RPE-1). Except for CDK10.Arg357His, all missense variants showed decreased expression levels as compared to CDK10.WT. Inhibiting the proteasome activity by MG132 largely rescued these expression levels, almost to that of CDK10.WT and Arg357His **(Figure 4A**). These results are congruent with the structural predictions for variants Leu151Pro, Leu154Pro and Leu211del, which are partially degraded by the proteasome because of their probable misfolding, and for variant Arg357His, which shows no difference with wild type CDK10. They also suggest that variant Glu9Gln perturbs the proper folding of CDK10 in these cells.

Because variant Arg357His affects the bipartite NLS of CDK10, we examined its subcellular localization together with that of Myc-tagged CDK10.WT and other missense variants, in an osteosarcoma-derived human cell line (U2OS). As previously reported with a GFP-tagged protein (Sergere et al., 2000), we observed that CDK10.WT was strictly localized in nuclei, as were variants CDK10.Glu9Gln, Leu151Pro, Leu154Pro, Leu211del. Strikingly, variant

Arg357His retained a predominant nuclear localization but also showed a cytoplasmic localization. To evaluate the extent of disruption of the NLS by the Arg357His substitution, we also examined the subcellular localization of CDK10. ΔNLS, a man-made doubly-mutated CDK10 form (Lys356Ala / Arg357Ala; (Robert et al., 2021)) that abolishes the downstream basic cluster of the bipartite NLS. CDK10.ΔNLS showed a predominant cytoplasmic localization **(Figure 4 B, C**). These experiments reveal that variant Arg357His shows a partial nuclear translocation defect that may contribute to its pathogenicity.

Yeast two-hybrid protein interaction profiling of CDK10 missense variants

Yeast two-hybrid (Y2H) mating assays offer a powerful tool to determine protein interaction profiles of missense or truncated variants (Reymond & Brent, 1995) (Robert et al., 2021). The interactions between CDK10 and CycQ (Guen et al., 2013), ETS2 (Kasten & Giordano, 2001), SALL1 (Robert et al., 2021) were previously shown to produce robust Y2H phenotypes. We thus assayed the ability of the 5 CDK10 missense variants (expressed as baits, in fusion with the LexA DNA binding domain) to interact with these 3 proteins (expressed as preys, in fusion with the B42 activation domain) in yeast (**Figure 5 A**). To check the proper expression of the baits, we included a control peptide aptamer (RG22, fused to the B112 activation domain) that binds to the LexA DNA binding domain and that produces Y2H interaction phenotypes with most LexA-fusion proteins (Pamonsinlapatham et al., 2008). As observed previously (Robert et al., 2021), CDK10.WT and CDK10.ΔNLS produced strong Y2H interaction phenotypes with CycQ, ETS2, SALL1. CDK10.Glu9Gln and CDK10.Arg357His showed the same interaction profiles as CDK10.WT and CDK10.ΔNLS, including with peptide aptamer RG22, thus showing that they were properly expressed in yeast. Despite an unusually long plate incubation that produced a hitherto never observed interaction phenotype between LexA and CycQ, variants Leu151Pro, Leu154Pro and Leu211del did not show any interaction phenotype, including with RG22, which strongly suggests that they were not or very poorly expressed in yeast (**Figure 5 A**).

Expression in insect cells and *in vitro* kinase activity of CDK10 missense variants

We then set out to explore the *in vitro* kinase activity of the 5 missense variants. To this end, we co-expressed GST-CDK10 (WT or variants) and Strep2-CycQ fusion proteins in insect cells, using a bicistronic baculoviral expression system that allowed us to identify first small-molecule inhibitors against this kinase (Robert et al., 2020). Whereas we readily expressed

GST-CDK10.WT, Glu9Gln and Arg357His, we failed to detect any expression of GST-CDK10.Leu151Pro, Leu154Pro and Leu211del. The proper co-expression of Strep2-CycQ with all 6 GST-CDK10 fusion proteins validated the viral productions and the insect cell infections (**Figure 5B**). These results strongly suggest that variants Leu151Pro, Leu154Pro and Leu211del totally fail to fold properly and undergo a massive proteolysis when overexpressed in insect cells. We affinity-purified the 3 GST-CDK10 fusion proteins that were properly expressed. As previously reported, Strep2-CycQ co-purified with GST-CDK10.WT (Robert et al., 2021), and also with GST-CDK10.Glu9Gln and Arg357His, thereby confirming the Y2H results and the ability of these two variants to form a robust complex with CycQ (**Figure 5C**). We performed an *in vitro* kinase assays on the 3 heterodimers, using an optimized combinatorial peptide as substrate (Robert et al., 2020). CDK10.Glu9Gln and Arg357His showed a robust kinase activity, comparable to that of WT CDK10 (**Figure 5D**).

Non-functional CDK10 affects primary ciliogenesis or ciliary length

The involvement of the CDK10/CycQ protein kinase in the control of ciliogenesis prompted us to examine the ability of the 5 patients' cell lines to grow primary cilia properly. We visualized primary cilia by immunofluorescence after a double staining of axonemes (Arl13B protein) and basal bodies (γ-tubulin protein) (**Figure 6 A**). Cells from patients A.II.2 (p.[Leu154Pr]};[Leu211del]) and J.II.1 (c.87+5G>A), showed a significant increase in percentage of ciliated cells compared to controls, whereas cells from patients M.II.5 (homozygous frameshift deletion of exons 2 and 3) and C.II.1 (c.792G>A; p.Pro264=) did not. Surprisingly, cells from patient K.II.1 (c.608+1G>A) showed a significantly decreased percentage of ciliated cells **(Figure 6B**). We then measured the length of primary cilia grown by control and patient cell lines. Cells from patients A.II.2, C.II.1 and M.II.5 grew cilia that were significantly longer than those of both controls, whereas cells from patient K.II.1 grew cilia that were significantly shorter. In cells from patient J.II.1, cilia length did not differ from that of controls (**Figure 6C**). Hence, all of the 5 patient cell lines showed abnormal ciliogenesis rate and/or abnormal cilia.

DISCUSSION

The Al Kaissi syndrome is a recently described rare condition, with few cases reported so far. We describe an allelic series in 15 cases, among which 9 are new cases. Most clinical features observed are congruent with those of the few cases described previously and in

broad agreement with what has been observed in the *Cdk10* knockout mouse model (Windpassinger et al., 2017). Certain clinical features are frequently observed among individuals (cohort and literature), such as IUGR (~55%, n=21) and postnatal growth retardation (~67%, n=22) with poor weight gain, global developmental delay with intellectual disability (100%, n=21), thin *corpus callosum* (~50%, n=23), and dysmorphological features as depressed nasal bridge (~58%, n=23) with broad nasal tip (~76%, n=22), low set and posteriorly rotated ears (~94%, n=23), small hands (~60%, n=21) and sacral dimple (~50%, n=20) (**Table 2**). However, our study extends and nuances the clinical spectrum of the syndrome. While previously reported patients showed moderate to severe ID, two members of our cohort suffered from only mild ID. We also observed that the specific anomalies of the spine, in particular vertebral fusions, were not a constant feature, with only 4 patients affected out of 9 with a spine imaging. It remains to be determined whether this relates to an age or ascertainment bias. Like in the studies of *TBX6* associated congenital scoliosis (TACS), a further allelic series may reveal that the combination of alleles at the biallelic variant locus may influence phenotypic outcome (Wu et al., 2015) (Liu et al., 2019).

More than 60% of previously reported individuals had neonatal respiratory distress with recurrent lower infections in childhood. This history was found in less than 10% of the individuals in the cohort. Microcephaly is much less common among individuals in the cohort (25% vs 65%). Furthermore, we did not observe a number of anomalies or dysmorphic features that were previously reported such as congenital hypothyroidism, peripheral vasomotor disturbance, hyperextensible skin, association of an epicanthus with telecanthus and bilateral ptosis (**Table 2**). On the contrary, in comparison with the literature, the newly collected individuals more frequently presented a hypotonia, an atrial septal defect or a *naevus flammeus*. In addition, we found features that have not been reported so far, such as overlapping toes (in 4 members of our cohort) and bone anomalies characterized by rhizomelic shortening of the arms and radial deviation of the right hand (patients D.II.1 and E.II.4) (**Table 2**). Interestingly, the volume reduction of mineralized matrix of long bones has been observed in the *Cdk10* knockout mouse model (Windpassinger et al., 2017). It is obvious that the Al Kaissi syndrome is difficult to recognize clinically, without pathognomonic signs. Almost all morphological features are not very specific and are frequently found in other malformation syndromes with or without intellectual disability.

Only *nevus flammeus* of the glabella or vertebral segmentation defects seem to be more specific, albeit not constant.

Of the 11 *CDK10* variants previously described, only 3 have been subjected to functional studies (Windpassinger et al., 2017) (Guen et al., 2018) (Robert et al., 2021). Here, we undertook the functional characterization of 9 variants, 7 of which were considered as variants of uncertain significance (VUS). These variants were identified by high-throughput sequencing (gene/exome panel) and familial segregations were achieved by targeted sequencing when the initial analysis did not include parents (singleton exome case). To perform these functional studies, beside the classical gene and protein expression analysis and examination of protein subcellular localization, we applied two sets of assays: one focusing on cilia (ciliogenesis and ciliary length) (Karam et al., 2023) and one focusing on CDK10/CycQ, which involves predictions of impact on protein structure, yeast two-hybrid protein interaction profiling, and *in vitro* protein kinase assays (Robert et al., 2021). Using these methods, we were able to modify the ACMG class of 6 of the 7 VUS studied to likely pathogenic (class 4).

In patient (A.II.2) carrying the p.Leu154Pro and p.Leu211del variants, the CDK10/CycQ structural models predict that both variations likely cause important structural damages to CDK10. These predictions were confirmed by all subsequent experiments. *CDK10* expression was reduced by 50% compared to controls, with a likely involvement of both mutated alleles. In absence of a good, specific antibody targeting CDK10, we ectopically expressed Myc-tagged missense variants in human hTERT-RPE1 cells and we observed a weak expression for variants p.Leu154Pro and p.Leu211del, partially rescued by a proteasome inhibitor. The p.Leu151Pro variation found in patient D.II.1 (from whom no cells could be obtained) is also predicted to compromise the protein structure and its ectopic expression in human hTERT-RPE1 cells was also found reduced. These results, combined with the absence of any Y2H interaction phenotype produced by these 3 variants (including against a LexA-interacting peptide aptamer) and with their undetectable expression levels in insect cells, indicate a failure to fold properly and a resulting proteasome-mediated degradation. As expected from a loss-of-function of CDK10, cells from patient A.II.2 presented an increased ciliogenesis and longer primary cilia, as was observed upon RNAi-mediated silencing of CDK10/CycQ in hTERT-RPE1 human cells (Guen et al., 2016). Those experiments led us to reclassify those three variants to class 4. We also characterized two other missense variants, p.Glu9Gln and p.Arg357His, found in one and two patients, respectively, from whom no cells

could be obtained. Since the structure of the carboxy-terminus of CDK10 cannot be modeled, no structural prediction could be issued for the amino acid substitution at position 357. However, Arg357 contributes to the bipartite NLS that mediates the nuclear localization of CDK10 and its substitution is not expected to cause a major impact on the three-dimensional structure of the protein. In line with this prediction, the p.Arg357His variant was expressed as much as wild type CDK10 in hTERT-RPE1 and in insect cells, it presented a similar Y2H interaction profile by retaining interaction phenotypes with CycQ, ETS2 and SALL1, and it showed a kinase activity *in vitro* comparable to that of wild type CDK10. However, in contrast with CDK10.WT and the four other missense variants that were strictly localized in nuclei, the p.Arg357His variant showed a partial nuclear translocation defect and was detected in the cytoplasm when expressed in U2OS cells. All together, these observations strongly suggest that the pathogenicity of this variant lies in its mislocalization, as seen with a number of other proteins (Hung & Link, 2011). Variant p.Glu9Gln behaved similarly to CDK10.WT in our different assays, except for its decreased expression level in hTERT-RPE1 cells. The pathogenicity of variant p.Glu9Gln may thus lie in the disruption of a putative amino-terminal hairpin predicted by one model, which may cause its degradation in human cells. However, bioinformatics predictions suggest a potential splicing effect, with the addition of an enhancer sequence. So far, without further evidence, this variant remains of uncertain significance.

Although these different functional assays generally produce congruent results, they also show some discrepancies that can be explained. First, differences between expression levels in human, insect and yeast cells can be caused by a variation in protein (mis)folding and degradation between different species, which do not possess the same chaperone complement and /or the same proteasome “sensitivity” (Robert et al., 2021). Second, the fact that the immunofluorescence staining did not reveal decreased expression levels, in contrast to the Western blots, can be readily explained by signal saturation due to the much higher sensitivity of the former method over the latter.

Analysis of *CDK10* gene expression in patients’ cells revealed different situations. Variants c.792G>A; p.Pro264= and c.87+5G>A (carried by patients C.II1 and J.II.1, respectively) do not impact the expression level of *CDK10* mRNAs but affect splicing, in accordance with *in silico* predictions. Several possible transcripts can be generated by these two variants, with exonic deletions generating premature STOP codons. Because these putative deletions only concern a few nucleotides, they cannot be visualized by electrophoresis and would require

RNA sequencing to be confirmed and precisely defined. Variation c.608+1G>A (carried by patient K.II.1) decreases by more than half the expression level of *CDK10* mRNAs and causes a splicing defect, which differs from that reported in another patient carrying the same variation (Windpassinger et al., 2017). No *CDK10* mRNA expression could be detected in cells from patient M.II.5, who carries a homozygous deletion of exons 2 and 3. This large deletion generates an early premature termination codon (PTC) (p.(Leu30Alafs*24)) in exon 4 of this 13 exon gene, which is very likely to trigger non-sense mediated decay (NMD) of the messengers (Hug, Longman, & Caceres, 2016) (Teran et al., 2021). Hence, the pathogenicity of the variants carried by patients C.II.1, J.II.1, K.II.1 is primarily caused by *CDK10* splicing defects, whereas that of the variant carried by patient M.II.5 is caused by a total loss of expression.

The ciliogenesis assessment and the measurement of cilia length performed on patient cell lines confirmed the involvement of CDK10 in the growth control of the primary cilium. Surprisingly, we observed 4 different kinds of anomalies: *i)* enhanced ciliogenesis and longer cilia (patient A.II.2); *ii)* enhanced ciliogenesis and normal cilia length (patient J.II.1); *iii)* similar ciliogenesis and longer cilia (patients C.II.1 and M.II.5); *iv)* decreased ciliogenesis and shorter cilia (patient K.II.1). The latter case is to be taken with caution, since cells grew very slowly and seemed more fragile than the other lines. However, it is reminiscent to a previously described patient carrying a *CDK10* homozygous variant (c.870_871del) that may allow the translation of a truncated CDK10 protein due to a resulting frameshift (p.Trp291Alafs*18), and whose fibroblasts also showed decreased ciliogenesis and shorter cilia (Guen et al., 2018). Overall, there seems to be no obvious correlation between variant type and ciliogenesis / ciliary length anomaly. Thus, ciliary defects caused by *CDK10* loss-of-function may manifest themselves in ways that vary from one individual to another.

In conclusion, our work on 7 *CDK10* VUS allowed the reclassification of 6 of them as potentially pathogenic (class 4). We report different types of variations that cause CDK10 loss-of-function through abolished gene expression, defective mRNA splicing, protein misfolding and protein mislocalization. We reveal different types of ciliary defects in all patients' cell lines that we could obtain. Thorough clinical examination of the patients confirms some cardinal features, while further highlighting phenotypic variations. CDK10 was recently shown to phosphorylate the carboxy-terminal domain (CTD) of RNApol II *in vitro* (Duster, Ji, Pan, Urlaub, & Geyer, 2022), similarly to other so-called transcriptional

CDKs. It was also found among the 150 proteins forming the ribonucleoprotein (RNP) core of the human spliceosomal C complex. (Bessonov, Anokhina, Will, Urlaub, & Luhrmann, 2008) (Bessonov et al., 2010). Hence, beyond its involvement in the regulation of ciliogenesis, CDK10 is strongly suspected to contribute to the regulation of gene transcription and mRNA splicing. An exhaustive exploration of the transcriptomes of the patients' cells by RNAseq will further illuminate the molecular etiology of Al Kaissi syndrome.

MATERIAL AND METHODS

Affected individuals

We recruited the affected individuals through a worldwide call for collaboration *via* shared geneticist tools (ANDDI-Rares, ERN-ITHACA, GeneMatcher (Sobreira, Schiettecatte, Valle, & Hamosh, 2015), Achropuce network). We collected written informed consent for open-access publication, sharing of photographs and images and functional analysis, from the participants and/or their parents or legal guardians. We obtained 5 skin fibroblast lines for molecular and cellular studies. Study protocols were approved by the local Institutional Review Board: "Comité de Protection des Personnes" (EST IV, N_DC-20142222). Our research complies with the Declaration of Helsinki.

Pathogenic variant identification and familial co-segregation analysis

We performed molecular diagnosis by high-throughput sequencing (multigene panels or whole-exome sequencing) or by molecular cytogenetics (array-CGH). Technical details are presented in **Supplementary Methods**. We performed family segregations by targeted Sanger sequencing when the initial analysis did not include the parents (case of the solo exome) or by quantitative PCR for large deletions. We ran bioinformatics analysis on all variants (**Supplementary Table 2**).

Human cell culture and transfections

We cultured primary dermal fibroblasts (from five affected and two control individuals) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glutamax (Gibco, 21885-025) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin–streptomycin (PS) (all from Gibco). We induced ciliogenesis by starving the cells in serum free DMEM (0.1% FCS only) with 1% PS for 48 h. We grew, transfected and collected hTERT-RPE1 or U2OS cells as previously described (Robert et al., 2021).

Quantitative gene expression analysis

We extracted RNA from fibroblasts using the QiaShredder (Qiagen, 79654) and the RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74106). We reverse transcribed 160 µg of RNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, 170-889). We designed the different primer pairs using Ensembl-Browser, Primers3 software, UCSC browser *in silico* PCR and NCBI primers. Sequences and

specificity / efficacy controls are presented in **Supplementary Table 4** and **Supplementary Figure 3**. We performed quantitative real-time PCR in triplicates or quadruplicates with 10x diluted cDNAs and 10 µM *CDK10* or *GAPDH* primers, using the iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 170-8886) and a Bio-Rad CFX96TM Real-Time System. We quantified *CDK10* expression using the comparative cycle threshold (Ct) method (2-ΔΔCt method) by normalizing against the *GAPDH* reference gene using the CFX Manager Software (v.1.5) and Microsoft Excel. We ran statistical analysis using the GraphPad prism software (ANOVA tests).

Qualitative gene expression analysis

We performed end-point PCR (35 cycles) on diluted cDNAs and visualized the amplicons by electrophoresis on 2% agarose gels. We purified the amplicons and outsourced their Sanger sequencing (GATC, Konstanz, Germany). PCR and sequencing primers are presented in **Supplementary Table 4** and **Supplementary Figure 3**.

Plasmid constructions

Human cell expression plasmids: We performed site-directed mutagenesis on pCMV-Tag3B:CDK10.WT, a plasmid that directs the expression of Myc-tagged wild-type CDK10 (Guen et al., 2013), using a QuickChange II XL kit (Agilent, 200521) and pairs of oligonucleotides corresponding to the E9Q, L151P, L154P, L211del and R357H missense variants (sequences are presented in **Supplementary Table 4**). We digested pEG202:CDK10.ΔNLS, a plasmid that directs the expression of LexA-CDK10.K356/R357A (Robert et al., 2021), with EcoRI/XhoI and we ligated the insert into EcoRI/XhoI-cut pCMV-Tag3B. We amplified the resulting plasmids using a PureLink Fast low-endotoxin midi plasmid purification kit (Thermo Fisher, A35892).

Yeast expression plasmids: To construct CDK10 variant bait plasmids, we digested the pCMV-Tag3B: CDK10 mutant plasmids with EcoRI and XhoI, and we ligated the inserts into EcoRI/XhoI-cut pEG202. Constructions of CycM, ETS2, SALL1, RG22 prey plasmids and of CDK10.WT and ΔNLS bait plasmids were described previously (Bickle, Dusserre, Moncorge, Bottin, & Colas, 2006) (Guen et al., 2013) (Robert et al., 2021).

Insect cell expression plasmids: We amplified the coding sequences of all missense variants using oligonucleotides that contain an EcoRI and a NsiI site, respectively (sequences

presented in **Supplementary Table 4**). We ligated the PCR products into EcoRI/NsiI-cut pFast-BacDual:GST-CDK10.WT/Strep2-CycM.WT (Robert et al., 2020).

Immunodetection experiments on human cells and image acquisition

We performed Western blots on hTERT-RPE1 transfected cell extracts using anti-Myc and anti-tubulin antibodies as previously described (Robert et al., 2021). To visualize the subcellular localization of CDK10 variants, we grew human osteosarcoma-derived U2OS cells in 6 well plates containing microscope cover slips and we transfected them with pCMV-Tag3B:CDK10 WT or mutant plasmids, using Lipofectamin 3000 (Thermo Fisher, L3000008). We collected the cover slips 24 h after transfection, washed them in PBS, and fixed the cells with PBS containing 4% paraformaldehyde for 15 min. We then incubated the slips in PBS containing 0,15% Triton X-100 for 2 min, and blocked them in PBS containing 1% BSA for 1 h. We diluted 4000x the anti-Myc Tag antibody (9B11, Cell Signaling 2276) in the same medium and we added it onto the slips for 1 h. We washed them twice in PBS for 5 min, diluted 2000x the donkey anti-mouse antibody coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen A432766) in PBS and incubated the slips 1 h. We mounted them on cover glasses, using DAPI-containing Vectashield (Vector Laboratories). We observed the cells using a Zeiss Observer Z1 inverted fluorescence microscope and a 63 x objective, and we acquired image stacks using a charge-coupled device camera controlled by Metamorph, which we also used to deconvolve the images. We generated maximum intensity projections using ImageJ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). We visualized primary cilia and measured their length as recently described (Karam et al., 2023). To visualize primary cilia, we fixed serum-starved fibroblasts in ice-cold methanol, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and incubated in 10% FCS for 1 h, before incubating with primary and then secondary antibodies (diluted in 1/500 PBS + FCS 2%) at room temperature for 1 h. We performed biological duplicates (2 different cell passages) in 24-well plates, after induction of ciliogenesis for 48 h (- FCS). We acquired images with an Incucyte S3 device (Sartorius) and we analyzed them with ImageJ. We also visualized cilia using a confocal oil immersion microscope (Inverted Microscope Zeiss LSM 800) and a 63x objective, after fixation in 8-well labteks and addition of mounting medium (ProLong Gold, Invitrogen, P36930). The primary antibodies used in this experiment are the anti-Arl13B antibody (sc 515784, Santa Cruz) and the anti-gamma-tubulin antibody (PA5-34815, Invitrogen). The secondary antibodies used in the experiment are the donkey anti-mouse

antibody coupled to Alexa Fluor 488 (Ab150105, Abcam) and the donkey anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 594 (A21207, Abcam).

Image analysis

Quantification of CDK10 nuclear localization: To delineate the entire cells, we used a CRISPR/Cas9-edited U2OS cell line in which the RFP coding sequence was introduced upstream the gene coding for Actin. We performed the above-described experiments on cells expressing Myc-CDK10.WT, ΔNLS, or R357H, and we acquired images using a 20x objective. We quantified whole-cell and nuclear areas and fluorescence intensities using Fiji (Schindelin et al., 2012).

Ciliogenesis and cilia length measurements: We calculated cilia frequency by dividing primary cilia counts per cellular counts (300 to 700 cells analyzed per fibroblast line, 2ways ANOVA test). We measured cilia length using the Incucyte software independently of the orientation angle (~200 cells analyzed per fibroblast line and per biological series: total n = 400). We ran statistical analysis using the GraphPad prism software (Kruskal-Wallis test).

Yeast-Two Hybrid assays

We performed yeast two-hybrid interaction trap mating assays as described previously (Finley & Brent, 1994) (Robert et al., 2021), using pSH18-34 as a *lacZ* reporter plasmid.

Protein expression and purification; protein kinase assay

We co-expressed GST-CDK10 WT or variants and Strep2-CycQ in insect cells using a bicistronic baculoviral system, and we verified expression by Western Blots as previously described (Robert et al., 2020) (Robert et al., 2021). To purify the GST-CDK10/Strep2-CycQ heterodimers, we resuspended the cells in lysis buffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% IGEPAL, 1 mM DTT, 1X Halt Proteases Phosphatases inhibitor cocktail (Thermo Scientifc) pH 7.8) using 3 mL of lysis buffer for 150x 10^6 cells. We sonicated the cell suspension 4 x 10 sec in an iced water bath using a Branson sonifier 150. We centrifuged the lysate 50 min at 17,000*g*. We filtered the supernatant through a 0.45µ cellulose acetate membrane. We incubated the filtrate for 90 minutes with 2mL GSH Sepharose HP (Cytiva) previously equilibrated in the binding buffer (same as lysis buffer except IGEPAL reduced to 0.1%). We then loaded the slurry into a column. After washing the gel with ~15 CV binding buffer, we eluted the heterodimers using 10mM reduced glutathione in 50 mM TrisHCl; 400

mM NaCl, 0.1% NP40, 1mM DTT pH 8.2. We collected 0.5 ml fractions and added glycerol (10% final concentration). We then flash-froze the samples before storing them at −80°C. We analyzed the elution fractions on NuPAGE 12% gels (Thermofisher). We determined the total protein concentration using a Bradford assay (Bio-Rad). We performed *in vitro* protein kinase assays as previously described (Robert et al., 2020).

Table 1 : Demographic and genetic data on fifteen individuals with *CDK10* variations (9 new individuals and 10 new variations).

	Family A	Family B	Family C	Family D	Family E
Individual ID	**A.II.2**	**B.II.3**	**C.II.1**	**D.II.1**	**E.II.4**
Year of Birth	2018	2011	2000	Death at 3.5 months	Fetus (MA at 19 + 3 WG)
Sex	F	M	M	M	M
Ancestry	Caucasian	Maghreb	Algerian	Caucasian	Caucasian
cDNA level	c.[461T>C];[628_630del]	c.[24C>A];[24C>A]	c.[792G>A];[792G>A]	c.452T>C arr16q24.3(89644771_89869764)x1	c.503del arr16q24.3(89693099_89900237)x1
Protein level	p.[(Leu154Pro)];[(Leu211del)]	p.[(Cys8*)];[(Cys8*)]	p.[(Pro264=)];[(Pro264=)]	p.[(Leu151Pro)];[(0?)]	p.[(Asn168Thrfs*4)];[(0?)]
Inheritance	[pat];[mat]	[mat];[pat]	NA	[mat];[pat]	[mat];[pat]
Variant type	Inframe indel/Missense	Nonsense	Synonymous	Missense/CNV	Frameshift/CNV
Consanguinity	-	+	+	-	-

	Family F	Family G		Family H	Family I
Individual ID	**F.II.1**	**G.II.3**	**G.II.4**	**H.II.3**	**I.II.3**
Year of Birth	2015	1991	2000	1978	2009
Sex	F	F	F	M	M
Ancestry	Moroccan	Caucasian	Caucasian	Iranian	Caucasian
cDNA level	c.[226A>T];[226A>T]	c.[1070G>A];[1070G>A]		c.[161-1G>C];[161-1G>C]	c.[664_665del];[664_665del]
Protein level	p.[(Lys76*)];[(Lys76*)]	p.[Arg357His];[Arg357His]		p.?	p.[(Met222Valfs*38)];[(Met222Valfs*38)]
Inheritance	[mat];[pat]	[mat];[pat]		[mat];[pat]	[mat];[pat]
Variant type	Nonsense	Missense		Splice variant	Frameshift
Consanguinity	+	+	+	+	+

	Family J	Family K	Family L	Family M	
Individual ID	**J.II.1**	**K.II.1**	**L.II.1**	**M.II.4**	**M.II.5**
Year of Birth	2019	2006	2019	2009	2011
Sex	M	M	F	M	M
Ancestry	South Asian	Caucasian	NA	Algerian	Algerian
cDNA level	c.[87+5G>A];[87+5G>A]	c.[608+1G>A];[608+1G>A]	c.[25G>C];[25G>C]	c.[(87+1_88-1)_(232+1_233-1)del];[(87+1_88-1)_(232+1_233-1)del]	
Protein level	p.?	p.?	p.[(Glu9Gln)];[(Glu9Gln)]	p.[(Leu30Alafs*24)] ;[(Leu30Alafs*24)]	
Inheritance	[mat];[pat]	[mat];[pat]	NA	[mat];[pat]	
Variant type	Splice variant	Splice variant	Missense	Large deletion (exons 2-3)	
Consanguinity	-	+	+	+	+

CDK10 identifiers NM_052988.4 (RefSeq) and Q15131 (UniProtKB). Family previously reported: D [Darcha, 2021 #13], G [Karaca, 2015 #14], H [Kahrizi, 2019 #46], M [Windpassinger, 2017 #45]
Abbreviations: F: Female; ID: Identity; M: Male; MA: Medical Abortion; mat: maternal; Mo: NA: Not Available; pat: paternal; WG: Weeks of Gestation

Table 2 : Molecular data and main clinical features of the cohort in comparison with the literature.

	Cohort		Literature	
General information	Total	Percentage (%)	Total	Percentage (%)
Number of patients	15	WO	8	WO
Sex	5F/10M	WO	3F/5M	WO
Consanguinity	9/12 families	75	3/5 families	60
Distinctive *CDK10* variations				
Nonsense	2/15	13.3	0/4	0
Frameshift	2/15	13.3	2/4	50
Missense	4/15	26.6	0/4	0
Splice variant	*3/15	20	*2/4	50
Other type	**4/15	26.6	0/4	0
Growth				
IUGR	8/13	61.5	4/8	50
Postnatal growth retardation	9/14	64.3	6/8 *(Av: -3.45 SD)*	75
Low weight	8/13	61.5	6/8 *(Av: -3.55 SD)*	75
Microcephaly	3/12	25	5/8 *(Av: -3.6 SD)*	62.5
Feeding issues/GR	5/14	35.7	3/8	37.5
Developmental, neurological and muscular				
Hypotonia	10/14	71.4	3/8	37.5
Motor delay	11/13	84.6	8/8	100
Language delay/Learning difficulties/ID	12/13	92	8/8	100
Seizures	4/12	33.3	3/8	37.5
Muscular weakness	3/12	25	2/8	25
Wide-based gait/gait difficulties	5/10	50	2/8	25
Thin corpus callosum	8/15	53.3	4/8	50
Enlarged ventricles	6/15	40	2/8	25
Organ issues				
ASD	6/13	46	1/8	12.5
Recurrent chest infections	1/13	7.7	5/8	62.5
Spine abnormalities				
Vertebral fusion	4/9	44.4	8/8	100
Sacral dimple	6/12	50	4/8	50
Facial dysmorphism				
Triangular face	4/15	26.6	2/8	25
High forehead	8/14	57.1	2/8	25
Hypertelorism	3/15	20	2/8	25
Telecanthus	6/14	42.8	6/8	75
Epicanthus	4/14	28.6	7/8	87.5
Downslanted palpebral fissures	5/15	33.3	2/8	25
Bilateral ptosis	3/15	20	3/8	37.5
Depressed nasal bridge	8/15	53.3	5/8	62.5
Broad nasal tip	9/14	64.3	7/8	87.5
Low set and/or posteriorly rotated ears	15/15	100	7/8	87.5
Abnormally shaped ears	8/14	57.1	3/8	37.5
Long philtrum	4/14	28.6	8/8	100
Thin upper lip	9/15	60	3/8	37.5
Small chin	8/14	57.1	3/8	37.5

High-arched palate	5/13	38.5	4/8	50
Extremities				
Small hands	6/13	46.1	6/8	75
Deep palmar creases	3/13	23	2/8	25
Bilateral clinodactyly of the 5th finger	4/13	30.7	3/8	37.5
Pes planus	3/11	27.2	2/8	25
Overlapping toes	4/13	30.8	0/8	0
Cutaneus/Phanerian				
Nevus flammeus/glabella angioma	5/14	35.7	1/8	12.5
Malar rash	0/14	0	3/8	37.5
Hyperextensible skin	0/11	0	2/8	25
Other				
Congenital hypothyroidism	0/10	0	4/8	50
Peripheral vasomotor disturbance	0/9	0	3/8	37.5
Hyperextensibility joints	2/11	18	3/8	37.5

* c.608+1G>A in common (3 different families)

** 1 inframe deletion; 3 large deletions (taking either the whole *CDK10* gene or several exons); 1 synonymous

Some data are not available and the cohort includes a fetus and a patient who died at 3.5 months of life (some clinical features are not evaluable)

Abbreviations: ASD: Atrial Septal Defect; Av: Average; F: Female; GR: Gastroesophageal Reflux; ID: Intellectual Disability; IUGR: Intra Uterine Growth Retardation; M: Male; Nal: Normal; SD: Standard Deviation; WO: Without Object

FIGURE LEGENDS

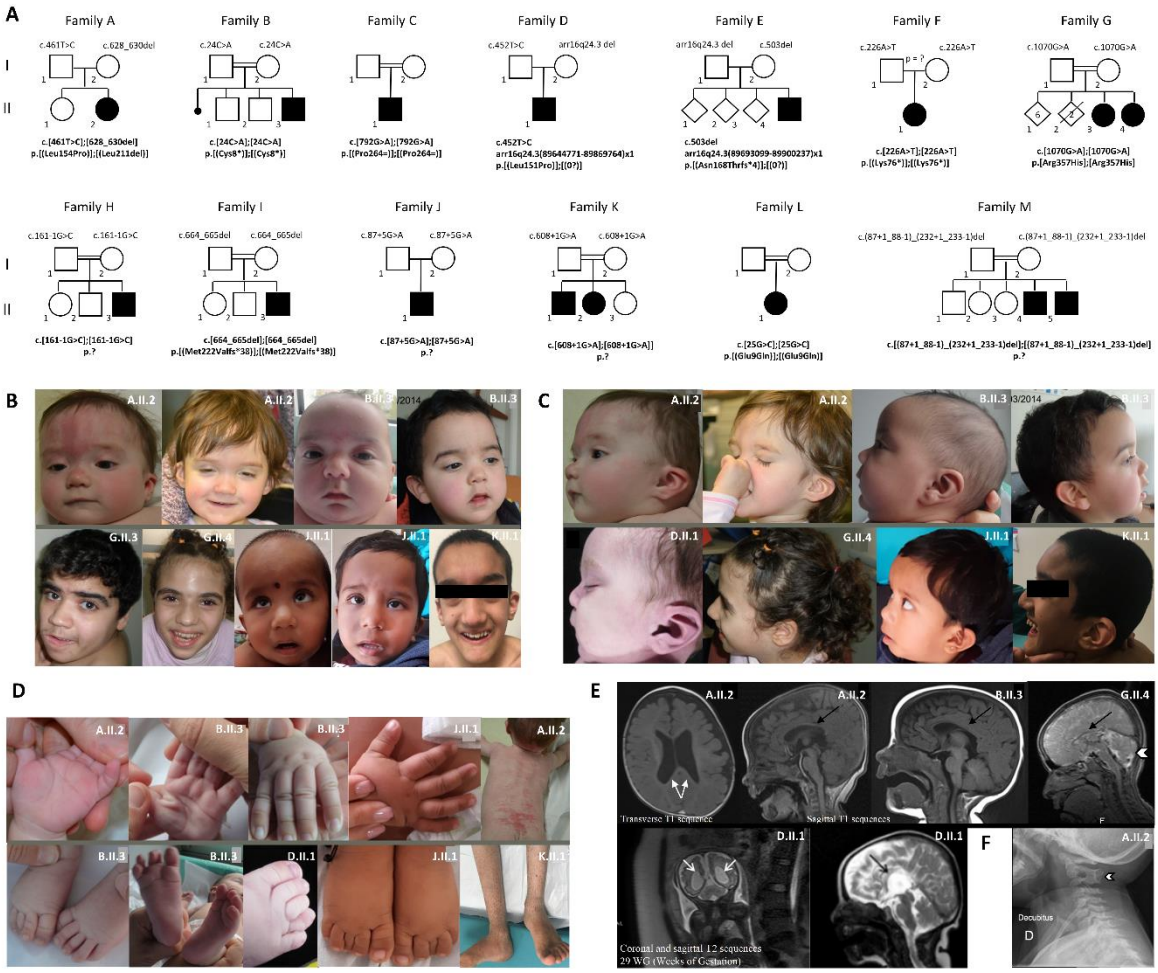


Figure 1. CDK10 families' pedigree and clinical data.

A. Pedigrees of patients carrying biallelic variants in the *CDK10* gene. Opens and filled symbols represent unaffected and affected individuals, respectively. When available cosegregation analysis is indicated. Families previously reported: Family D (Darcha et al., 2021); Family G (Karaca et al., 2015); Family H (Kahrizi et al., 2019); Family M (Windpassinger et al., 2017). **B-D**. Photographs of some patients of the cohort. **B**. Front faces **C**. Profile faces **D**. Other parts of the body including hands and foot, back and limbs. **E**. Brain MRI. Black arrows show abnormalities of the corpus callosum; white arrows show enlarged ventricles/colpocephaly; white arrowhead shows mild cerebellar atrophy. **F**. Skeleton X-rays. White arrowheads show fusion of cervical vertebrae.

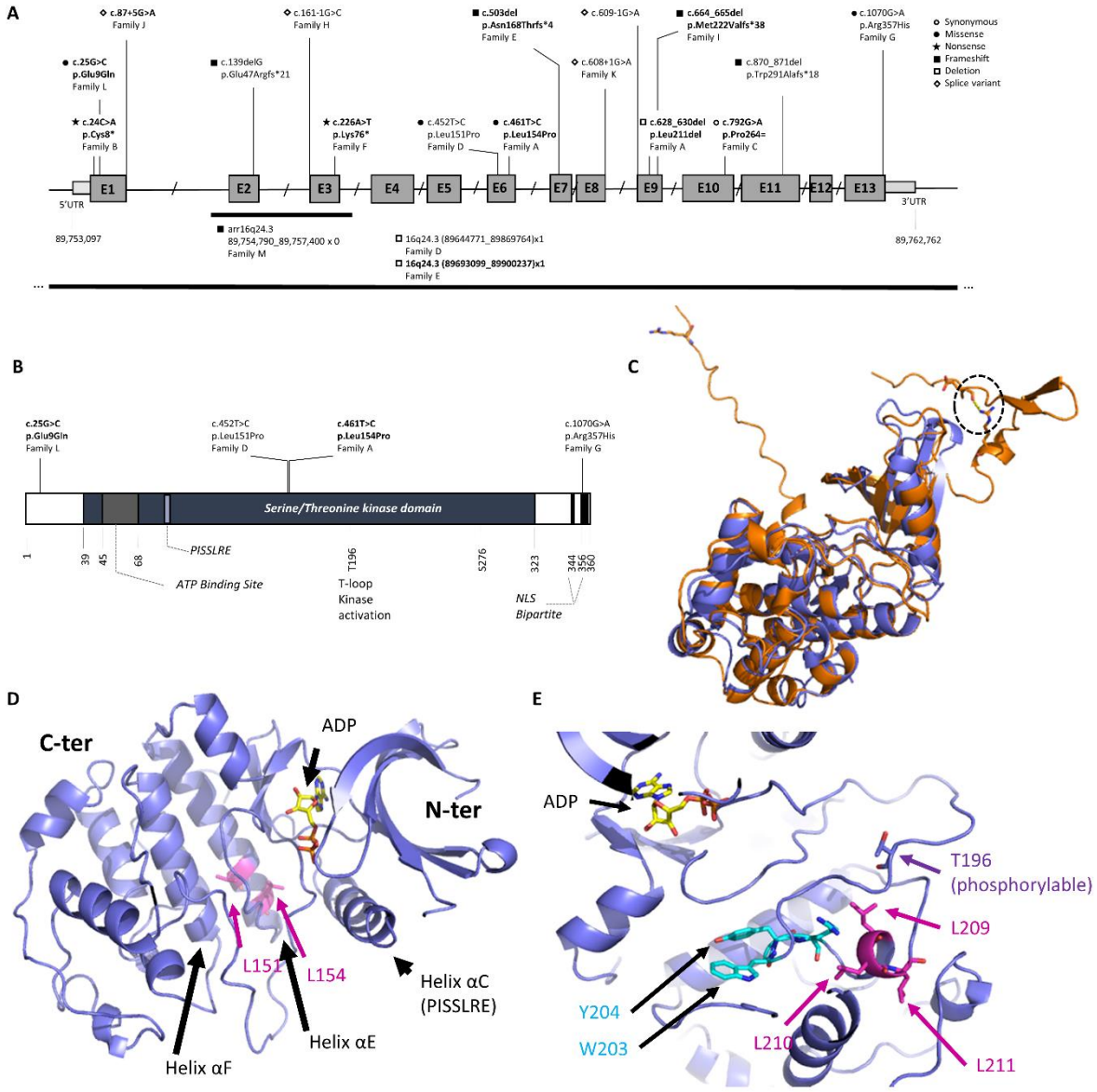


Figure 2. Exonic structure, protein domain organization and structural model of CDK10.

A. *CDK10* variations are positioned on the cDNA (NM_052988.4) and labeled according to their type. Novel variants are in bold. **B**. CDK10 protein domains and key residues. Novel variants are in bold. **C**. CDK10 structural protein model. Superimposition of our structural model (blue) and the Alphafold model (orange), showing no significant discrepancies except for the carboxy- and amino-termini. Alphafold predicts a hairpin in the latter, potentially stabilized by an interaction between Glu9 and Arg29 (black dashed circled, yellow dotted line). **D.** Leu151 and 154 are shown at the core of the kinase domain (magenta, stick representation). A molecule of ADP (yellow, from the crystal structure of the CDK12/CycK/ADP complex) is shown to delineate the active site. **E.** The small helix containing the 3 adjacent Leucines (among which is Leu210) and the WYR sequence that participates to the groove that accommodates a peptide substrate in CDK2 are shown in magenta and cyan, respectively.

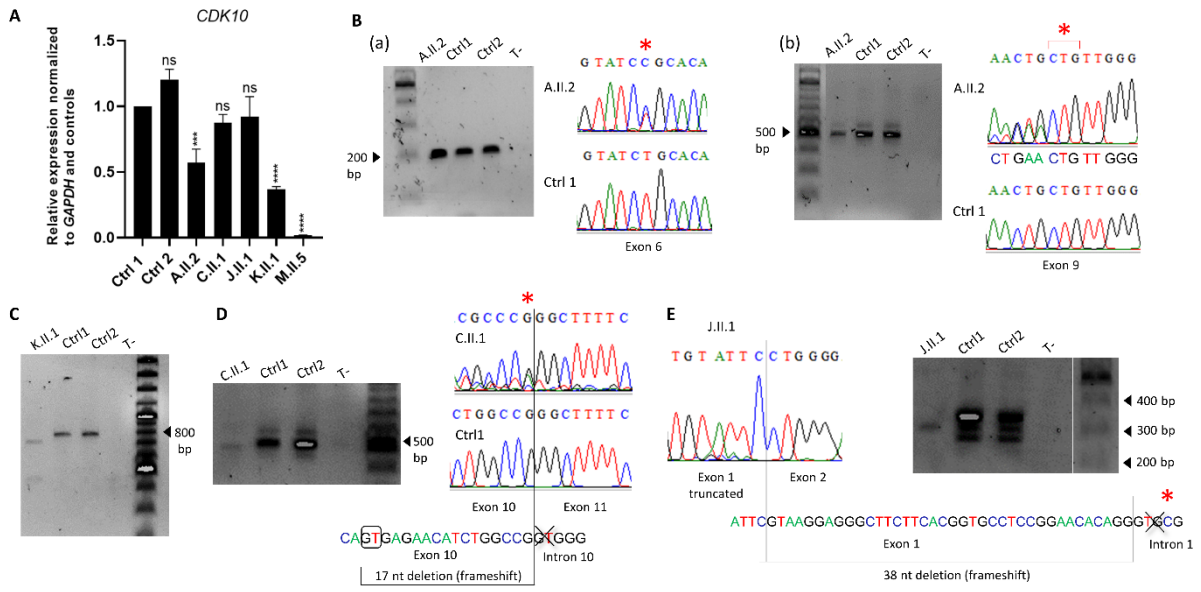


Figure 3. *CDK10* gene expression analysis in patient skin fibroblasts.

Variations are indicated using a red "*"and the new splice donor site is framed in a black square. **A**. CDK10 expression quantification using biological triplicates. Values were normalized to the reference gene *GAPDH* (p-values and significance were determined using one-way ANOVA test, multiple comparison test). *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$. **B.** Agarose gel electrophoresis and Sanger sequencing of the cDNA carrying the missense variant c.461T>C (a) and the inframe deletion variant c.628_630del (b) of patient A.II.2. **C.** Agarose gel electrophoresis of the PCR products of variant c.608+1G>A (patient K.II.1), revealing two amplicons of ca. 750 and 450 bp. **D.** and **E.** Agarose gel electrophoresis and Sanger sequencing of the PCR products of variants c.792G>A; p.Pro264= (C.II.1) and c.87+5G>A (J.II.1). A second sequenced fragment reveals an abolished canonical donor site (GT) and a novel donor site used upstream, resulting in a frameshift deletion.

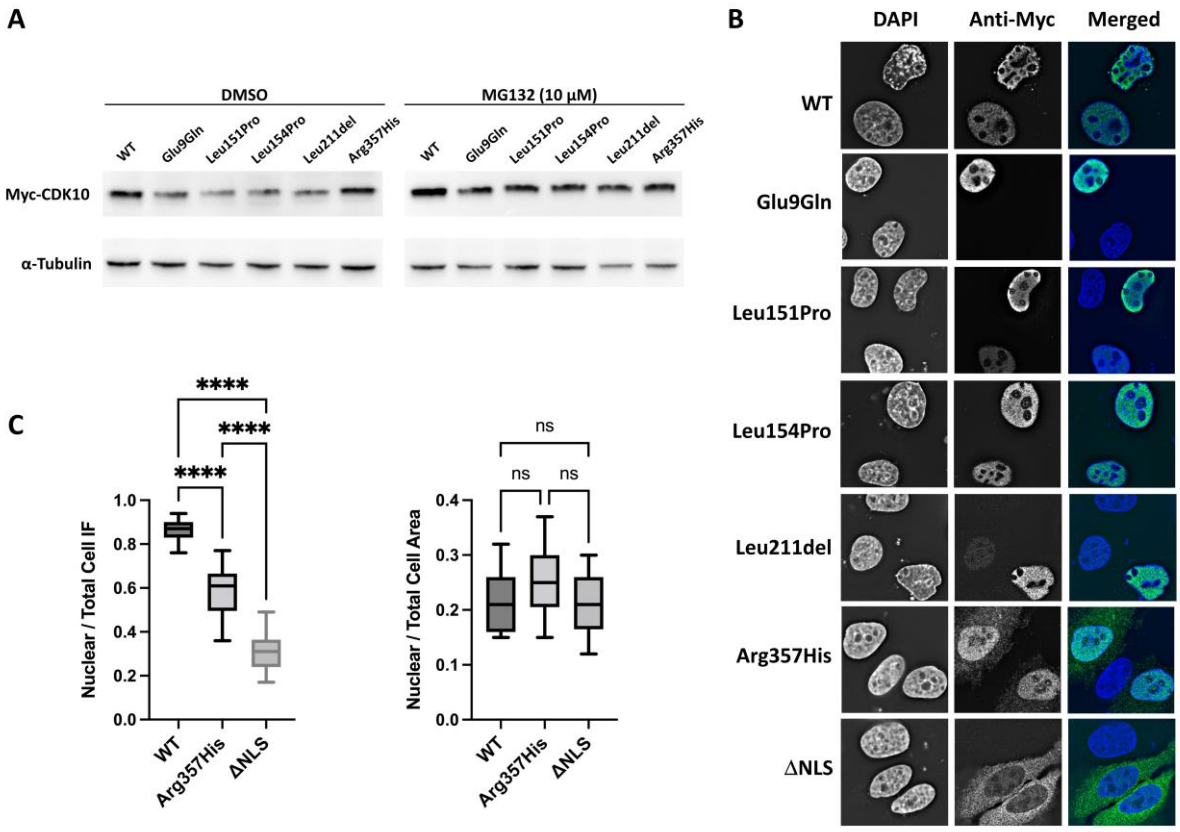


Figure 4. Expression, stability and subcellular localization of CDK10 missense variants in hTERT-RPE1 and U2OS cells.

A. Myc-tagged CDK10 missense variants were expressed in hTERT-RPE1 cells in the absence (DMSO) or the presence of 10 μM MG132, and their level of expression was determined by Western blotting using an anti-Myc antibody (upper panel). Lower panel: loading controls using an anti-tubulin antibody. **B**. Representative staining of nuclei (DAPI) and immunostaining of Myc-tagged CDK10 variants expressed in U2OS cells, colored in blue and green in the merged panels, respectively. **C.** Left: Quantification of Myc nuclear/whole cell signal ratios in U2OS:RFP-Actin cells expressing CDK10.WT, CDK10.Arg357His, and CDK10. ΔNLS. Boxes represent the 25th to 75th percentiles, and they feature the median values. Whiskers indicate the lowest and highest ratios. Statistical test: One-way ANOVA; N > 15 cells; *p*-values < 0.0001. Right: Quantification of nuclear / whole cell surface ratios of these cells.

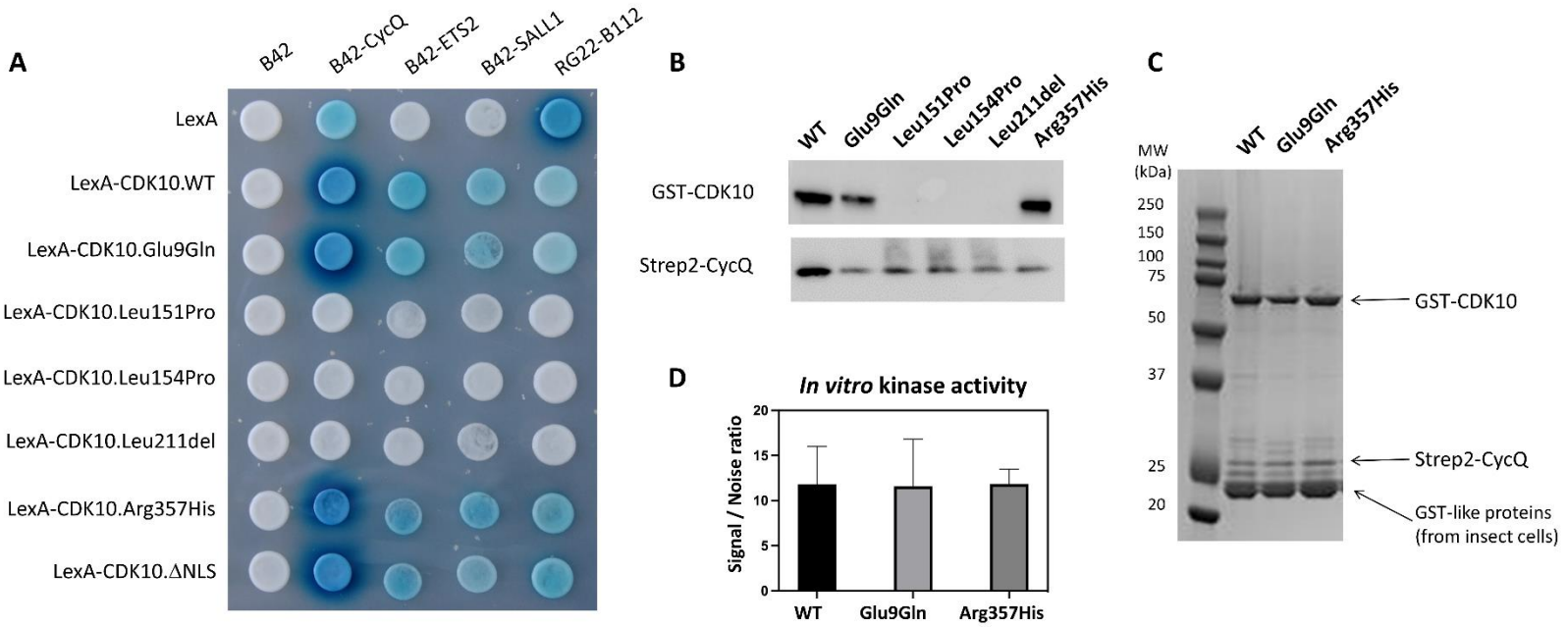


Figure 5. Yeast two-hybrid protein interaction profiling, expression of GST-CDK10 /Strep2-CycQ heterodimers in insect cells and *in vitro* kinase assays of CDK10 missense variants.

A. Bait proteins (horizontal lines) are expressed in fusion with the LexA DNA-binding domain and prey proteins (vertical lines) are expressed in fusion with the B42 transcription activation domain, except for peptide aptamer RG22, whose C-terminus is fused to the B112 activation domain. An interaction between a bait and a prey reconstitutes an active transcription factor that expresses the *lacZ* reporter gene, which produces a blue color on an X-gal containing medium. **B.** Western blots on total extracts of insect cells infected with bacculoviruses directing the co-expression of GST-CDK10 and Strep2-CycQ fusion proteins. Upper panel: blot probed with an anti-GST antibody; lower panel: blot probed with an anti-Strep2 antibody. **C**. Gel electrophoresis of GST-CDK10/Strep2-CycQ heterodimers purified on a glutathione matrix, stained with Coomassie blue. Lower, dominant protein species correspond to insect cell GST-like proteins that are also captured by the glutathione matrix (Bichet, Mollat, Capdevila, & Sarubbi, 2000). **D.** *In vitro* kinase assays against a synthetic peptide substrate. 3 independent measurements were performed for each heterodimer. Error bars indicate standard deviations.

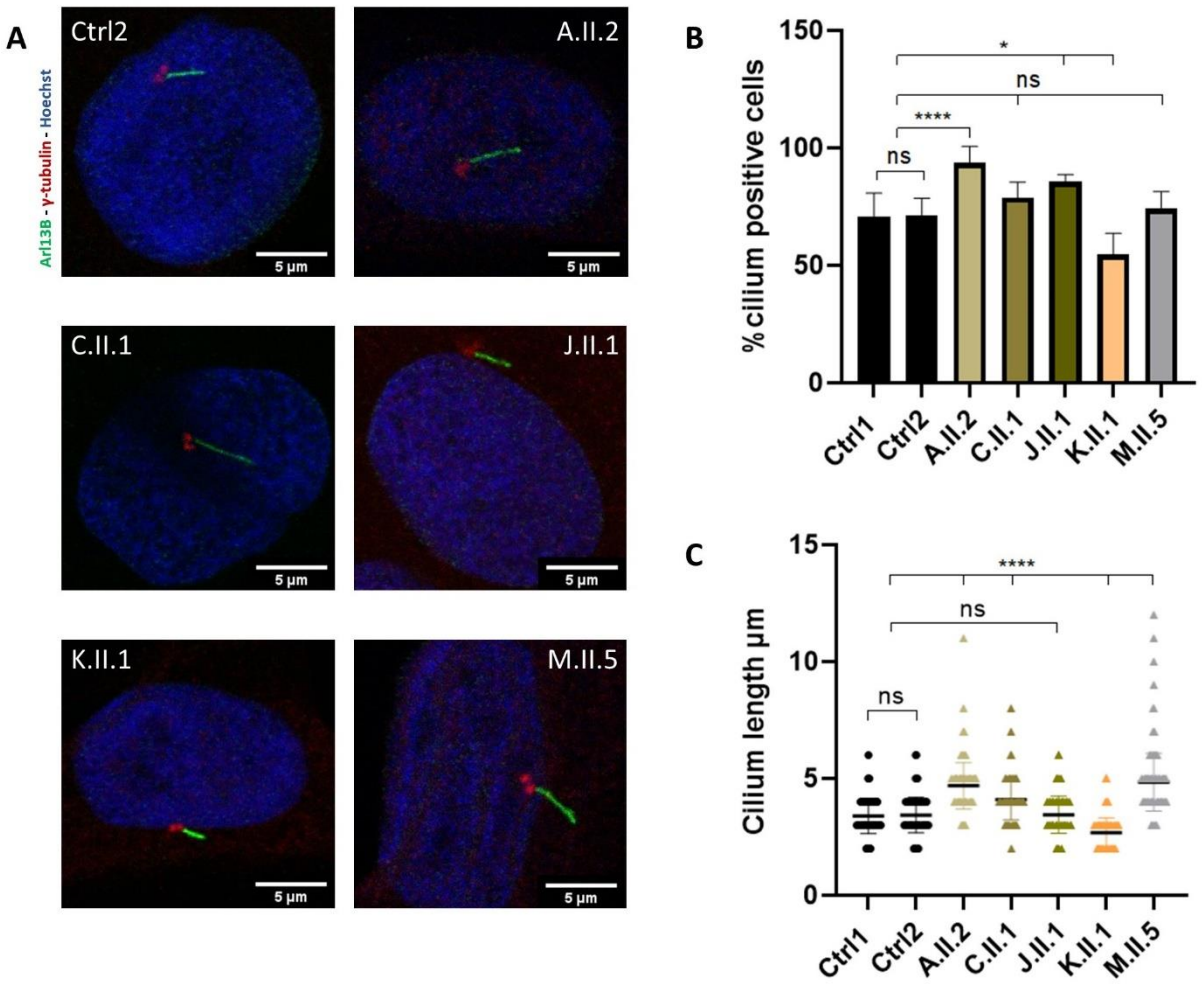


Figure 6. Assessment of ciliogenesis and characterization of ciliary phenotypes in patient skin fibroblasts

A. Representative staining of DNA (Hoechst, blue) and immunostaining of primary cilia (Arl13B, green) and basal bodies (γ-tubulin, red) in control (Ctrl2) and patient fibroblasts, observed with a confocal microscope (63x/1.4). **B.** Determination of percentage of ciliated cells. > 300 cells were analyzed in each case. *p*-values and significance were determined using ordinary one way ANOVA. * $p \leq 0.05$, **** $p < 0.0001$. **C.** Cilia length measurements. 400 cilia were measured in each case, in two independent experiments performed on biological triplicates. *p*-values and significance were determined using Kruskal-Wallis test. **** $p \leq 0.0001$).

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL

Data generated or analyzed during this study are included in the published article and the corresponding supplementary data. The raw sequencing data generated in the course of this study are not publicly available due to the protocol and the corresponding consents used that did not include such information. All variants have been submitted to ClinVar using the following range of accessions numbers XXX to XXX (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patients' families for their participation. We would like also to acknowledge the members of the diagnostic laboratories (in particular Céline Kuny) at the University Hospital in Strasbourg for technical assistance. We thank Nathalie Desban and Thomas Robert for their assistance with human and insect cells, respectively. We wish to thank Sandrine Ruchaud for providing the U2OS actin RFP cells. We wish to thank Vincent Laugel and Cathy Obringer for their help. We thank Thomas Robert at the KISSf platform (Biogenouest, IBISA, Roscoff Marine Station) for his guidance with the kinase assays. Image acquisition and analysis were performed on the Imaging Platform of the CRBS, PIC-STRA UMS 38, Inserm, Unistra. Work at the Station Biologique de Roscoff is funded by the Fondation Groupama Vaincre les Maladies Rares and the Ligue contre le Cancer Grand Ouest. This research was in part funded by Agence de la biomédecine "AMP, diagnostic prénatal et diagnostic génétique 2022", National Human Genome Research Institute/National Heart, Lung, and Blood Institute (NHGRI/NHLBI UM1 HG006542 to J.R.L), the National Human Genome Research Institute (NHGRI K08 HG008986 to J.E.P) and the Genomic Research Elucidates the Genetics of Rare disease (GREGoR) program (UM1 HG011758 to J.R.L.). D.P. is supported by NINDS (1K23 NS125126-01A1). K.K. were supported by the Iran National Science Foundation (INSF) grant number #96011200.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BA, TAB, SB, TB, DC, PC, BC, CD, CG, EG, IH, BI, BJ, KK, HN, BK, FL, JRL, VM, JM, MEN, RO, DP, JP, AP, LR, MR, HHR, HS, AT, DSW performed the clinical and molecular diagnoses of the patients. MC, ES gathered data from patients and performed clinical investigations MC, AK, PC, SG and ADB performed structural model, molecular biology and cellular experiments or analysis including Sanger and NGS data analysis, qPCR, western blots, skin fibroblasts

analysis. MC, JM and PC analyzed the data and wrote the paper, PC and JM provided direction for the project, conceived and designed the experiments. All authors approved the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

J.R.L. has stock ownership in 23andMe and is a co-inventor on multiple U.S. and European patents related to molecular diagnostics for inherited neuropathies, genomic disorders, eye diseases, and bacterial genomic fingerprinting. The Department of Molecular and Human Genetics at Baylor College of Medicine derives revenue from the chromosomal microarray analysis and clinical genomic sequencing (both ES and WGS) offered in the Baylor Genetics Laboratory. J.R.L. serves on the Scientific Advisory Board of Baylor Genetics. D.P. provides consulting services for Ionis Pharmaceuticals.

REFERENCES

Arnaiz, O., Cohen, J., Tassin, A. M., & Koll, F. (2014). Remodeling Cildb, a popular database for cilia and links for ciliopathies. *Cilia, 3*, 9. doi:10.1186/2046-2530-3-9

Bessonov, S., Anokhina, M., Krasauskas, A., Golas, M. M., Sander, B., Will, C. L., . . . Luhrmann, R. (2010). Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA, 16*(12), 2384-2403. doi:rna.2456210 [pii]
10.1261/rna.2456210

Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H., & Luhrmann, R. (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature, 452*(7189), 846-850. doi:nature06842 [pii]
10.1038/nature06842

Bichet, P., Mollat, P., Capdevila, C., & Sarubbi, E. (2000). Endogenous glutathione-binding proteins of insect cell lines: characterization and removal from glutathione S-transferase (GST) fusion proteins. *Protein Expr Purif, 19*(1), 197-201. doi:10.1006/prep.2000.1239

Bickle, M. B., Dusserre, E., Moncorge, O., Bottin, H., & Colas, P. (2006). Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures. *Nat Protoc, 1*(3), 1066-1091. doi:10.1038/nprot.2006.32

Colas, P. (2020). Cyclin-dependent kinases and rare developmental disorders. *Orphanet J Rare Dis, 15*(1), 203. doi:10.1186/s13023-020-01472-y

Copeland, J. (2020). Actin-based regulation of ciliogenesis - The long and the short of it. *Semin Cell Dev Biol, 102*, 132-138. doi:10.1016/j.semcdb.2019.12.005

Crawford, J., Ianzano, L., Savino, M., Whitmore, S., Cleton-Jansen, A. M., Settasatian, C., . . . Savoia, A. (1999). The PISSLRE gene: structure, exon skipping, and exclusion as tumor suppressor in breast cancer. *Genomics, 56*(1), 90-97. doi:10.1006/geno.1998.5676

Darcha, C., Laffargue, F., Boutaud, L., Gallot, D., Dauphin, C., Garcier, J. M., . . . Attie-Bitach, T. (2021). Novel CDK10 variants with multicystic dysplastic kidney, left ventricular non-compaction, and a solitary median maxillary central incisor. *Clin Genet, 100*(3), 348-349. doi:10.1111/cge.13996

Duster, R., Ji, Y., Pan, K. T., Urlaub, H., & Geyer, M. (2022). Functional characterization of the human Cdk10/Cyclin Q complex. *Open Biol, 12*(3), 210381. doi:10.1098/rsob.210381

Finley, R. L., Jr., & Brent, R. (1994). Interaction mating reveals binary and ternary connections between Drosophila cell cycle regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A, 91*(26), 12980-12984. doi:10.1073/pnas.91.26.12980

Greifenberg, A. K., Honig, D., Pilarova, K., Duster, R., Bartholomeeusen, K., Bosken, C. A., . . . Geyer, M. (2016). Structural and Functional Analysis of the Cdk13/Cyclin K Complex. *Cell Rep, 14*(2), 320-331. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.025

Guen, V. J., Edvardson, S., Fraenkel, N. D., Fattal-Valevski, A., Jalas, C., Anteby, I., . . . Elpeleg, O. (2018). A homozygous deleterious CDK10 mutation in a patient with agenesis of corpus callosum, retinopathy, and deafness. *Am J Med Genet A, 176*(1), 92-98. doi:10.1002/ajmg.a.38506

Guen, V. J., Gamble, C., Flajolet, M., Unger, S., Thollet, A., Ferandin, Y., . . . Colas, P. (2013). CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(48), 19525-19530. doi:10.1073/pnas.1306814110

Guen, V. J., Gamble, C., Lees, J. A., & Colas, P. (2017). The awakening of the CDK10/Cyclin M protein kinase. *Oncotarget, 8*(30), 50174-50186. doi:10.18632/oncotarget.15024

Guen, V. J., Gamble, C., Perez, D. E., Bourassa, S., Zappel, H., Gartner, J., . . . Colas, P. (2016). STAR syndrome-associated CDK10/Cyclin M regulates actin network architecture and ciliogenesis. *Cell Cycle, 15*(5), 678-688. doi:10.1080/15384101.2016.1147632

Hildebrandt, F., Benzing, T., & Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N Engl J Med, 364*(16), 1533-1543. doi:10.1056/NEJMra1010172

Hug, N., Longman, D., & Caceres, J. F. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res, 44*(4), 1483-1495. doi:10.1093/nar/gkw010

Hung, M. C., & Link, W. (2011). Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci, 124*(Pt 20), 3381-3392. doi:10.1242/jcs.089110

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., . . . Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature, 596*(7873), 583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2

Kahrizi, K., Hu, H., Hosseini, M., Kalscheuer, V. M., Fattahi, Z., Beheshtian, M., . . . Ropers, H. H. (2019). Effect of inbreeding on intellectual disability revisited by trio sequencing. *Clin Genet, 95*(1), 151-159. doi:10.1111/cge.13463

Karaca, E., Harel, T., Pehlivan, D., Jhangiani, S. N., Gambin, T., Coban Akdemir, Z., . . . Lupski, J. R. (2015). Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. *Neuron, 88*(3), 499-513. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.048

Karam, A., Delvallee, C., Estrada-Cuzcano, A., Geoffroy, V., Lamouche, J. B., Leuvrey, A. S., . . . Muller, J. (2023). WGS Revealed Novel BBS5 Pathogenic Variants, Missed by WES, Causing Ciliary Structure and Function Defects. *Int J Mol Sci, 24*(10). doi:10.3390/ijms24108729

Kasten, M., & Giordano, A. (2001). Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene, 20*(15), 1832-1838. doi:10.1038/sj.onc.1204295

Liu, J., Wu, N., Deciphering Disorders Involving, S., study, C. O., Yang, N., Takeda, K., . . . Qiu, G. (2019). TBX6-associated congenital scoliosis (TACS) as a clinically distinguishable subtype of congenital scoliosis: further evidence supporting the compound inheritance and TBX6 gene dosage model. *Genet Med, 21*(7), 1548-1558. doi:10.1038/s41436-018-0377-x

Mill, P., Christensen, S. T., & Pedersen, L. B. (2023). Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease. *Nat Rev Genet, 24*(7), 421-441. doi:10.1038/s41576-023-00587-9

Pala, R., Alomari, N., & Nauli, S. M. (2017). Primary Cilium-Dependent Signaling Mechanisms. *Int J Mol Sci, 18*(11). doi:10.3390/ijms18112272

Pamonsinlapatham, P., Hadj-Slimane, R., Raynaud, F., Bickle, M., Corneloup, C., Barthelaix, A., . . . Colas, P. (2008). A RasGAP SH3 peptide aptamer inhibits RasGAP-Aurora interaction and

induces caspase-independent tumor cell death. *PLoS One, 3*(8), e2902. doi:10.1371/journal.pone.0002902

Reiter, J. F., & Leroux, M. R. (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol, 18*(9), 533-547. doi:10.1038/nrm.2017.60

Reymond, A., & Brent, R. (1995). p16 proteins from melanoma-prone families are deficient in binding to Cdk4. *Oncogene, 11*(6), 1173-1178.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., . . . Committee, A. L. Q. A. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med, 17*(5), 405-424. doi:10.1038/gim.2015.30

Robert, T., Dock-Bregeon, A. C., & Colas, P. (2021). Functional characterization of CDK10 and cyclin M truncated variants causing severe developmental disorders. *Mol Genet Genomic Med, 9*(10), e1782. doi:10.1002/mgg3.1782

Robert, T., Johnson, J. L., Guichaoua, R., Yaron, T. M., Bach, S., Cantley, L. C., & Colas, P. (2020). Development of a CDK10/CycM in vitro Kinase Screening Assay and Identification of First Small-Molecule Inhibitors. *Front Chem, 8*, 147. doi:10.3389/fchem.2020.00147

Sahni, N., Yi, S., Taipale, M., Fuxman Bass, J. I., Coulombe-Huntington, J., Yang, F., . . . Vidal, M. (2015). Widespread macromolecular interaction perturbations in human genetic disorders. *Cell, 161*(3), 647-660. doi:10.1016/j.cell.2015.04.013

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods, 9*(7), 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods, 9*(7), 671-675. doi:10.1038/nmeth.2089

Sergere, J. C., Thuret, J. Y., Le Roux, G., Carosella, E. D., & Leteurtre, F. (2000). Human CDK10 gene isoforms. *Biochem Biophys Res Commun, 276*(1), 271-277. doi:10.1006/bbrc.2000.3395

Sobreira, N., Schiettecatte, F., Valle, D., & Hamosh, A. (2015). GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat, 36*(10), 928-930. doi:10.1002/humu.22844

Sreekumar, V., & Norris, D. P. (2019). Cilia and development. *Curr Opin Genet Dev, 56*, 15-21. doi:10.1016/j.gde.2019.05.002

Teran, N. A., Nachun, D. C., Eulalio, T., Ferraro, N. M., Smail, C., Rivas, M. A., & Montgomery, S. B. (2021). Nonsense-mediated decay is highly stable across individuals and tissues. *Am J Hum Genet, 108*(8), 1401-1408. doi:10.1016/j.ajhg.2021.06.008

Unger, S., Bohm, D., Kaiser, F. J., Kaulfuss, S., Borozdin, W., Buiting, K., . . . Kohlhase, J. (2008). Mutations in the cyclin family member FAM58A cause an X-linked dominant disorder characterized by syndactyly, telecanthus and anogenital and renal malformations. *Nat Genet, 40*(3), 287-289. doi:10.1038/ng.86

Windpassinger, C., Piard, J., Bonnard, C., Alfadhel, M., Lim, S., Bisteau, X., . . . Kaldis, P. (2017). CDK10 Mutations in Humans and Mice Cause Severe Growth Retardation, Spine Malformations, and Developmental Delays. *Am J Hum Genet, 101*(3), 391-403. doi:10.1016/j.ajhg.2017.08.003

Wu, N., Ming, X., Xiao, J., Wu, Z., Chen, X., Shinawi, M., . . . Zhang, F. (2015). TBX6 null variants and a common hypomorphic allele in congenital scoliosis. *N Engl J Med, 372*(4), 341-350. doi:10.1056/NEJMoa1406829

Yeh, C. W., Kao, S. H., Cheng, Y. C., & Hsu, L. S. (2013). Knockdown of cyclin-dependent kinase 10 (cdk10) gene impairs neural progenitor survival via modulation of raf1a gene expression. *J Biol Chem, 288*(39), 27927-27939. doi:10.1074/jbc.M112.420265

SUPPLEMENTARY DATA

SUPPLEMENTARY METHODS

MOLECULAR INVESTIGATION

Family A (A.II.2) Capture of coding regions by hybridization (SureSelect QXT, Agilent). High-throughput sequencing (NextSeq 550, Illumina, HUS Platform). « In-house » bioinformatics pipeline STARK 0.9.17b Genome version : GRCh37/Hg 19. Detection sensitivity > 99% for nucleotide substitutions, lower rate for indels. CANOE software allows the detection of CNVs, but the detection sensitivity is not guaranteed. The detection of mosaic mutations is not guaranteed. In the case of an incidental discovery in a patient with an impact on his/her management or family, and in the case where a specific consent has been signed beforehand, a separate report will be made in consultation with the prescribing clinician. Variants identified were confirmed by Sanger sequencing in the proband and its parents.

Family B (B.II.3) Library preparation, exome capture, sequencing and primary data analysis were performed by IntegraGen SA (Evry, France). Genomic DNA was captured using the Twist Human Core Exome Enrichment System (Twist Bioscience) with the addition of a Custom part from IntegraGen. Capture, enrichment and elution were performed according to the manufacturer's protocol (Twist Bioscience), without modification except for the preparation of the libraries, which was performed using the NEBNext® Ultra II kit (New England Biolabs®). Each sample is then sequenced in 100 bp pair-end reads on an Illumina NovaSeq sequencer. For a detailed description, see Gnirke et al, Nature Biotechnology 2009(Gnirke et al., 2009). Image analysis and base calling are performed by Illumina Real Time Analysis software using default settings. Reads are aligned to the reference sequence (GRCh38) by Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Duplicates were filtered out. Variant calling (substitutions and insertions/deletions up to 20 nucleotides) was performed by Broad Institute GATK Haplotype Caller GVCF (3.7) (quality limits : Q(SNPs)<10, Q(Indel)<20, QVCutoff<90). Variant annotation and filtering was performed via Bench Lab NGS Cartagenia software (Agilent) using a trio approach. The sequence of selected variants was visualized using Alamut Visual software (Interactive Biosoftware). Variants identified as potentially deleterious were validated by sequencing using the Sanger method (BDT v3.1 on ABI3500xL Dx).

Family C (C.II.1) Technical details are not available.

Family D (D.II.1)(Darcha et al., 2021) After obtaining parental consent, a genetic analysis was performed on DNA extracted from a blood sample of both parents and a frozen lung tissue of the infant. A targeted next generation sequencing on genes involved in brain anomalies and ciliopathies was performed. Briefly a total of 660 genes were captured using a 1.8 Mb customized Agilent SureSelect Target Enrichment library. Sequencing was carried out using a NextSeq500 (Illumina) machine. After demultiplexing, paired-end sequences were aligned to the reference human genome (NCBI build37/hg19 version) using Burrows-Wheeler Aligner. The mean depth of coverage obtained for each sample was greater than 240X with more than 99,5% of the exome covered at least 30X. Downstream processing was carried out with the Genome Analysis Toolkit (GATK, SAMtools, and Picard). Variant calls were made with the GATK Unified Genotyper. An in-house software tool (PolyWeb) was used for annotation (based on Ensembl release 71) and filtering. We excluded known variants listed in the gnomAD public

databases and variants previously identified in our previous “in-house” exomes. Then we selected positively for variants affecting splice sites or coding regions (nonsynonymous substitutions, insertions, or deletions). We performed a quantitative analysis by calculating the coverage of each exon to the mean of its coverage in all individuals analysed in the same run. Note the confirmation of the large deletion by retrospective analysis of the ACPA (Chromosomal analysis on DNA chip).

Family E (E.II.4) The purpose of exome sequencing is to sequence all the coding regions of the genome. From 50 ng of fragmented DNA, indexed libraries are prepared and hybridized with biotinylated Twist Human Core Exome probes (33 Mb) supplemented with probes (4 Mb) to cover the RefSeq. The total target size covers 37 megabases. Samples are prepared according to the manufacturer's recommendations (Twist Human Core Exome EF Multiplex Complete kit). Library pools (multiplexed by 12 samples) are sequenced on the Illumina NextSeq 500 sequencer in pair-end mode (2x75 bp). Raw data (bcl file format) are converted to fastq format using the bcl2fastq v1.8.4 software (Illumina). The sequences are analyzed following the good practices recommended by the GATK Broad Institute, with two pipelines :

- Internal pipeline : BWA-MEM, GATK v3.6-44ge7d1cd2
- SeqOne pipeline : v.1.2, 2018

Family F (F.II.1): Diagnostic trio exome sequencing was performed at the UMC Utrecht NGS facility. Enrichment of the exome was performed using Agilent SureSelect v6 (elidS0760451) and sequenced on the Illumina Nextseq 500 platform (2 x 150bp). Sequencing data was processed with our inhouse developed pipeline, IAP v2.5.0 (Ernst et al., 2017). Briefly, read pairs were mapped using BWA-MEM (v0.7.5a) (Li and Durbin, 2009) and variants were called using GATK Haplotypecaller (v3.4-46) (Van der Auwera et al., 2013).

Family G (G.II.3 and G.II.4)(Karaca et al., 2015) Genomic sequencing was performed by the Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, (RRID: nif-0000-10162) following previously reported protocols(Lupski et al., 2013) and at Columbia University and the Regeneron Genetics Center (RGC). Briefly, samples underwent whole-exome capture using Human Genome Sequencing Center core design (52 Mb, Roche NimbleGen, RRID: nif-0000-31466), followed by sequencing on the HiSeq platform (Illumina) with approximately 150x depth of coverage. Sequence data were aligned and mapped to the human genome reference sequence (hg19) using the Mercury in-house bioinformatics pipeline. Variants were called using the ATLAS (an integrative variant analysis pipeline optimized for variant discovery) and SAMTOOLS (RRID: nlx_154607, the Sequence Alignment/Map) suites and annotated with an in-house-developed annotation pipeline that uses annotation of genetic variants and additional tools and databases(Challis et al., 2012)-(Li et al., 2009)-(Wang et al., 2010). During the analyses of candidate variants and mutations, we used external publicly available databases such as the 1000 Genomes Project (RRID: nlx_143819, http://www.1000genomes.org) and other large-scale exome sequencing projects, including the Exome variant server, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Grand Opportunity Exome Sequencing Project (RRID: OMICS_00277,http://evs.gs.washington.edu/EVS/), our in-house-generated exome database (approximatively 5,000 individuals) at the Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, and the Atherosclerosis Risk in Communities Study Database (http://drupal.cscc.unc.edu/aric/). The ExAC (RRID: nlx_158505, http://exac.broadinstitute.org) was used to search for homozygous LOF variants in specific candidate genes. All experiments and analyses were performed

according to previously described methods(Bainbridge et al., 2013). Exome sequencing at the RGC used similar protocols. Exome capture was performed using the VCRome design (Roche NimbleGen) and sequencing using the HiSeq platform (Illumina). Mapping and alignment of sequence reads were performed through the RGC in-house-developed cloud-based American Bobtail pipeline. Analysis of variants was performed using in-house-developed bioinformatics pipelines.

Family H (H.II.3)(Kahrizi et al., 2019) We extracted genomic DNA from white blood cells of patients and parents, enriched exomic sequences with the Agilent SureSelectXT Human All Exon V5 enrichment kit, performed 100 bp paired-end sequencing on an Illumina HiSeq sequencer and employed the MERAP pipeline for sequence analysis.

Family I (I.II.3) We performed exome sequencing on the proband with the SeqCap EZ MedExome (Roche) according to manufacturer's instructions and we generated 75-bp paired-end reads on an Illumina NextSeq550. Fastq files were aligned to human genome hg19 with bwa mem (v0.7.3). We then called SNVs and INDELs following GATKs best practices (v3.4). We achieved an average mean target coverage of 222X. Variants were annotated using ANNOVAR and filtered with in-house scripts to keep variants with at least 9 reads and with a variant read frequency over 20 percent impacting exonic sequences or splice sites (+/- 10bp from the junction) and with an allele frequency <0.5% in 1000 genomes, genome aggregation database (gnomAD, 123,136 exomes and 15,496 whole genome sequences ; accessed on 11/10/2018) and in a local database. The possible functional impact of amino-acid changes was predicted by SIFT(Kumar et al., 2009) (Sorting Intolerant from Tolerant), PolyPhen-2 hvar and CADD score (Combined Annotation Dependent Depletion). The Alamut software (Interactive biosoftware) was used to study retained variant sites. Variants were confirmed by Sanger sequencing in the proband and its parents.

Family J (J.II.1) Genomic DNA is enzymatically fragmented, and target regions are enriched using DNA capture probes. These regions include approximately 41 Mb of the human coding exome (targeting > 98% of the coding RefSeq from the human genome build GRCh37/hg19), as well as the mitochondrial genome. The generated library is sequenced on an Illumina platform to obtain at least 20x coverage depth for > 98% of the targeted bases. An in-house bioinformatics pipeline, including read alignment to GRCh37/hg19 genome assembly and revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) of the Human Mitochondrial DNA (NC_012920), variant calling, annotation, and comprehensive variant filtering is applied. All variants with minor allele frequency (MAF) of less than 1% in gnomAD database, and disease-causing variants reported in HGMD®, in ClinVar or in CentoMD® are evaluated. The investigation for relevant variants is focused on coding exons and flanking +/-10 intronic nucleotides of genes with a clear gene-phenotype evidence (based on OMIM® information). All potential patterns for mode of inheritance are considered. In addition, provided family history and clinical information are used to evaluate identified variants with respect to their pathogenicity and causality. Variants are categorized into five classes (pathogenic, likely pathogenic, VUS, likely benign, and benign) along ACMG guidelines for classification of variants. All relevant variants related to the phenotype of the patient are reported. CENTOGENE has established stringent quality criteria and validation processes for variants detected by NGS. Variants with low quality and/or unclear zygosity are confirmed by orthogonal methods. Consequently, a specificity of > 99.9% for all reported variants is

warranted. Mitochondrial variants are reported for heteroplasmy levels of 15% or higher. The copy number variation (CNV) detection software has a sensitivity of more than 95% for all homozygous/hemizygous and mitochondrial deletions, as well as heterozygous deletions/duplications and homozygous/hemizygous duplications spanning at least three consecutive exons. For the uniparental disomy (UPD) screening, a specific algorithm is used to assess the well-known clinically relevant chromosomal regions (6q24, 7, 11p15.5, 14q32, 15q11q13, 20q13 and 20).

Family K (K.II.1) Whole-Exome Sequencing (WES) (Nextera Rapid Capture Exome, Illumina) analysis. We analyzed variants affecting coding areas and ±20 splicing regions. 95.41% of target regions had a coverage depth of more than 20 fold.

Family L (L.II.1) SureSelect Human All Exon 60Mb V6 Kit (Agilent) was used for exome enrichment. Libraries were sequenced on an Illumina NovaSeq6000 system (Illumina, San Diego, California, USA) and reads were aligned to the UCSC human reference assembly (hg19) with BWA v.0.7.5a. Single-nucleotide variants (SNVs) and small insertions and deletions were detected using both SAMtools v.0.1.19 and GATK 4.1. Copy number variations (CNVs) were detected using ExomeDepth and Pindel. Variant prioritization was performed based on an autosomal recessive (minor allele frequency (MAF) <0.1%) and autosomal dominant (MAF <0.01%) inheritance.

Family M (M.II.5): (Windpassinger et al., 2017) for technical details.

EXTENSIVE CLINICAL DATA DESCRIPTION

Patient A.II.2 (Family A): Is the second child of an unrelated couple of Caucasian origin, with no significant family history. The pregnancy was marked by moderate intrauterine growth retardation and dilatation of the cerebral ventricles. She was born at 37 weeks of gestation with a weight and height of -3 SDS (Standard Deviation) and a head circumference in the lower limit of normal (**Supplementary Table 3**). Clinical examination at 26 months of age showed increasing postnatal growth retardation, with weight and height at -5 SDS and head circumference around -2.5 SDS. In addition, she presented feeding difficulties that required the placement of a nasogastric tube. In addition, the 26-month developmental assessment showed persistent hypotonia with psychomotor delay, without behavioral problems (acquired standing, no walking; only a few words spoken). The clinical examination also revealed morphological particularities of the face and extremities (clinodactyly and a single transverse palmar crease), as well as particularly fine hair and a sacral dimple. The skin examination revealed a nevus flammeus of the glabella as well as pinkish lumbar paravertebral macules and eczema (**Supplementary Table 3**). Brain MRI at one year of age showed a thin but not dysplastic corpus callosum and enlarged ventricles/colpocephaly. Cardiac ultrasound showed an ASD (Atrial Septal Defect), type of ostium secundum, increasing with time. The spine radiography showed segmentation defects with a fusion of the C2-C3 vertebrae. The ophthalmological examination revealed strabismus and astigmatism. In view of an abnormal distribution of fat on the thighs, persistent constipation, and a doubt about a delay in cerebral myelination (initially, then refuted with a second imaging), a basic metabolic workup was carried out and came back normal (plasma amino acid chromatography, urinary organic acids and acylcarnitine profile analysis, search for CDG (Congenital Disorders of Glycosylation) syndrome, determination of lysosomal acid lipase in blood tests, ...). Thyroid, digestive

(calprotectin and fecal elastase) and cerebrospinal fluid analysis were performed without any particularity. The array-CGH (Microarray-based comparative genomic hybridization) performed in the ante-natal period, with post-natal rereading, was also without particularity. In a second step, the realization *in trio* of an " intellectual disability " multigene panels testing from blood leukocytes highlighted two variants present in the composite heterozygous state in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.[461T>C];[628_630del]; p.[(Leu154Pro)];[(Leu211del)]); each one having been inherited from a healthy parent. Variants identified were confirmed by Sanger sequencing in the proband and its parents. Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of both variants (**Supplementary Table 2**).

Patient B.II.3 (Family B): Is the third child of a related couple of North African origin (two healthy brothers). The pregnancy was unremarkable. He was born eutrophic, at 40 weeks of gestation. A septal hypertrophy was noted in the neonatal period and then normalized spontaneously after control. The clinical examination performed at the age of 9 years did not reveal any growth retardation or microcephaly. He also showed hypotonia, some clinical features including a supernumerary nipple and abnormalities of the extremities (**Supplementary Table 3**), and myopia. His motor development was still within the norms with a walking ability acquired at the age of 16 months. However, he presented a severe language delay with intellectual disability and behavioral problems (few word associations at 7.5 years). The brain MRI performed at that time showed a thin but not dysplastic corpus callosum, without any other malformative abnormality and without any delay in myelination. The abdominal ultrasound-doppler revealed a doubt on abnormal mesenteric and coeliac vessels. The spine X-ray was unremarkable, except for the presence of pelvic asymmetry. In this context, a solo whole-exome sequencing from blood leukocytes was performed and revealed a homozygous nonsense variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.24C>A; p.Cys8*). Segregation by SANGER sequencing in the parents showed that each of them was a healthy carrier for one of the variants. Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patient C.II.1 (Family C): Is the child of a related couple of Algerian origin (more details about his family are not available). The pregnancy was unremarkable and he was born eutrophic at 41 weeks of gestation. His motor development was satisfactory with sitting at the age of 8.5 months and walking at the age of 16 months. He also presented difficulties in language acquisition with first words spoken at the age of 3. Later on, the WISC-IV (Wechsler Intelligence Scale for Children) assessment will show a mild intellectual disability. He did not show any behavioral problems. In addition, clinical features of face and extremities were noted on morphological examination (**Supplementary Table 3**) ; as well as the presence of a marked macrocephaly at the 17 year old examination (+ 4.5 SDS), without any stature or weight advance. He also presented severe bronchiolitis and recurrent viral infections, as well as a rectal prolapse and an inguinal hernia. In this context, a brain MRI was performed and was unremarkable. Cardiac ultrasound demonstrated ASD. The spine radiography showed a defect of vertebral segmentation with a fusion of the C2-C3 vertebrae and an apical intrathoracic rib. From an etiological point of view, a high throughput analysis (molecular details are not available) revealed a homozygous variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.792G>A; p.Pro264=) (familial segregation is not available). Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patient D.II.1 (Family D): (Darcha et al., 2021) for clinical and molecular details.

Patient E.II.4 (Family E): It is a male fetus from a non-consanguineous family of Caucasian origin (3 other healthy children). Among the family history, there is the notion of a mild

intellectual disability without etiology found in a paternals first cousin and great-uncle. There is also the notion of a deafness in another paternal cousin as well as a stillborn child (unknown etiology) in the maternal grandmother. The pregnancy was marked by oligoamnios and fetal hypokinesia. Ante-natal ultrasound scans also revealed a multicystic and dysplastic left kidney and enlarged brain ventricles. In this polymalformative context, a medical abvortion was performed at 19 + 3 weeks of gestation. Autopsy examination did not reveal any growth retardation but some morphological features of the face and extremities (**Supplementary Table 3**). Macroscopic examination of the brain tissue confirmed the presence of enlarged brain ventricles from the frontal poles, in association with partial agenesis of the corpus callosum (absent posterior part). The multicystic dysplastic left kidney was very increased in weight (>95th percentile). The skeletal X-ray was unremarkable. In this context, a karyotype on chorionic villi was performed and came back without any particularity (46, XY). An array-CGH was also performed on a fetal skin sample, and was returned normal (Variants of Uncertain Significance (VUS) of less than 1 Mb not being returned in ante-natal). Finally, in 2020, a *trio* whole-exome sequencing from muscle was performed and revealed a point variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.503del; p.Asn168Thrfs*4), inherited from the mother and associated with a large 207 kb deletion of the whole *CDK10* gene (arr16q24.3(89693099_89900237)x1), inherited from the father. Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of these variants (**Supplementary Table 2**).

Patient F.II.1 (Family F): The proband was first referred to the genetics clinic in infancy, due to failure to thrive. No genetic diagnosis was established at the time and she reevaluated referred at age 21 months. is a now 7 years old girl born to consanguineous parents of Moroccan origin without a relevant familial history The pregnancy was established by *in vitro* fertilization and marked by intrauterine growth retardation. On prenatal ultrasounds, polyhydramnios, ventricular septal defect (VSD) and echogeneic bowels were noted. She was born at term, at 38 weeks + 1 day, birth weight was 2635 grams (-2 SDS), Apgar 8/9/9. Postnatally, the VSD was confirmed and in addition, absence of the gallbladder was noted. Soon after birth she developed failure to thrive, with feeding difficulties and frequent vomiting. At five months old she underwent surgery ; closure of the VSD and a patent Botalli duct. Growth and feeding difficulties remain until present with a weight and height at -3 SDS at the age of 21 months, without microcephaly. Neurological examination at 21 months was for normal except for global delay and hypotonia. Bailey Scales of Infant Development-III (BSID-III) performed at the age of 21 months showed fine motor skills equivalent to age 10 months, gross motor skills equivalent to age 9 months, cognition equivalent to age 9 months and language equivalent to age 13 months (No recognizable word). At 21 months, she can stand with support and take a few supported steps and walk fully independent but still a bit wobbly at age 3 years of age (Independent sitting at 14 months). On the other hand, she was a friendly and cheerful girl. Morphological peculiarities of the face and extremities were highlighted, as well as a sacral dimple and *nevus flammeus* in neck and lower back (**Supplementary Table 3**). At last follow-up at 5 years of age, she was attending half days of regular schooling with additional individual support. Language had improved and she spoke several words but no full sentences. She was a sociable girl who despite her language delay made friends at school. Due to recurrent lower airway infections, her paediatrician had prescribed antibiotic prophylaxis. Her height was at -2 SDS. During the etiological work-up, the brain MRI showed a thin corpus callosum with enlarged brain ventricles and mild hypoplasia of the brainstem and cerebellum. A molecular cytogenetic examination (SNP array) was performed and came back without any particularity. Metabolic examinations in plasma and

urine were normal too. Finally, a whole-exome sequencing from blood leukocytes revealed a homozygous variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.226A>T; p.Lys76*). The *trio* analysis showed that each of them was a healthy carrier for one of the variants. Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patients G.II.3 and G.II.4 (Family G)(Karaca et al., 2015): They are two sisters from a related couple of Caucasian origin (6 other siblings in good health). In the family history, we note the death of 2 other siblings, of unknown sex and etiology. Pregnancies and deliveries were not followed up, so antenatal data and birth parameters are not available (at first sight, birth weight normal according to the mother). Patient G.II.4 would have presented with neonatal respiratory distress. Concerning patient G.II.3, the clinical examination performed at the age of 22 years showed a growth retardation at -3 SDS for height and -1.5 SDS for weight, with a microcephaly at -2.5 SDS. This patient presented a severe psychomotor developmental delay with walking acquired at the age of 7 years, in a context of generalized hypotonia with muscular weakness and wide-based gait. From a cognitive point of view, an intellectual disability was evaluated as being at least severe (no recognizable words at the age of 22 years), in a context of behavioral disorders with agitation and self-mutilation. In addition, she presented with epilepsy (details of type and frequency not available). The clinical examination also revealed morphological abnormalities of the face and extremities (**Supplementary Table 3**) as well as marked hirsutism with patch of hypertrichosis. Patient G.II.4 also had postnatal growth retardation with, at age 13 years, a height of -4 SDS, a weight of -2.7 SDS and microcephaly of -4 SDS. Patient G.II.4 also presented a delay in motor acquisitions with autonomous walking obtained at the age of 2 years, also in a context of hypotonia with muscle weakness and wide-based gait. She also had a severe intellectual disability with self-mutilations (absence of recognizable words at the age of 13 years). There were also facial and extremity features, broadly similar to her sister (patient G.II.3), as well as a glabellar angioma (**Supplementary Table 3**). Patient G.II.3 also presented with epilepsy (unspecified). Brain MRI in each sister showed hypoplasia of corpus callosum with mild cerebellar atrophy. From an etiological point of view, a whole-exome sequencing from blood leukocytes was performed and revealed a homozygous variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c. 1070G>A; p.Arg357His). Segregation by SANGER sequencing in the parents showed that each of them was a healthy carrier for one of the variants. Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patient H.II.3 (Family H)(Kahrizi et al., 2019): Is the child of a related couple of Iranian origin. He has a healthy brother and sister. The rest of the family history is not available. Born at term with a weight of 3200 grams (0 SDS) and normocephaly. Clinical examination at age 36 did not reveal any growth abnormality. He presented a slight delay in motor acquisitions with walking acquired at the age of 20 months. The first words were pronounced in time, around 15 months, with however the development of learning difficulties leading to the diagnosis of mild intellectual disability (IQ at 65). He also presented a single epileptic seizure, of the tonic-clonic type at the age of 20 months. Some morphological features of the face and extremities were also noted (**Supplementary Table 3**). However, the patient did not benefit from any imaging exploration (brain MRI, X-ray of the spine, cardiac ultrasound...). From an etiological point of view, a whole-exome sequencing from blood leukocytes was performed and revealed a homozygous variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.161-1G>C; p.?). The trio analysis

showed that each of them was a healthy carrier for one of the variants. Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patient I.II.3 (Family I): Is the third child of a related couple of Caucasian origin. He has a healthy brother and sister. The rest of the family history is not available. The pregnancy was marked by intrauterine growth retardation and enlarged lateral ventricles. He was born at term (38 weeks of gestation) with a height and weight around -3 SDS and a head circumference in the lower limit of normal. He also rapidly presented feeding difficulties with the need for a nasogastric tube. Clinical examination at the age of 8.5 years showed a stable growth delay, around -2.5 SDS for weight and height, without microcephaly. He also presented a marked delay in psychomotor development with a sitting posture acquired at the age of 2 years, and the absence of autonomous walking at the age of 8 years (important hypotonia). A few syllables pronounced only at the age of 8 years (most likely severe intellectual disability) ; no behavioral disorder. In addition, he had cryptorchidism, recurrent episodes of pyelonephritis and scoliosis. Some morphological abnormalities of the face and extremities were also found (**Supplementary Table 3**). Brain MRI confirmed the presence of enlarged lateral ventricles. Cardiac echocardiography showed an ASD. From an etiological point of view, a solo whole-exome sequencing from blood leukocytes was performed and revealed a homozygous variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.664_665del; p.Met222Valfs*38). Segregation by SANGER sequencing in the parents showed that each of them was a healthy carrier for one of the variants. Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patient J.II.1 (Family J): Is the only child of non-consanguineous Nepali parents. The pregnancy was marked by intrauterine growth retardation. He was born at term (39 weeks + 6 days), by cesarean section in the setting of a nuchal cord circular with abnormal fetal heart rate. His birth parameters were -3 SDS for height and -2.5 SDS for weight, with a head circumference in the lower limit of normal. Clinical examination at the age of 2.5 years showed a height of -2.5 SDS with a normalized weight around -1.2 SDS, without microcephaly. Frequent vomiting with feeding difficulties justified the placement of a nasogastric tube. He evolved with a marked delay in psychomotor development with sitting at the age of 2 years and walking not acquired at the age of 29 months, in a context of hypotonia. At the age of 2.5 years, he pronounced only a few syllables. No behavioral problems. Morphological particularities of the face and extremities were also demonstrated as well as a sacral dimple and a strabismus (**Supplementary Table 3**). Cerebral-medullary MRI revealed enlarged brain ventricles and a spinal intradural cyst (L5-S1 level). Clinical examination and cardiac ultrasounds revealed a patent ductus arteriosus and a physiological pulmonary branch stenosis. From an etiological point of view, a solo whole-exome sequencing from blood leukocytes was performed and revealed a homozygous variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.87+5G>A; p.?). Segregation by SANGER sequencing in the parents showed that each of them was a healthy carrier for one of the variants. Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patient K.II.1 (Family K): Is the first child of consanguineous Turkish parents. He has a little sister with a very similar phenotype, but she could never be examined. The third child of the siblings is healthy. The pregnancy was marked by an intrauterine growth retardation. He was born prematurely at 34 weeks of gestation (neonatal respiratory distress) with a weight of

1200 grams, below the 3rd percentile. He subsequently showed good growth gain, without feeding difficulties. However, he presented a delay in psychomotor acquisitions with an autonomous walk obtained after the age of 5 years in a context of persistent hypotonia with wide-based gait and muscular weakness. There were only a few words spoken at the age of 11 years (severe intellectual disability), in a context of behavioral disorders with stereotypies and self-mutilation. Morphological particularities of the face and extremities were also demonstrated (**Supplementary Table 3**). In addition, the skin examination revealed palmoplantar hyperkeratosis like mild form of lamellar ichthyosis. During the etiological work-up, the brain MRI showed a thin corpus callosum and the cardiac ultrasounds revealed an ASD with a bicuspid aortic valve/aortic dilatation and a dilated cardiomyopathy. In addition, he had grade 1 nephropathy (unspecified) and suffered from osteopenia and scoliosis. From an etiological point of view, a postnatal karyotype was performed and came back without any particularity (46, XY). An array-CGH was also performed and was returned normal too. Finally, a solo whole-exome sequencing from blood leukocytes was performed and revealed a homozygous variant in the *CDK10* gene (NM_052988.4: c.608+1G>A; p.?). Segregation by Sanger sequencing in the parents showed that each of them was a healthy carrier for one of the variants. The younger sister with the same difficulties as him is also a carrier for both variants in the homozygous state. The last child of the siblings was tested and is not a carrier for either of the variants (wild-type status). Bioinformatics analysis strongly suspected the pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patient L.II.1 (Family L): Is the child of a very distantly related couple (family history not available). The pregnancy was marked by intrauterine growth retardation in a context of placental insufficiency with suspected pulmonary stenosis. She was born prematurely at 35 weeks + 4 days with a weight of 1558 grams (-3 SDS), a height of -4 SDS and a head circumference of -3 SDS. Examination at 23 months of age showed postnatal growth retardation with weight and height below -3 SDS, in a context of feeding issues. She also presented a delay in psychomotor development with a turn in prone position acquired only at the age of 14 months and some vocalizations emitted at the age of 18 months. It should also be noted that this patient had a stroke at the age of 18 months (occluded right internal carotid artery and M1 segment), resulting in a subsequent left-sided hemiplegia. Morphological features of the face were also noted (**Supplementary Table 3**). She also presented a torticollis with a right convex thoracic scoliosis (30° Cobb) and a strabismus. The cardiac ultrasound showed an ASD with a double outlet right ventricle/VSD (Ventricular Septal Defect) with pulmonary stenosis and coronary anomaly. Brain MRI was unremarkable. In this context, a single whole-exome sequencing from blood leukocytes was performed and revealed a homozygous variant in the *CDK10* gene (NM_052988.5: c.25G>C; p.Glu9Gln). The familial segregation is still in progress. Bioinformatics analysis suspected a potential pathogenicity of this variant (**Supplementary Table 2**).

Patient M.II.5 (Family M): (Windpassinger et al., 2017) for clinical and molecular details.

	Windpassinger et al,. 2017	*Windpassinger et al.,* 2017	*Windpassinger et al.,* 2017
Demographic data			
Years of Birth	2 individuals : 1997 and 2022	2013	2008, 2010 and 2013
Sex	M	F	3 individuals : 1 F and 2 M
Ancestry	Tunisian	Saudi Arabian	Kurdish (from Turkey)
Consanguinity	+	+	+
Genetic data of the CDK10 variations			
Genomic position (hg19)	Chr16:g.[89760580G>A];[89760580G>A]	Chr16:g.[89755711delG];[89755711delG]	Chr16:g.[89759876G>A];[89759876G>A]
cDNA level (NM_052988.4)	c.[609-1G>A];[609-1G>A]	c.[139delG];[139delG]	c.[608+1G>A];[608+1G>A]
Protein level	According to the functional analyses, no protein	p.[(Glu47Argfs*21)];[(Glu47Argfs*21)]	According to the functional analyses, no protein
Variations type	Splicing variant	Frameshift	Splicing variant

	Windpassinger et al., 2017	*Guen et al.,* 2017
Demographic data		
Years of Birth	2008	NA
Sex	M	F
Ancestry	Turkish	Shkenazi-Jewish
Consanguinity	-	-
Genetic data of the CDK10 variations		
Genomic position (hg19)	Chr16:g.[89759876G>A];[89759876G>A]	Chr16:g.[89761416_89761417del];[89761416_89761417del]
cDNA level (NM_052988.4)	c.[608+1G>A];[608+1G>A]	c.[870_871del];[870_871del]
Protein level	According to the functional analyses, no protein	p.[(Trp291Alafs*18)];[(Trp291Alafs*18)]
Variations type	Splicing variant	Frameshift

F: Female ; M : Male ; NA : Not Available

Supplementary Table 1: Review of the literature. Demographic and genetic data of eight individuals from five distinct families previously reported with biallelic variations in the *CDK10* gene. Please note : Individuals from the papers *(Darcha et al., 2021)*-*(Karaca et al., 2015)*-*(Kahrizi et al., 2019)*-*(Windpassinger et al., 2017)* are included in our cohort

cDNA (c.)	Protein (p.)	Type	Segregation	gnomAD	PPH2	SIFT	MT	SSF	MES	NSS	Clinvar/HGMD	Reference
c.24C>A	**p.Cys8***	**Nonsense**	Y	0							RCV001281658.1 Likely pathogenic	This study
c.25G>C	**p.Glu9Gln**	**Missense**	NA	0.0000579	B	T	B	ND	ND	ND		This study
c.87+5G>A	**p.?**	**Splice**	Y	0				ND	-100% DS	ND		This study
c.(87+1_88-1)_(232+1_233-1)del (Exons 2-3)	p.?	CNV	Y								RCV000509000.3 Pathogenic	(Windpassinger et al., 2017)
c.139delG	p.Glu47Argfs*21	Frameshift	Y	0							RCV000509002.1 Pathogenic	(Windpassinger et al., 2017)
c.161-1G>C	p.?	Splice	Y	0				-100% AS	-100% AS	-100% AS		(Kahrizi et al., 2019)
c.226A>T	**p.Lys76***	**Nonsense**	NA	0								This study
c.452T>C	p.Leu151Pro	Missense	Y	0	B	D	D	-100% NCAS	+60% NCAS	ND		(Darcha et al., 2021)
c.461T>C	**p.Leu154Pro**	**Missense**	Y	0	PD	D	D	ND	ND	ND		This study
c.503del	**p.Asn168Thrfs*4**	**Frameshift**	Y	0								This study
c.608+1G>A	p.0	Splice	Y	0.00000398				-100% DS	-100% DS	-100% DS		(Windpassinger et al., 2017), This study
c.609-1G>A	p.0	Splice	Y	0.0000283				-100% AS +100% NCAS +100% NCDS	-100% AS +100% NCAS	-100% AS +100% NCDS		(Windpassinger et al., 2017)
c.628_630del	**p.Leu211del**	**Indel**	Y	0.0000159	NA	D (SC 0.894)	NA	ND	ND	ND		This study
c.664_665del	**p.Met222Valfs*38**	**Frameshift**	Y	0.0000279								This study
c.792G>A	**p.Pro264=**	**Synonymous**	NA	0	ND	ND	ND	-100% DS	-100% DS	ND		This study
c.870_871del	p.Trp291Alafs*18	Frameshift	Y	0.000128							RCV001658236.2 RCV001526542.1 Pathogenic	(Guen et al., 2018)
c.1070G>A	p.Arg357His	Missense	Y	0.0000091	PD	D	D	ND	ND	ND	RCV000454330.1 Likely pathogenic	(Karaca et al., 2015)
16q24.3 (89644771_89869764)x1 (Entire gene)	p.0?	CNV	Y									(Darcha et al., 2021)
16q24.3 (89693099_89900237)x1 (Entire gene)	**p.0?**	**CNV**	Y									This study

Supplementary Table 2: Bioinformatics predictions of the variants of *CDK10* (NM_052988.4). Novel variations are indicated in **bold.** All variants (previously reported and those of this study) were (re)evaluated from a bioinformatics point of view including their presence or not in general population databases (e.g. gnomAD, 1000 Genomes) and in known pathogenic variant databases (HGMD*(Stenson et al., 2003)* ; ClinVar*(Landrum et al., 2018)*) ; The gnomAD frequency reported is the highest in any population in this database ; For missenses the evaluation of conservation during evolution (multiple alignment, PolyPhen-2, SIFT, Mutation Taster*(Kumar et al., 2009; Schwarz et al., 2010)* and physicochemical changes); The evaluation for effects on splicing was performed for synonymous, missense and intronic variants (MaxEntScan, NNSplice and Splice Site Finder*(Shapiro and Senapathy, 1987; Yeo and Burge, 2004)*) ; Non frameshifting indel has been assessed by the specific module from SIFT*(Kumar et al., 2009)*. AS: Acceptor Site, B: Benign, D: deleterious or affects protein function, DS : Donor Site, MES: MaxEntScan, MT: Mutation Tester, N: Not,

NA: Not Available, NCAS: Non Consensus Acceptor Site, NCDS: Non Consensus Donnor Site, NSS: NNSplice, ND: No Difference, PD: Probably Damaging, PPH2: PolyPhen-2, SC: Score Confidence, SSF: Splice Site Finder, T: Tolerated, Y: Yes

	Family A	Family B	Family C	Family D (*Darcha et al., 2021*)	Family E	Family F	Family G (*Karaca et al., 2015*)		Family H (*Kahrizi et al., 2019*)	Family I	Family J	Family K	Family L	Family M (*Windpassinger et al., 2017*)	
Individual ID	**A.II.2**	**B.II.3**	**C.II.1**	**D.II.1**	**E.II.4**	**F.II.1**	**G.II.3**	**G.II.4**	**H.II.3**	**I.II.3**	**J.II.1**	**K.II.1**	**L.II.1**	**M.II.4**	**M.II.5**
Demographic and genetic data															
Year of Birth	2018	2011	2000	Death at 3.5 months	Fetus (MA at 19 + 3 WG)	NA	1991	2000	1978	2009	2019	2006	2019	2009	2011
Sex	F	M	M	M	M	F	F	F	M	M	M	M	F	M	M
Ancestry	Caucasian	Maghreb	Algerian	Caucasian	Caucasian	Moroccan	Caucasian	Caucasian	Iranian	Caucasian	South Asian	Caucasian	NA	Algerian	Algerian
cDNA level (NM_052988.4)	c.[461T>C];[628_630del]	c.[24C>A];[24C>A]	c.[792G>A];[792G>A]	c.452T>C arr16q24.3(89644771_89869764)x1	c.503del arr16q24.3(89693099_89900237)x1	c.[226A>T];[226A>T]	c.[1070G>A];[1070G>A]		c.[161-1G>C];[161-1G>C]	c.[664_665del];[664_665del]	c.[87+5G>A];[87+5G>A]	c.[608+1G>A];[608+1G>A]	c.[25G>C];[25G>C]	c.[(87+1_88-1)_(232+1_233-1)del];[(87+1_88-1)_(232+1_233-1)del]	
Protein level	p.[(Leu154Pro)];[(Leu211del)]	p.[(Cys8*)];[(Cys8*)]	p.[(Pro264=)];[(Pro264=)]	p.[(Leu151Pro)];[(0?)]	p.[(Asn168Thrfs*4)];[(0?)]	p.[(Lys76*)];[(Lys76*)]	p.[(Arg357His)];[(Arg357His)]		p.?	p.[(Met222Valfs*38)];[(Met222Valfs*38)]	p.?	p.?	p.[(Glu9Gln)];[(Glu9Gln)]	p.[(Leu30Alafs*24)] ;[(Leu30Alafs*24)}	
Inheritance	[pat];[mat]	[mat];[pat]	NA	[mat];[pat]	[mat];[pat]	[mat];[pat]	[mat];[pat]		[mat];[pat]	[mat];[pat]	[mat];[pat]	[mat];[pat]	NA	[mat];[pat]	
Mutation type	Inframe indel, Missense	Nonsense	Synonymous	Missense, 225kb deletion	Frameshift, 207kb deletion	Nonsense	Missense		Splicing variant	Frameshift	Splicing variant	Splicing variant	Missense	Exons 2-3 deletion	
Consanguinity	-	+	+	-	-	NA	+	+	+	+	-	+ (1st degree)	+ (very distantly related ; AOH : 25 Mb)	+	+
Pregnancy															
IUGR	Moderate IUGR	-	-	+ (5th centile)	-	+	NA	NA	-	+	+	+	+	+	-
Prenatal Features	Enlarged lateral ventricles	-	-	Multicystic dysplastic left kidney, Partial corpus callosum agenesis, Enlarged left lateral brain ventricle, Colpocephaly	Multicystic dysplastic left kidney, Enlarged brain ventricles	Polyhydramnios, VSD, Echogenic bowels	NA	NA	NA	Enlarged lateral ventricles	-	-	Suspected pulmonary stenosis	-	-
Other				Delivery: Abnormal fetal heart rate	Oligoamnios, Fetal hypokinesia	MAP (IVF)					Delivery (C-section at term), Abnormal fetal heart rate (nuchal cord)		Placental insufficiency		
Birth Parameters/Growth Parameters															
**Term at delivery	37 + 3	40	41	38 + 6	19 + 3 WG	38 + 1	NA (at term)	NA (at term)	NA (at term)	38	39 + 6	34	35 + 4	NA	NA
Birth Weight *(SD)*	2.110 kg (-3)	3.690 kg (+0.5)	3.060 kg (-0.8)	2.590 kg (-2)	247 g *(50th percentile)*	2.635 kg (-2)	Normal (according to mother)	Normal (according to mother)	3.200 kg *(0)*	2.300 kg (-3)	2.315 kg (-3)	1.200 kg *(<3rd percentile)*	1.558 kg (-3)	NA	NA
Birth Height *(SD)*	44 cm (-3)	53 cm (+1.5)	47.5 cm (-1.5)	45 cm (-2.5)	23.5 cm *(5-50th percentile)*	NA	NA	NA	NA	46 cm (-2.5)	44 cm (-2.5)	NA	40.5 cm (-4)	NA	NA
Birth OFC *(SD)*	33 cm (-2)	37 cm (+1)	34 cm (-1)	34 cm (-1)	16.5 cm *(50th percentile)*	NA	NA	NA	NA (normocephalic)	32.5 cm (-1.5)	32 cm (-1.5)	NA	31 cm (-3)	NA	NA
***Physical Examination**															
Age	26 Mo	9 Yo 1 Mo	17 Yo	3.5 Mo	WO	21 Mo	22 Yo	13 Yo	36 Yo	8 Yo 5 Mo	2 Yo 5 Mo	11 Yo	23 Mo	7 Yo 8Mo	4 Yo 4Mo
Height *(SD)*	72.5 cm (-5)	134.5 cm *(0)*	172 cm (-0.5)	56 cm (+1)	WO	74.7 cm (-3.2)	145 cm (-3)	125 cm (-4)	176 cm	113 cm (-2.5)	79 cm (-2.5)	149 cm (+0.5)	76 cm (-3.2)	111.8 cm *(-2.5)*	96 cm *(-3)*
Weight *(SD)*	7.375 kg (-5)	29 kg (+0.5)	58.5 kg (-1)	4.363 kg (+0.2)	WO	8.800 kg (-3)	40 kg (-2.5)	28 kg (-2.7)	NA	19.3 kg (-2.5)	11.4 kg (-1.2)	30 kg (-1.2)	7.5 kg *(< - 3)*	16.2 kg *(-2.9)*	12.3 kg *(-3.2)*
OFC *(SD)*	45.5 cm (-2.5)	52.5 cm (-0.5)	56 cm (+4.5)	38.5 cm (-2)	WO	46.5 cm (-1)	52 cm (-2.5)	49 cm (-4)	57.2 cm (+1.8)	52 cm (-1)	47.5 cm (-1)	NA	NA	51.5 cm *(-0.8)*	49 cm *(-2)*
Feeding issues	+	-	-	-	WO	+	oral	oral	-	+	+	-	+	-	-
Nasogastric tube/Gastrostomy	+									+	+		-		
Gastroesophageal reflux	-	-	-	+	WO	Frequent vomiting	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Constipation	+	-	-	-	WO	NA	NA	NA	-	-	-	-	-	-	-
Developpemental Stages															
Delayed motor developpement/Age of sitting-walking (months)	+ No walking (26 Mo)	- Walking : 16 Mo	- Sitting : 8.5 Mo Walking : 16 Mo	NA	WO	+ Sitting at 14 Mo No independent walking (21 Mo)	+ Walking : 7 Yo	+ Walking : 2 Yo	+ Walking : 20 Mo	+ Sitting : 2 Yo No walking	+ Sitting : 2 Yo No independent walking (29 Mo)	+ Walking : After 5 Yo	+ (Turning in prone position at the age of 14 Mo)	+ Sitting : 18 Mo Walking : 30 Mo	+ Sitting : 18 Mo Walking : 48 Mo
Delayed speech developpement/Langage skills	+ Some words (26 Mo)	+ Association words (7.5 Yo)	+ First words : 3 Yo	NA	WO	+ No words (21 Mo)	+ No words	+ No words	- First words : 15 Mo	+ Few syllabes	+ Few syllabes	+ Some words	+ Some vocalizes (18 Mo)	+ 7 Yo : Two words combinaison, no sentence	+ No words
Learning disorders/ID	ND	+	+ (mild)	NA	WO	+	+ (severe)	+ (severe)	+ (mild)	+	NA	+ (severe)	ND	+ (moderate to severe)	+ (moderate to severe)
Behavioural abnormality/hyperactivity	-	+	-	NA	WO	-	+ (Agitation/self-mutilation)	+ (Self-mutilation)	-	-	-	+ (Stereotypy/self-mutilation)	-	NA	NA
Dysmorphic Features															
Brachycephaly	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	+	NA	-	-
Triangular face	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
High forehead	+	+	-	-	+	NA	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Downslanted palpebral fissures	+ (Mild)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Telecanthus	+	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Hypertelorism	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Bilateral epicanthus	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Bilateral ptosis	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Synophrys	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Depressed nasal bridge	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
Broad nasal tip	+	+	+	-	-	NA	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Congenital nasal pyriform, aperture stenosis	-	-	-	+	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malar hypoplasia	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Long philtrum	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Thin upper lip	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Microstomia	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Small/pointed chin	+	-	-	-	-	NA	+	+	-	-	+	+ (Pointed)	+	+	+
Low-set ears	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Posteriorly rotated ears	+	+	+	+	+	NA	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Abnormally shaped ears	+	-	+	+	+	+ (Overfolding helices)	+	+	-	-	-	+	NA	-	-
Macrodontia	-	-	-	NA	WO	-	-	-	-	-	-	+	NA	-	-
Solitary median maxillary central incisor	-	-	-	+	WO	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-
High arched palate	-	-	+	+	-	NA	+	+	-	-	-	+	NA	-	-
Other/Free description		Retrognathia, Supernumary nipple, Dolicocephaly		Bulging forehead, Hypotelorism, Retrognathia	Short nose with anteverted nares, Prominent nasolabial fold, Retrognathia	Round face, Broad and highly arched eyebrows, Shallow orbital ridges, Uplsanted palpebral fissures, Long eyelashed, Upper eyelids eversion, Low nasal bridge, Widely spaced small teeth	Hirsutism		Thick eyebrows, Large ears, Prognathism, Thin lower lip, Temporal narrowness	Posterior plagiocephaly, Almond-shaped palpebral fissure, Short and flattened nose	Posterior plagiocephaly, Almond-shaped palpebral fissure, Esodeviation		Unilateral ptosis		
Limb/Extremities															
Rhizomelic shortening of the arms	-	-	-	+	-	NA	-	-	-	-	-	-	NA	-	-

Small hands	+	-	+	-	-	NA	+	+	-	-	-	-	NA	+	+	
Deep palmar creases	-	+ and plantar	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	NA	+	+	
Single transverse palmar crease	+	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	
Clinodactyly of 5th finger	+	+	-	-	-	NA	+	-	-	-	-	+	NA	-	-	
Pes planus	+	-	-	ND	WO	NA	+	-	-	-	-	+	NA	-	-	
Broad halluces/dystrophic toenails	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	+	NA	-	-	
Overlapping toes	-	+	-	+	-	NA	-	-	+ (4th and 5th toes)	-	+	-	NA	-	-	
Joints hyperextensibility/hyperlaxity	-	-	+	ND	WO	NA	-	-	-	-	+	-	NA	-	-	
Other			Unilateral 2-3 toe syndactyly		Right hand radial deviation,Fingers unilateral flexion contracture (right hand), Unilateral 2-3-4-5 fingers syndactyly (membranous), Bilateral talus feet, Equinovarus deformity of left foot (sketch)	Dimples shoulders and elbows, Supernumerary flexion creases on the fingers, Thumbs limited movement, Abnormality of the palmar reases ("Hockey stick")			Abnormal metatarsal morphology (shortening metatarsal)	Tapered fingers	Supernumerary flexion creases on the fingers					
Neurologic/Muscular																
Seizure	-	-	-	ND	WO	NA	+	+	+ (one tonic-clonic seizure at 20 Mo)	-	-	-	-	+ (2 seizures at day 4)	-	
Hypotonia	+	+	-	-	WO	+	+	+	-	+	+	+	- (apart from hemiplegia)	+	+	
Wide based gait/gait difficulties	-	-	-	ND	WO	NA	+	+	-	-	NA	+	NA	+	+	
Muscular Weakness	-	-	-	ND	WO	NA	+	+	-	-	-	+	- (apart from hemiplegia)	-	-	
Other													18 Mo : stroke (occluded right internal carotid artery and M1 segment; subsequent left-sided hemiplegia)			
Brain MRI																
Thin corpus callosum	+	+	-	+	+	+	+	+	NA	-	-	+	-	-	-	
Absence of the septum pellucidum	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	
Enlarged cerebral ventricles/ colpocephaly	+	-	-	+	+	+	-	-	NA	+	+	-	-	-	-	
Paucity of cerebral white matter	-	-	-	-	WO	+	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	
Other				Agenesis of CC (rudimentary anterior part, no posterior)	Partial agenesis of CC (no posterior part)	Hypoplasia of the brainstem and cerebellum	Corpus callosum hypoplasia, Mild cerebellar atrophy	Corpus callosum hypoplasia, Mild cerebellar atrophy								
Cardiovascular																
ASD	+	-	+	-	-	NA	-	-	NA	+	-	+	+	-	+	
Left ventricular noncompaction	-	-	-	+	-	NA	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	
Patent ductus arteriosus	-	-	-	-	WO	NA	-	-	NA	-	+	-	-	-	-	
Other		Septal hypertrophy at birth but normal after control				VSD						Bicuspid aortic valve/Aortic dilatation/dilated cardiomyopathy	Double outlet right ventricle/VSD/pulmonary stenosis/coronary anomaly		Pulmonary artery stenosis	
Pulmonary																
Neonatal respiratory distress	-	-	-	+	WO	NA	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
Lower respiratory tract infections/Reactive airway	-	-	+ (Severe bronchiolitis)	Acute respiratory distress (milk aspiration)	WO	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Abdominal/Renal																
Multicystic/dysplastic kidney	-	-	-	+	+ (Left multicystic)	NA	-	-	NA	-	-	-	ND	-	-	
Bilateral nephrocalcinosis	-	-	-	-	-	NA	-	-	NA	-	-	-	ND	-	-	
Other		Possible abnormal, mesenteric+coeliac vessels	Inguinal hernia, Rectal prolapse			Absence of gallbladder				Recurrent pyelonephritis	One episode of pyelonephritis	Grade 1 nephopathy				
Spine Abnormalities																
Type of radiology exam	Spinal X-rays	Spinal X-rays	Spinal X-rays	Spinal X-rays	Spinal X-rays	NA	NA	NA	NA	NA	Spinal X-rays	Spinal X-rays	Spinal X-rays	3D reconstruction CT	NA	
Spinal segmentation defects	+	-	+	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	+ (multilayered)	NA	
C1 anterior clefting	NA	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	+	NA	
C2-C3 fusion	+	-	+	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	+	NA	
Sacral clefting	NA	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	+ (S2-S5)	NA	
Hemivertebrae fusion	NA	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	+ (Th4 with posterior processes of Th3 and Th5)	NA	
Underdeveloped vertebral bodies	NA	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	-	NA	
Torticollis	-	-	-	-	-	NA	NA	NA	-	-	-	-	-	-	NA	
Sacral dimple	+	-	-	+	-	+	NA	NA	-	-	+	-	NA	+	+	
Other		Pelvic bone asymmetry	Apical intrathoracic rib	C3-C4 fusion						Scoliosis	Spinal intradural cyst (L5-S1 level)	Osteopenia, Scoliosis	Right convex thoracic scoliosis (30° Cobb)			
Sensorineuronal																
Deafness - Audition test	-	-	-	ND	WO	NA	NA	NA	-	NA	-	-	-	-	-	
Recurrent infections	-	ND	+ in infancy	ND	WO	NA	NA	NA	-	-	-	-	-	-	-	
Retinitis Pigmentosa	-	ND	-	ND	WO	-	NA	NA	NA	-	-	-	-	-	-	
Strabismus	+	-	-	-	WO	-	NA	NA	-	-	+	-	+	-	-	
Other	Astigmatism	Myopia		Grayish discoloration of the optic disc		Normal ophtalmological examination										
Cutaneous																
Nevus flammeus/glabellar angioma	+	+	-	-	WO	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	
Malar rash	-	-	-	-	WO	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hyperextensible skin	-	-	-	ND	WO	NA	-	-	-	-	-	-	NA	-	-	
Palmoplantar hyperkeratosis	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	+ (mild lamellar ichthyosis)	-	-	-	
Patch of hypertrichosis	-	-	-	-	-	NA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	

Peripheral vasomotor disturbance	-	-	-	ND	WO	NA	NA	NA	-	-	-	-	NA	-	-
Other skin tag	Lower back angiomas, Paravertebral macules	-	-	Perianal skin tag	WO	Nevus flammeus (neck + lower back)	-	-	-	-	-	-	-		
Other	Eczema														
Other Features															
Diastasis with prominent umbilicus	-	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cryptorchidism	WO	-	-	-	-	WO	WO	WO	-	+	-	-	WO	-	-
Shawl scrotum	WO	-	-	-	-	WO	WO	WO	-	-	-	-	WO	-	-
Congenital hypothyroidism	-	-	-	-	WO	NA	-	-	NA	-	-	-	-	ND	ND
Abnormal hair patterning	+ (Thin hair)	-	-	ND	WO	NA	Hirsutism	-	-	-	-	-	-	-	-

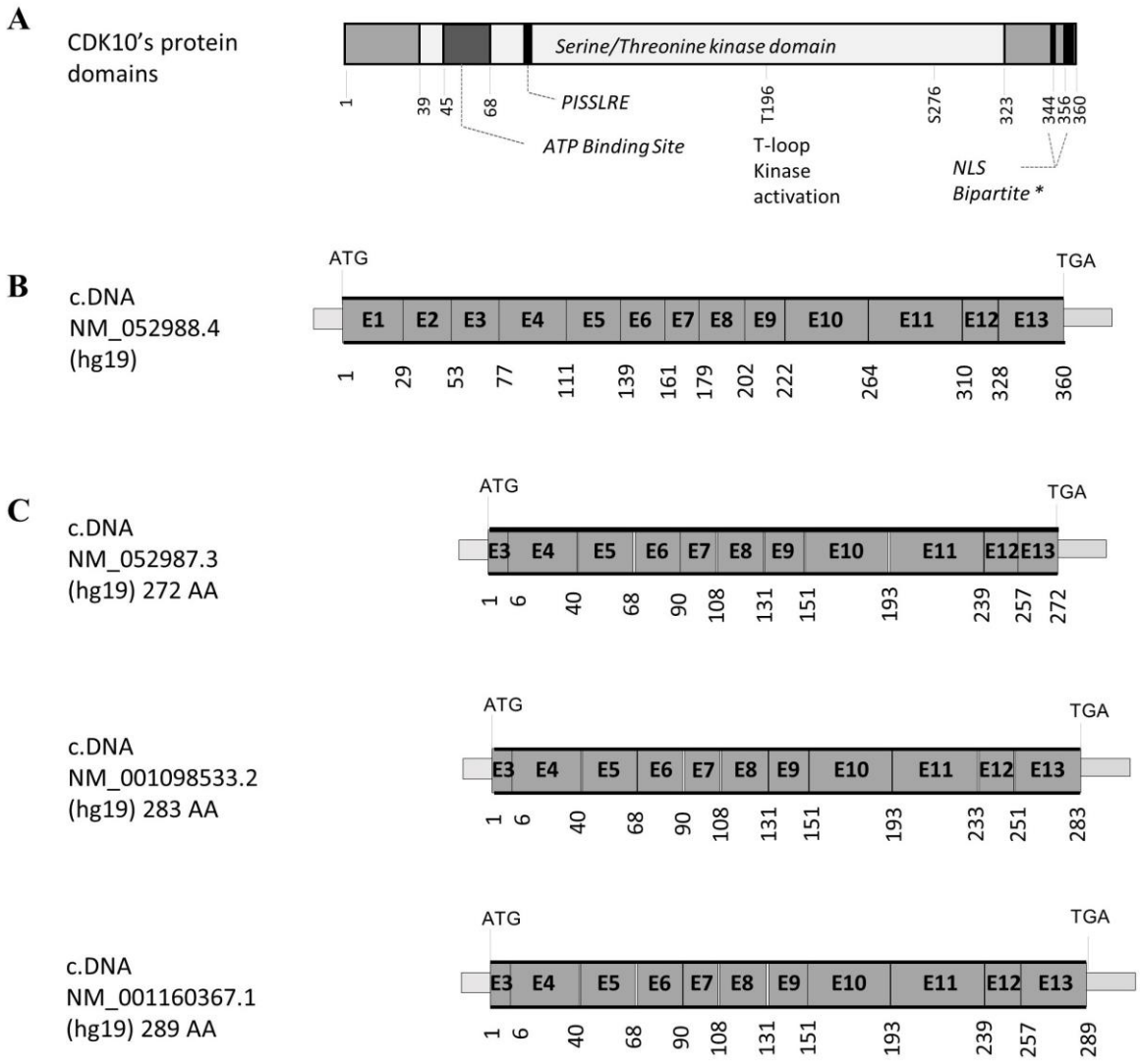
Supplementary Table 3: Phenotype and genotype data of fifteen individuals with *CDK10* variations

** Term at delivery, ***At last examination, Abbreviations : ASD: Atrial Septal Defect; CC: Corpus Callosum; F: Female; ID: Intellectual Disability; IUGR: Intra Uterine Growth Retardation; IVF: In Vitro Fertilization; M: Male; MA: Medical Abortion; MAP: Medically Assisted Procreation; mat: maternal; Mo: Months old; NA: Not Available; ND: Not Determined; OFC: Occipito-Frontal Circumference; pat: paternal; SD: Standard Deviations; VSD: Ventricular Septal defect; WG: Weeks of Gestation; WO: Without Object; Yo: Years old

RT-qPCR primers				
Name	**Forward (5'-3')**	**Name**	**Reverse (5'-3')**	**Size (pb)**
hCDK10e4F	GCCTGCGTCATCCGAACAT	hCDK10e5R	AGGGTGTTGGCATATTCTCCAG	129
hGAPDHe4-5F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	hGAPDHe6R	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197
RT-PCR primers				
Name	**Forward (5'-3')**	**Name**	**Reverse (5'-3')**	**Size (pb)**
hCDK10e7F	CCAACTTGCTCATGACCGAC	hCDK10e12-13R	TCACAGGGTAGGGGCTTCT	493
hCDK10e1F	ATCTGGAGTGCGAGCAGATC	hCDK10e5bisR	GCTCACAGTAACCCATCACC	351
hCDK10e4bisF	AACATCGTGGAGCTGAAGGA	hCDK10e13R	TCAGGGTTTACAGCGCTTG	795
hCDK10e5F	GGTGATGGGTTACTGTGAGC	hCDK10e7-8R	CGAAATCCGCTGTCTTCACA	203
Mutagenesis oligonucleotides				
Name	**Forward (5'-3')**	**Name**	**Reverse (5'-3')**	
CDK10.Glu9Gln_fwd	CAGATCTGGAGTGCCAGCAGATCCGTCTG	CDK10.Glu9Gln_rev	CAGACGGATCTGCTGGCACTCCAGATCTG	
CDK10.Leu151Pro_fwd	GTGCTCCGGGGCCCCCAGTATCTGCAC	CDK10.Leu151Pro_rev	GTGCAGATACTGGGGGCCCCGGAGCAC	
CDK10.Leu154Pro_fwd	GGGGCCTCCAGTATCCGCACAGGAACTTCAT	CDK10.Leu154Pro_rev	ATGAAGTTCCTGTGCGGATACTGGAGGCCCC	
CDK10.Leu211del_fwd	GAGCCCCTGAACTGTTGGGAACCACCAC	CDK10.Leu211del_rev	GTGGTGGTTCCCAACAGTTCAGGGGCTC	
CDK10.Arg357His_fwd	GGGCCAGAGCAAGCACTGTAAACCCTGAC	CDK10.Arg357His_rev	GTCAGGGTTTACAGTGCTTGCTCTGGCCC	
Cloning oligonucleotides				
Name		**Sequence**		
CDK10.N (EcoRI)		ATATGAATTCATGGCGGAGCCAGATCTGGAG		
CDK10.C (NsiI)		ATATATGCATTCAGGGTTTACAGCGCTTGC		
CDK10.Arg357His.C (NsiI)		ATATATGCATTCAGGGTTTACAGTGCTTGC		
Plasmids				
Name	**Nucleotide substitution**		**Amino acid change**	
eGFP	/		/	
pCMV.Tag3B *	/		/	
Myc-CDK10.WT *	/		/	
E9Q *	c.25G>C		p.Glu9Gln	
L151P *	c.452T>C		p.Leu151P	
L154P *	c.461T>C		p.Leu154P	
L211del *	c.628_630del		p.Leu211del	
R357H *	c.1070G>A		p.Arg357His	
ΔNLS *	c.[(1066A>G);(1067A>C)];[(1069C>G);(1070G>C)]		p.[(Lys356Ala)];[(Arg357Ala)]	

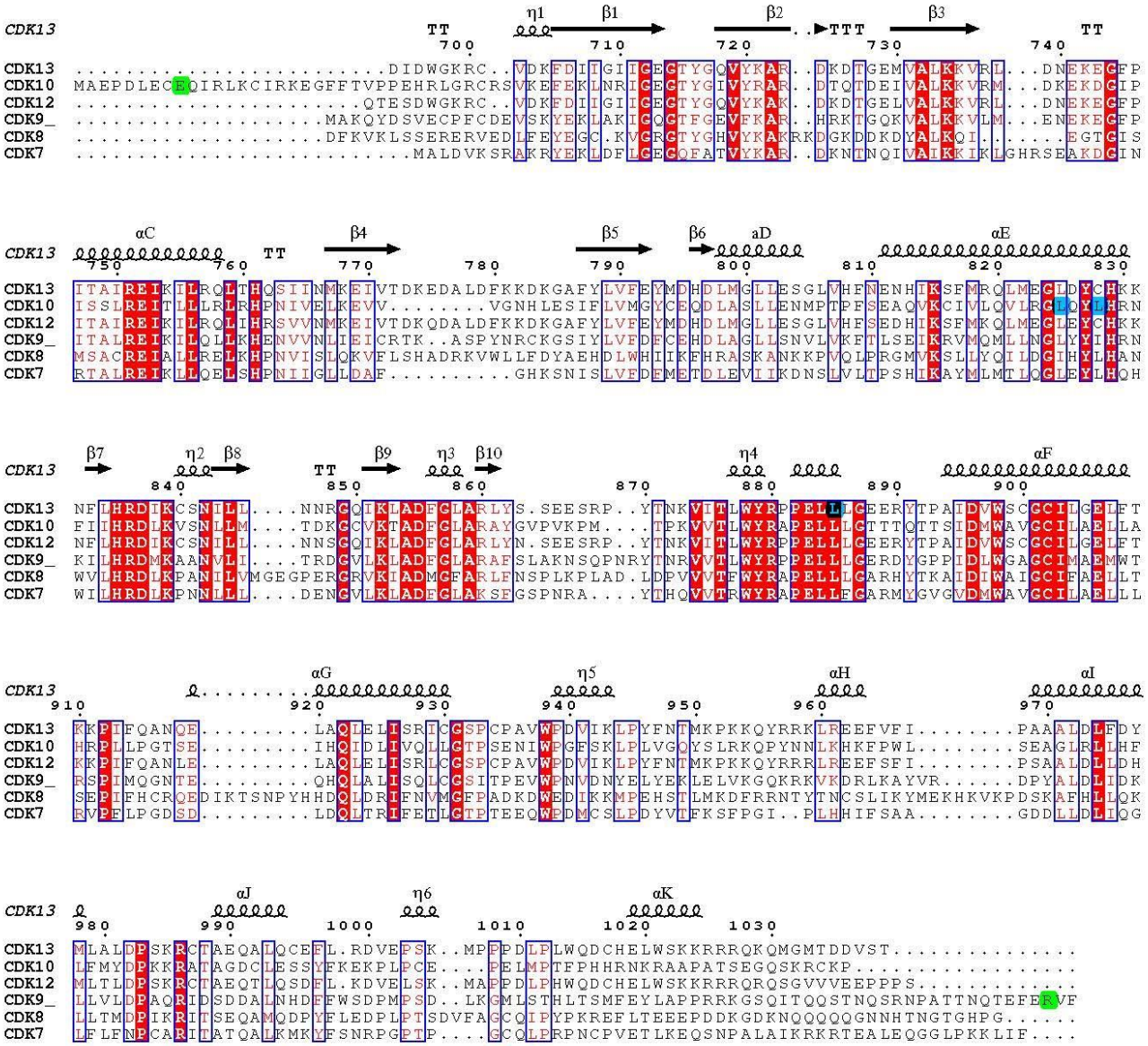
* tag Myc ; CMV promotor

Supplementary Table 4 : List of primers and plasmids used in this study.



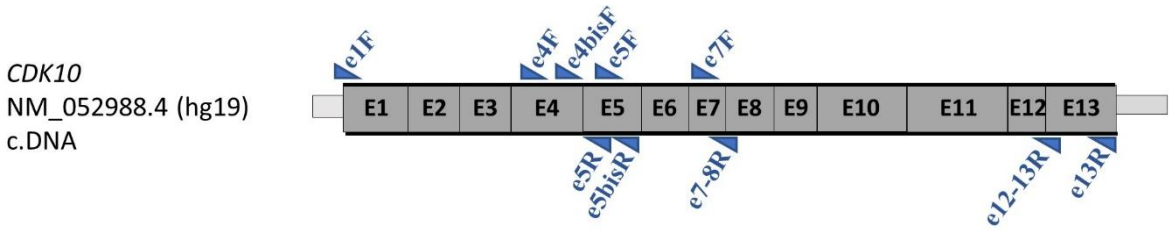
Supplementary Figure 1: CDK10 Protein's domains and alternative transcripts

A. CDK10's protein domains **B**. cDNA of the *CDK10* gene **C**. Other possible transcripts of *CDK10* from alternative splicing (NM_052988.4 (hg19))



Supplementary Figure 2: Sequence alignment of transcriptional CDKs with CDK13 secondary structure annotations

Sequences were aligned using Multalin v.5.4.1(Corpet, 1988). Experimentally-determined CDK13 secondary structural elements (UniProt: Q14004) were added using Espript v.3.0(Robert and Gouet, 2014). The aminoacids substituted in the missense variations are highlighted in green (Glu9, Arg357) or in blue (Leu151, Leu154, Leu210).



Supplementary Figure 3: Primers position relative to the *CDK10* cDNA

SUPPLEMENTARY REFERENCES

Bainbridge, M.N., Hu, H., Muzny, D.M., Musante, L., Lupski, J.R., Graham, B.H., Chen, W., Gripp, K.W., Jenny, K., Wienker, T.F., Yang, Y., Sutton, V.R., Gibbs, R.A., Ropers, H.H., 2013. De novo truncating mutations in ASXL3 are associated with a novel clinical phenotype with similarities to Bohring-Opitz syndrome. Genome Med. 5, 11. https://doi.org/10.1186/gm415

Challis, D., Yu, J., Evani, U.S., Jackson, A.R., Paithankar, S., Coarfa, C., Milosavljevic, A., Gibbs, R.A., Yu, F., 2012. An integrative variant analysis suite for whole exome next-generation sequencing data. BMC Bioinformatics 13, 8. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-8

Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 16, 10881–10890. https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881

Darcha, C., Laffargue, F., Boutaud, L., Gallot, D., Dauphin, C., Garcier, J.M., Achaiaa, A., Nitschke, P., Fourrage, C., Goumy, C., Attie-Bitach, T., 2021. Novel *CDK10* variants with multicystic dysplastic kidney, left ventricular non-compaction, and a solitary median maxillary central incisor. Clin. Genet. 100, 348–349. https://doi.org/10.1111/cge.13996

Ernst, R.F., Boymans, S., Roosmalen, M. van, Ligt, J. de, Janssen, R., Elferink, M., Nijman, I.J., 2017. UMCUGenetics/IAP: v2.5.0. https://doi.org/10.5281/zenodo.3744169

Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E.M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., Gabriel, S., Jaffe, D.B., Lander, E.S., Nusbaum, C., 2009. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. Nat. Biotechnol. 27, 182–189. https://doi.org/10.1038/nbt.1523

Guen, V.J., Edvardson, S., Fraenkel, N.D., Fattal-Valevski, A., Jalas, C., Anteby, I., Shaag, A., Dor, T., Gillis, D., Kerem, E., Lees, J.A., Colas, P., Elpeleg, O., 2018. A homozygous deleterious *CDK10* mutation in a patient with agenesis of corpus callosum, retinopathy, and deafness. Am. J. Med. Genet. A. 176, 92–98. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38506

Kahrizi, K., Hu, H., Hosseini, M., Kalscheuer, V.M., Fattahi, Z., Beheshtian, M., Suckow, V., Mohseni, M., Lipkowitz, B., Mehvari, S., Mehrjoo, Z., Akhtarkhavari, T., Ghaderi, Z., Rahimi, M., Arzhangi, S., Jamali, P., Falahat Chian, M., Nikuei, P., Sabbagh Kermani, F., Sadeghinia, F., Jazayeri, R., Tonekaboni, S.H., Khoshaeen, A., Habibi, H., Pourfatemi, F., Mojahedi, F., Khodaie-Ardakani, M., Najafipour, R., Wienker, T.F., Najmabadi, H., Ropers, H., 2019. Effect of inbreeding on intellectual disability revisited by trio sequencing. Clin. Genet. 95, 151–159. https://doi.org/10.1111/cge.13463

Karaca, E., Harel, T., Pehlivan, D., Jhangiani, S.N., Gambin, T., Coban Akdemir, Z., Gonzaga-Jauregui, C., Erdin, S., Bayram, Y., Campbell, I.M., Hunter, J.V., Atik, M.M., Van Esch, H., Yuan, B., Wiszniewski, W., Isikay, S., Yesil, G., Yuregir, O.O., Tug Bozdogan, S., Aslan, H., Aydin, H., Tos, T., Aksoy, A., De Vivo, D.C., Jain, P., Geckinli, B.B., Sezer, O., Gul, D., Durmaz, B., Cogulu, O., Ozkinay, F., Topcu, V., Candan, S., Cebi, A.H., Ikbal, M., Yilmaz Gulec, E., Gezdirici, A., Koparir, E., Ekici, F., Coskun, S., Cicek, S., Karaer, K., Koparir, A., Duz, M.B., Kirat, E., Fenercioglu, E., Ulucan, H., Seven, M., Guran, T., Elcioglu, N., Yildirim, M.S., Aktas, D., Alikaşifoğlu, M., Ture, M., Yakut, T., Overton, J.D., Yuksel, A., Ozen, M., Muzny, D.M., Adams, D.R., Boerwinkle, E., Chung, W.K., Gibbs, R.A., Lupski, J.R., 2015. Genes that Affect Brain Structure and Function Identified by Rare Variant Analyses of Mendelian Neurologic Disease. Neuron 88, 499–513. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.048

Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P.C., 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat. Protoc. 4, 1073–1081. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86

Landrum, M.J., Lee, J.M., Benson, M., Brown, G.R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., Holmes, J.B., Kattman, B.L., Maglott, D.R., 2018. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. Nucleic Acids Res. 46, D1062–D1067. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153

Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. Bioinformatics 25, 1754–1760. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25, 2078–2079. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352

Lupski, J.R., Gonzaga-Jauregui, C., Yang, Y., Bainbridge, M.N., Jhangiani, S., Buhay, C.J., Kovar, C.L., Wang, M., Hawes, A.C., Reid, J.G., Eng, C., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., 2013. Exome sequencing resolves apparent incidental findings and reveals further complexity of SH3TC2 variant alleles causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Genome Med. 5, 57. https://doi.org/10.1186/gm461

Robert, X., Gouet, P., 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. Nucleic Acids Res. 42, W320–W324. https://doi.org/10.1093/nar/gku316

Schwarz, J.M., Rödelsperger, C., Schuelke, M., Seelow, D., 2010. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. Nat. Methods 7, 575–576. https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575

Shapiro, M.B., Senapathy, P., 1987. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. Nucleic Acids Res. 15, 7155–7174.

Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, N.S.T., Abeysinghe, S., Krawczak, M., Cooper, D.N., 2003. Human Gene Mutation Database (HGMD ®): 2003 update: HGMD 2003 UPDATE. Hum. Mutat. 21, 577–581. https://doi.org/10.1002/humu.10212

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., Banks, E., Garimella, K.V., Altshuler, D., Gabriel, S., DePristo, M.A., 2013. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. Curr. Protoc. Bioinforma. 43, 11.10.1-11.10.33. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43

Wang, K., Li, M., Hakonarson, H., 2010. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Res. 38, e164–e164. https://doi.org/10.1093/nar/gkq603

Windpassinger, C., Piard, J., Bonnard, C., Alfadhel, M., Lim, S., Bisteau, X., Blouin, S., Ali, N.B., Ng, A.Y.J., Lu, H., Tohari, S., Talib, S.Z.A., van Hul, N., Caldez, M.J., Van Maldergem, L., Yigit, G., Kayserili, H., Youssef, S.A., Coppola, V., de Bruin, A., Tessarollo, L., Choi, H., Rupp, V., Roetzer, K., Roschger, P., Klaushofer, K., Altmüller, J., Roy, S., Venkatesh, B., Ganger, R., Grill, F., Ben Chehida, F., Wollnik, B., Altunoglu, U., Al Kaissi, A., Reversade, B., Kaldis, P., 2017. CDK10 Mutations in Humans and Mice Cause Severe Growth Retardation, Spine Malformations, and Developmental Delays. Am. J. Hum. Genet. 101, 391–403. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.003

Yeo, G., Burge, C.B., 2004. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol. 11, 377–394. https://doi.org/10.1089/1066527041410418

V.

Discussion générale

La recherche permet la production de nouvelles connaissances afin d'améliorer notre compréhension du monde et des phénomènes naturels. La recherche en sciences de la vie et en santé a pour but de mieux comprendre les mécanismes biologiques des organismes vivants et leurs interactions dans leur environnement et bien entendu en particulier celui de l'Homme (Inserm). La recherche en santé est précisément l'un des champs qui éveille le plus d'intérêt de la part du grand public : en effet, chacun est conscient des applications de ces recherches à savoir améliorer la qualité de vie et proposer des traitements aux patients concernés. La recherche en santé s'exerce à plusieurs niveaux dans le cadre d'une recherche fondamentale, translationnelle ou clinique.

Le travail réalisé au laboratoire s'inscrit dans la recherche translationnelle appliquées aux maladies génétiques rares et plus particulièrement aux ciliopathies dont le syndrome de Bardet-Biedl qui a constitué une grande partie de mon sujet de thèse. Le terme « maladie rare » est utilisé pour décrire les affections qui touchent une très faible proportion de la population. Néanmoins, les maladies rares constituent un important problème de santé publique. En effet, il existe plus de 7000 maladies rares qui touchent au total plus de 3 millions de français soit 4,5% de la population (68 millions d'habitants en France en 2023) et sont responsables de 10% des décès entre 1 et 5 ans (DGOS, 2023). Parmi ces maladies rares, il existe un large groupe de plus de 35 maladies génétiques humaines, connues sous le nom de ciliopathies, qui sont liées à plus de 150 gènes (Focșa et al., 2021) codant pour des protéines qui participent à la formation et la fonction du cil primaire (Reiter and Leroux, 2017; Wheway et al., 2015).

A ce jour, seule une personne atteinte de maladie rare sur 2 dispose d'un diagnostic précis, c'est-à-dire que 50% des patients ne connaissent ni le nom exact de leur maladie ni le gène et donc la mutation génétique associée. Ce diagnostic n'est souvent obtenu qu'auprès des examens longs et couteux responsables d'une errance diagnostique. Concernant le BBS en particulier, 80% des patients examinés cliniquement ont été résolu, c'est l'une des ciliopathies pour laquelle il y a le plus de patients résolus. Cependant, malgré ce fort pourcentage de diagnostics positifs, 20% des patients sont encore concerné par l'errance diagnostic. L'errance diagnostic est définie par la période allant de l'apparition des premiers symptômes à la date à laquelle un diagnostic précis est posé. Dans le cadre des ciliopathies qui sont des maladies hétérogènes cliniquement et génétiquement, il est fréquent que les patients atteints soient confrontés à cette situation d'errance avant que le diagnostic ne soit posé. Ceci peut être sources de difficultés et est une véritable souffrance pour les malades et les familles. L'alliance Maladies rares a réalisé une enquête publiée en 2016 qui démontre que plus d'un quart des malades atteints de maladies rares attendent près de quatre ans pour que la recherche de leur diagnostic débute. Une fois dans le circuit du parcours diagnostic, cette recherche dure au moins un an et demi pour une grande majorité des malades et dépasse 5 ans pour plus d'un quart d'entre eux. Face à ces informations, de nombreuses questions se posent : quelles sont les causes de ces errances ? pourquoi le diagnostic prend autant de temps ? que faudrait-il améliorer ? comment peut-ont faire pour parvenir à résoudre les familles concernées par cette errance ? Nombreuses sont les questions et nombreux sont les projets développés dans le but

d'y répondre. Pour y répondre et trouver des solutions il faut d'abord bien comprendre le problème. Il faut déterminer les points faibles du diagnostic, et la manière dont nous pouvons améliorer les stratégies qui sont d'ores et déjà mises en place à l'heure actuelle pour poursuivre les efforts.

I. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique est la première étape du parcours du patient atteint d'une maladie génétique rare. Cette étape nécessite la collecte des signes cliniques pertinents par l'interrogatoire et l'examen du patient et leur synthèse afin d'évoquer une ou des hypothèses ciblant une pathologie ou un groupe de pathologies. D'un point de vue clinique, l'errance est responsable d'un gaspillage de ressources médicales. Un quart des malades ont consulté au moins cinq médecins avant d'obtenir un diagnostic. Pour autant il est important de préciser que l'errance diagnostique n'est pas présente pour toutes les maladies rares. Par exemple, certaines maladies rares sont présentes en période anténatale ou néonatale et peuvent être dépistées rapidement grâce à l'existence de programmes de dépistage spécifique (ex : hypothyroïdie congénitale, phénylcétonurie, drépanocytose…) (Cherella and Wassner, 2020; Pogue et al., 2018) ou à l'échographie. D'autres maladies rares ont une clinique évocatrice qui déclenchera un diagnostic rapide (ex : trisomie 21, syndrome de Prader-Willi, amyotrophie spinale infantile) (Antonarakis et al., 2020; Butler et al., 2019). Pour d'autres maladies rares, l'errance diagnostique est malheureusement inévitable lorsque les symptômes sont moins spécifiques et/ou évolutifs.

Pour les ciliopathies primaires, l'importante hétérogénéité clinique et génétique et le chevauchement marqué entre les différents syndromes représentent un défi majeur pour les cliniciens et les biologistes qui sont confrontés à ces pathologies. Il n'est pas rare qu'un patient reçoive des diagnostics différents de la part de cliniciens spécialisés dans des organes différents. Le scénario complexe des ciliopathies rappelle l'ancienne anecdote de "l'éléphant et les aveugles " : six aveugles ont rencontré un éléphant pour la première fois et chacun a touché une partie différente de son corps, tirant des conclusions différentes sur sa nature (un pilier, une corde, une branche d'arbre, un ventilateur, un mur, un tuyau) en fonction de la partie qu'ils avaient touchée (la jambe, la queue, le tronc, l'oreille, le ventre, la défense). Bien sûr, même si chacun avait fait une analyse précise, tous étaient parvenus à de fausses conclusions car ils n'avaient pas la "vue d'ensemble". De même, lorsqu'un patient atteint d'une ciliopathie se présente en clinique, une difficulté majeure consiste à s'en tenir à un diagnostic spécifique basé sur la présence de certaines caractéristiques liées à un seul organe compliquées par des apparitions différées dans le temps et évolutives. La disponibilité croissante de tests génétiques à grande échelle, y compris des approches telles que le séquençage de l'exome ou du génome entier, constitue un outil de diagnostic très utile et de plus en plus efficace. Dans certain cas, les tests génétiques permettent d'identifier des gènes inattendus au regard du phénotype du patient permettant une extension des phénotypes associés aux patients et selon les cas de prévoir les signes cliniques futurs de ces derniers.

Un diagnostic clinique solide est important pour le patient afin d'obtenir la certitude de la cause de sa maladie. Il permet au clinicien de fournir une prise en charge médicale optimale au patient et le cas échéant de prédire l'évolution de la maladie en anticipant le développement de signes cliniques plus tardifs. Face à un diagnostic sûr, le généticien peut conseiller le patient et les membres de sa famille par la mise en œuvre d'un conseil génétique fiable. Un diagnostic clinique concluant est aussi important pour les chercheurs afin d'approfondir les connaissances portant sur l'objet biologique étudié. Pour les cas non résolus, ceci permettra d'améliorer la découverte de nouvelles causes génétiques de la maladie et d'étudier les mécanismes physiologiques sous-jacents.

II. Diagnostic moléculaire/génétique

L'un des principaux défis de la génétique moléculaire humaine de ces 20 dernières années était l'identification de nouveaux gènes impliqués dans des pathologies d'origine génétique. L'identification des gènes et des variants n'a eu cesse de s'améliorer avec l'évolution des technologies, du séquençage du génome et des progrès des logiciels d'analyse prédictive permettent de recueillir une quantité énorme d'informations sur notre patrimoine génétique et notre environnement. Malgré toutes les techniques utilisées et ses succès (Bick et al., 2017; Hayeems et al., 2020), jusqu'à présent 50% des patients atteints de maladies génétiques rares et 20% de patients atteints du BBS n'ont pas de diagnostic de certitude. Ceci nous amène à l'un des défis actuels des maladies rares à savoir l'identification des causes moléculaires des familles encore non résolues à ce jour. Pour expliquer ce pourcentage élevé, il faut distinguer plusieurs cas : pour certain des patients une ou des variations de signification incertaines (VSI, classe 3) ont été découvertes dans un gène déjà connu pour être impliqué dans la pathologie (ex : *BBS5*, *IFT172* ou *PIK3C2A*) ou bien dans un gène dont l'implication reste encore à être démontrée. Dans d'autres cas, aucune piste n'a été identifiée et des explorations moléculaires supplémentaires sont nécessaires. Ces problématiques nous poussent à réfléchir à la stratégie actuelle du diagnostic moléculaire, les techniques de séquençage disponibles et les tests de validation fonctionnelle permettant de prouver la pathogénicité des VSI.

Pour réaliser le diagnostic moléculaire des ciliopathies, le laboratoire de génétique médicale suit une stratégie caractérisée par un pipeline progressif (
Figure 20). La première étape passe par la recherche de gènes majeurs du BBS (*BBS1* et *BBS10*) par un séquençage Sanger ciblé des variations fréquentes (~20% des patients BBS). Si aucun variant n'est mis en évidence, un séquençage d'un panel des gènes de ciliopathies et de rétinopathies pigmentaires (~270 gènes) sera réalisé. Ces 2 premières étapes sont réalisées par le laboratoire de diagnostic hospitalier de Strasbourg. Le séquençage de ce panel permet de chercher des variants dans des gènes connus. Si le séquençage du panel ne donne aucun résultat ou partiel, la prochaine étape est le séquençage complet de l'exome (WES) ou du génome (WGS). Le WES et WGS permettent de rechercher des variants dans des gènes et des régions non ciblées par le TES et en particulier des gènes qui n'ont pas encore été associés aux

ciliopathies. Ces techniques présentent des avantages et des limites que je vais discuter ci-dessous.

A. Séquençage à haut débit (panel et WES)

Depuis 2010, le nombre de gènes et de mutations découverts chaque année a augmenté rapidement, grâce notamment aux améliorations des technologies de séquençage de l'ADN et à l'analyse des données massives (big data) (Choi et al., 2009; Costa, 2014). Les techniques de séquençage à haut débit ou de nouvelle génération (NGS) ont également révolutionné le diagnostic génétique en permettant de séquencer simultanément, rapidement et à moindre coût des centaines de gènes (séquençage ciblé dans un panel de gènes) dans de vastes cohortes de patients et notamment dans les ciliopathies (Bachmann-Gagescu, 2014; Hammarsjö et al., 2021; Knopp et al., 2015). Par exemple, Orphanet répertorie jusqu'en août 2023, 5835 gènes associés à des maladies rares et de nombreux tests génétiques incluant des panels de séquençage issus de laboratoires hospitaliers ou privés pour une analyse relativement peu coûteuse de gènes liés à des troubles spécifiques ou à des groupes de maladies (Pogue et al., 2018). Pour une analyse plus complète, le séquençage complet de l'exome (WES) est utilisé car il permet d'avoir accès à l'ensemble des gènes humains (Polla et al., 2015). Même si le WES a permis de résoudre le cas d'un grand nombre de patient, il est limité principalement au séquençage des régions du génome humain codant pour les protéines. Un total de 180 000 exons représentent ~2 % de l'ensemble du génome et contient environ 85 % des mutations héréditaires responsables des maladies mendéliennes (Choi et al., 2009). Des études font état d'une sensibilité de 98,3 % pour la détection de variants pathogènes précédemment identifiées par le WES (Boycott et al., 2013). Toutefois, il ne faut pas oublier que les variants affectant les régions régulatrices et non codantes (comme les régions du type splice enhancers, silencers, insulators et les régions introniques profondes) de l'ADN peuvent être à l'origine de certains cas de maladies rares (Sirmaci et al., 2012) et ne sont pas accessibles par le WES.

Pour dépasser les limitations de ces techniques, une stratégie qui combine le WGS et de nouvelles techniques telle que la cartographie optique apparait comme une des solutions à envisager.

B. Le génome complet (WGS)

Le séquençage du génome complet (WGS) permet de déterminer à priori l'intégralité de l'information génétique d'un individu y compris les régions promotrices, non codantes, les régions intergéniques et les régions régulatrices. Cette technique ne nécessite pas de passer par une étape de capture contrairement au panel de gènes ou au WES ce qui devrait limiter ses biais. Effectivement, cette technique permet d'obtenir une couverture plus homogène du génome permettant ainsi de détecter les variants de structures plus facilement (Belkadi et al., 2015; Geoffroy et al., 2018). C'est le cas par exemple, de la première patiente *BBS5* que j'ai

analysée pour laquelle la mutation sur le 1er allèle avait été détecté par le panel et les WES mais aucun variant en *trans* n'avait pu être identifié. Il n'a été détecté que suite au séquençage complet du génome. En effet, la large délétion des exons 1 et 2 englobant le promoteur du gène *BBS5* est présente dans une région riche en GC difficilement séquencée par l'exome et le panel. Comme le WGS ne nécessite pas une étape de capture, cette zone a été séquencée de manière homogène (Karam et al., 2023). Cet exemple montre le grand intérêt du WGS dans l'identification des variants permettant de compléter les diagnostics moléculaires des patients. L'utilisation de cette technique apparait comme une potentielle solution pour régler « l'errance diagnostic ». Effectivement, le plan « France Médecine Génomique 2025 » développe au niveau national sur une période de 10 ans la mise en place de la médecine génomique avec la mise en place de laboratoires de biologie médicale équipés de séquenceurs capables de faire du WGS en routine. Deux laboratoires sont déjà opérationnels à Paris et Lyon (SEQOiA et AURAGEN). Ces plateformes permettent déjà dans le cadre du soin de séquencer le génome complet avec en 2022 plus de 4200 WGS rendus (https://pfmg2025.aviesan.fr). L'objectif final est d'arriver à séquencer l'équivalent de 18 000 génomes entiers par an. Le séquençage sera suivi par une interprétation de l'information biologique, pour la comprendre et la rendre utile à tous les patients concernés (plan « Médecine France génomique 2025 », 3ème plan national maladies rares (2018-2025)).

C. La cartographie optique

Parmi les variations identifiées à ce jour, on peut citer les variations de petite taille comme les variants nucléotidiques simples (SNV, single nucléotide variants) et les petites insertions/délétions ou indels (<50 bases) qui sont facilement reconnues à l'aide des technologies NGS permettant de faire de courte lecture (short reads) y compris le WGS. Cependant, les variations structurales (SV), qui sont des anomalies dans l'organisation du génome humain d'une taille supérieure à 50 bases restent difficiles à détecter. Elles comprennent des changements structuraux équilibrés (les inversions et les translocations) ou déséquilibrés, ces derniers entraînant un gain ou une perte de matériel génétique (appelé variation du nombre de copies ou CNV). Leur nombre est estimé entre 2500 et 20000 dans chaque génome couvrant jusqu'à 20 millions de bases (Sudmant et al., 2015) (comparé aux 4-5 millions de SNV et petits indels). Les explorations réalisées avec les technologies actuelles (le caryotype et les analyses chromosomiques sur puces à ADN (ACPA) présentent des limites en termes de taille et de type d'événements à détecter. En effet, l'ACPA ne peut détecter que des événements déséquilibrés à une résolution comprise entre 50 et 300 kilobases. Le caryotype ne peut détecter que des événements équilibrés et déséquilibrés mais à une résolution très faible (5 méga bases). Les techniques NGS sont capables dans une certaine mesure de détecter les CNV mais nous avons pu observer au cours de cette thèse (cf Projet BBS5) qu'il y a néanmoins certaines limites et leur détection reste un challenge (Kosugi et al., 2019). Le WGS permet dans certains des cas de passer outre ces limitations mais combien d'évènements sont ratés par cette technique ?

Hors, les CNV ont un rôle important en pathologie (Boyling et al., 2022; Collins et al., 2020; Wang et al., 2023) sont de plus en plus décrits comme une cause génétique de plusieurs maladies mendéliennes comme les dystrophies rétiennes syndromiques (DRS) dont les ciliopathies font parties (Carss et al., 2017; Hammarsjö et al., 2021). Il est donc intéressant d'utiliser d'autres approches plus fiables pour les détecter.

Les techniques de séquençage du génome avec des molécules longues (LRS : long read sequencing) sont des approches possibles (Pacific Biocsience ou Oxford Nanopore) mais leur taux d'erreur sur les détections des SNV/indel et leur coût est resté longtemps très importants. Cette situation s'améliore rapidement et de nouvelles machines sont mise à disposition dans les laboratoires (Oehler et al., 2023; van Dijk et al., 2023) .

Néanmoins, une autre technologie intéressante a commencé à être appliquée en pathologie humaine, à savoir la cartographie optique du génome. La cartographie optique du génome (OGM, optical genome mapping) est une technique qui a été développée dans les années 90 (Schwartz et al., 1993) et qui a été utilisée pour l'assemblage de génomes complexes. Cette technologie a récemment gagné en débit et peut être utilisée chez l'Homme afin d'explorer des cas non résolus en maladies rares (Rogac et al., 2023). Cette technique s'appuie sur le système Saphyr de Bionano Genomics pour obtenir une carte physique, appelée « carte optique d'un génome » ("Gentyane," n.d.). Ces étapes principales consistent d'abord à l'extraction d'ADN de haut poids moléculaire. Ces longues molécules d'ADN sont ensuite marquées spécifiquement et de manière reproductible avec de la fluorescence (par une endonucléase simple brin). Ces coupures et réparations sont hautement spécifiques et reproductibles dans un génome et permettent avec les logiciels adaptés de construire une carte optique du génome. La comparaison de plusieurs cartes optiques individuelles (par exemple la carte obtenue à partir de l'ADN d'un patient vs la carte de référence du génome d'un contrôle) permettra de mettre en évidence tous les types de variations structurales équilibrées et non équilibrées. Elle permet la détection des événements génomiques jusqu'à une résolution de 1000 bases pour les points de cassure et une précision inférieure à 100 bases pour la taille des événements. Son application rencontre un grand succès et elle commence à remplacer plusieurs techniques de soins standards (caryotype, hybridation in situ par fluorescence (FISH) et les puce chromosomique (CMA)) (Mantere et al., 2021; Neveling et al., 2021; Smith et al., 2022).

Cependant l'OGM comporte quelques limites, les marqueurs ne sont pas répartis uniformément sur le génome, ce qui conduit à des zones avec moins de marqueurs, diminuant la résolution. Les triploïdies et les translocations Robertsoniennes (fusion de deux chromosomes acrocentriques) font également parties des limitations de la technique (Dremsek et al., 2021). Cette technologie est utilisée au laboratoire et des résultats prometteurs indiquent déjà l'identification d'évènements génomiques d'intérêt.

En conclusion, la détermination du répertoire complet des variations du génome humain en utilisant les techniques disponibles (WGS, OGM…) permettra à long terme de viser une médecine intégrée en tenant compte des spécificités de chacun. L'analyse et l'interprétation des résultats permet de déterminer les risques de développer certaines maladies à déclaration

tardive par exemple, d'adapter les traitements en fonction du patient et d'anticiper ses effets secondaires éventuels face aux médicaments administrés (pharmacogénétique).
Néanmoins, la mise à disposition massive de variations du génome humain (4 et 5 millions de SNV/indels et entre 2500 et 20000 SV) se heurtera à l'interprétation et à la validation des nombreux candidats parmi lesquels les variants de signification incertaine (VSI) seront les plus difficiles à réaliser.

D. Les gènes modificateurs

Les progrès du séquençage à haut débit ont fait progresser de manière significative la découverte des variants génétiques dans les maladies génétiques rares. Cependant, il existe encore des lacunes dans l'évaluation de l'effet d'un variant pathologique individuel sur le phénotype observé chez le patient. Les approches génomiques ne cessent d'être améliorer afin d'identifier les variants à l'origine des maladies, il semble important de souligner l'importance des gènes modificateurs pouvant expliquer les variabilités phénotypiques. Il s'agit de variants du génome qui peuvent atténuer ou renforcer la gravité de la maladie, ce qui entraîne la variabilité des résultats phénotypiques (Rahit and Tarailo-Graovac, 2020). Dans les cas où le gène responsable de la maladie est connu, des phénotypes variables peuvent être observés. En effet, des patients présentant le même variant dans le même gène présentent parfois des symptômes cliniques de sévérité variable , ce qui pose des problèmes de diagnostic et de prise en charge des patients (Davidson et al., 2018; Kose et al., 2019; Silva et al., 2004). A l'inverse, des chercheurs ont analysé de multiples données des génomes/exomes humains et ont trouvé des preuves de l'existence de génotypes responsables de maladies chez des individus non malades (R. Chen et al., 2016; Tarailo-Graovac et al., 2017). Ces études de séquençage du génome à grande échelle fournissent des informations supplémentaires sur la pénétrance et l'expressivité des maladies rares et confirme l'effet potentiel des modificateurs génétiques. L'identification de la cause génétique d'un phénotype spécifique n'est pas si simple, car les génotypes et les phénotypes n'ont pas forcément une relation linéaire. Cela est dû en partie aux interactions génétiques qui jouent un rôle crucial dans le contrôle de la dépendance fonctionnelle entre les gènes (Costanzo et al., 2019) et peuvent entraîner une variabilité phénotypique. Les variants modificateurs peuvent modifier le phénotype d'un gène cible en ayant une interaction génétique, biochimique ou fonctionnelle avec un ou plusieurs gènes cibles ou produits de gènes (Domingo et al., 2019). Le degré d'effet des modificateurs peut varier, entrainant ainsi une grande variabilité phénotypique et des changements dans la pénétrance. A l'heure actuelle, les connaissances au sujet des modificateurs mendéliens des maladies rares sont très limitées mais il semble évident que la variabilité phénotypique résultant des modificateurs est un aspect important à prendre en compte et à étudier (Holmans et al., 2017; Maroilley and Tarailo-Graovac, 2019; Veitia et al., 2018) surtout dans le cadre des ciliopathies pour lesquelles la variabilité phénotypique intra et inter sous-groupes ne doit pas être négligée. L'étude comparative du phénotype ciliaire que j'ai réalisé pendant ma thèse sur plusieurs patients BBS m'a permis d'observer plusieurs exemples de la variabilité

phénotypique ciliaire observables chez des patients porteurs du même variant dans le même gène. C'est le cas du patient *BBS1(3)* qui comme le patient *BBS1(2)* est porteur de la mutation récurrente M390R à l'état homozygote par contre son phénotype ciliaire est totalement différent. Il en est de même pour les 2 patients *IFT172* qui présentent une importante variabilité du phénotype ciliaire malgré le fait qu'ils sont mutés pour le même gène. L'hypothèse de la présence de gènes modificateurs responsables de ces variabilités phénotypiques observés n'est pas négligeable dans ces cas d'où l'intérêt et le besoin d'avoir des investigations supplémentaires permettant de les étudier. De façon intéressante, la présence de gènes modificateurs a été décrite dans le syndrome BBS. Le syndrome BBS présente une hétérogénéité génétique avec 26 gènes ayant été identifiés comme responsable de 80% des cas de la maladie. Les gènes *BBS1* et *BBS10* sont les deux gènes majeurs du BBS et sont chacun responsables de 20% des cas. L'implication des autres gènes *BBS* va d'une seule famille à un faible pourcentage de familles mutées. Une étude réalisée en 2001 a évoqué l'idée du tri-allélisme chez un patient BBS. Cette étude a démontré qu'un individu porteur de deux variants faux-sens hétérozygote du gène *BBS2* ne développait pas la maladie alors que son frère porteur des mêmes variants et d'un troisième variant tronquant du gène *BBS6* développait le syndrome (Katsanis et al., 2001). Néanmoins, cette hypothèse reste largement discutée dans la communauté et dans notre équipe. Deux papiers publiés par le laboratoire (Hichri et al., 2005; Laurier et al., 2006) n'ont pas rapporté de preuve de triallélisme chez des patients BBS. Récemment, une étude publiée en 2020 rapporte un enrichissement significatif (>2 fois) d'allèles porteurs de variants non synonymes ultra-rares (MAF<0.001%) pour des patients BBS résolus (Kousi et al., 2020). En regroupant les gènes par complexes protéiques, ils ont montré que la distribution de ces seconds variants hétérozygotes n'était pas aléatoire et dépendante du locus des deux premiers variants. Plus particulièrement, quand le premier locus est présent dans un des gènes du complexe chaperonin-like, le second locus hétérozygote est majoritairement présent dans un gène du BBSome. Leurs conclusions confirment l'hypothèse d'une interaction épistatique, déjà proposée en 2006, par laquelle un gène modifie l'expression d'un autre gène impliqué dans le même processus cellulaire (le fonctionnement du cil en l'occurrence) (Badano et al., 2006).

Pour bien comprendre cette variabilité dans l'expression phénotypique des maladies rares, il est essentiel d'examiner le génome de chacun par WGS. Le coût du séquençage du génome entier (WGS) a largement baissé ces dernières années, ce qui permet d'obtenir une vue presque complète (~98-99%) du génome d'un individu. Grâce aux progrès des méthodes bio-informatiques, il est désormais possible d'identifier les variants causales d'un phénotype avec plus de précision et d'exactitude que jamais auparavant (Boycott et al., 2017; Lappalainen et al., 2019), ce qui ouvre la possibilité d'étudier les variants modificateurs au niveau individuel. La littérature indique également que les études sur les gènes modificateurs des maladies rares ont augmenté de manière significative au cours des cinq dernières années grâce à l'accessibilité des techniques. Parmi les 418 études totales réalisées entre 2015 et 2019, 42 % ont utilisé l'analyse de données de séquençage de nouvelle génération (NGS). La plupart de

ces approches ont effectué un filtrage paramétré des variants, une hiérarchisation basée sur le score de pathogénicité (les scores des outils de prédiction de la pathogénicité) et une association fonctionnelle pour identifier les variants modificateurs (basée sur l'ontologies et des bases d'annotation des fonctions). Ces approches reposent souvent sur une hiérarchisation manuelle des variants candidats. Dans ce processus, les experts humains déduisent la similarité fonctionnelle entre les variants candidats et le variant causal cible en examinant les bases de connaissances pertinentes (Abu-Duhier et al., 2018; Cavaillé et al., 2018). L'intégration d'une méthode bio-informatique capable d'analyser et de filtrer de manière exhaustive les modificateurs des variants modificateurs candidats restent un domaine de recherche ouvert à l'exploration.
Pour terminer sur cette partie, le WGS permet d'identifier des variants dans des régions non accessibles par les autres techniques de NGS mais il reste cependant des cas pour lesquels les causes génétiques ne sont pas identifiées. Certaines régions régulatrices (enhancer, silencer) et introniques profondes reste encore mal étudier, le manque d'informations sur ces régions rend les annotations, l'établissement des scores de fonctions et les prédictions de pathogénicité d'autant plus difficile. De ce fait, pour certains variants identifiés, il n'existe pas assez d'informations et d'argument *in silico* pour savoir s'ils ont un effet pathogène ou pas. Il s'agit de variant classer 3 : variants de signification incertaine VSI car la preuve de pathogénicité ne peut être réalisée que par l'application de tests fonctionnels en utilisant des modèles de recherche *in vitro* et/ou *in vivo*. La résolution des VSI ainsi que le développement des tests fonctionnels était parmi mes principaux objectifs pendant ma thèse, et ferons l'objet de la deuxième partie de la discussion.

III. Les Tests fonctionnels pour valider les VSI

Comme nous l'avons déjà discuté le diagnostic moléculaire permet d'identifier de nombreux variants et dans une certaine proportion de ces variants une validation de la pathogénicité est nécessaire pour conclure (variant de signification incertaine). L'objectif principal de ma thèse était donc de résoudre ces cas de patients atteints de ciliopathies primaires (comme le syndrome de Bardet-Biedl) et d'autres syndromes ayant des effets secondaires sur le cil primaire. Par la suite, le laboratoire de recherche met en place des analyses moléculaires poussées et des expériences sur des modèles d'études (cellulaire, animaux) afin de comprendre la fonction et valider l'implication du nouveau gène, de détermine l'effet des VSI pour le reclasser et étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents.

Pour cela, j'ai développé une « boite à outils ciliopathie » dans le but de faciliter la caractérisation du phénotype ciliaire des cellules de nos patients. L'observation et l'interprétation des résultats montre que cette « boite à outils ciliopathie » est fonctionnelle. Il s'agit d'une base de travail solide qui sera systématiquement appliquée au laboratoire de recherche sur toutes les cellules de patients atteints de ciliopathies et qui pourra être étoffée par la suite. Elle nécessite des améliorations à plusieurs niveaux afin de la rendre encore plus

accessible et rapide dans son application. A terme, un transfert vers le laboratoire de diagnostic génétique de l'Hôpitaux Universitaires de Strasbourg serait un but évident. Je vais discuter, par la suite, les différentes expériences réalisées au cours des 3 années, le choix du modèle cellulaire, les améliorations possibles et les manques à combler.

A. Modèles d'étude cellulaire

Au laboratoire de génétique Médicale nous avons la possibilité de générer des fibroblastes issus de la mise en culture de biopsies de peau de patients atteints de ciliopathies et d'autres maladies génétiques rares. Ces cellules portent et expriment les variants pathogènes responsables de la pathologie, ce qui nous permet de nous affranchir d'une expérience d'édition du génome de cellule témoins et permet d'avoir accès au contexte génétique du patient. J'ai réalisé toutes les expériences de mon projet de thèse sur ce modèle cellulaire en étudiant le phénotype ciliaire pour valider les VSI des différents patients. Les fibroblastes sont des cultures primaires obtenues à partir d'explants de biopsies de peau après environ 3 semaines de culture, elles sont facilement cultivées et amplifiables avant d'entrer en senescence (après 15 passages) nous permettant d'obtenir tout le matériel biologique nécessaire pour les expériences (ADN, ARN et protéine). Les fibroblastes peuvent être soumis à différentes conditions de culture pour répondre aux questions biologiques soulevées. Par exemple en réduisent la teneur en sérum (SVF) pendant 48H, il est possible d'étudier la ciliogénèse et la longueur du cil. L'ajout du SAG et du rhSHH au milieu de culture avec et sans déprivation en sérum permet d'étudier le niveau d'activation de la voie SHH. Certes, les fibroblastes cutanés sont des cellules pourvues d'un cil primaire nous permettant d'étudier le phénotype ciliaire des patients atteints de ciliopathies. Cependant, comme n'importe quel modèle, les fibroblastes cutanés montrent leur limite notamment pour l'application de certaines expériences de biologie moléculaire. Ce type cellulaire n'est pas représentatif du tissu atteint dans le cadre des ciliopathies qui nous intéressent. Le phénotype de nos patients est lié à des atteintes rétiniennes (RP), rénales, squelettiques (polydactylie), génitale (hypogonadisme) et d'autres signes cliniques mais aucune atteinte cutanée n'est habituellement rapportée. Il serait donc plus intéressant de travailler sur des lignées cellulaires provenant des organes touchés plus directement par le syndrome.

1. Les iPSC et les organoïdes

Les organes touchés par le syndrome sont très difficilement accessibles. Pour remédier à ce problème, nous pourrions recourir à la technologie des iPSC (induced Pluripotente Stem Cells) suivit par la génération d'organoïdes pour étudier l'atteinte de différents organes et pouvoir progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques. La technologie des iPSC consiste à la génération de cellules souches pluripotentes induites obtenues par dédifférenciation de cellules somatiques telles que les fibroblastes de peau ou les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) en surexprimant un ensemble de facteurs de transcription (OCT4, SOX2, KLF4, MYC, appelé cocktail de Yamanaka) (Takahashi et al., 2007). Les iPSC humaines ont un potentiel de prolifération illimité et la capacité de se différencier en

n'importe quel type de cellule du corps humain (issues des 3 feuillets embryonnaires). Ainsi, Il est possible, en utilisant des milieux spécifiques de différencier les iPSC en précurseurs (culture cellulaire monocouche, par exemple de photorécepteurs de cellules rénales etc) ou en organoïdes (culture cellulaire 3D pour obtenir des mini organes : rétine, rein, cerveau). Pour étudier les phénotypes des patients, les iPSC et les organoïdes peuvent être générer à partir de leur propre cellule. Ces modèles d'étude *in vitro* permettront de récapituler les phénotypes propres à un patient (I. Y. Chen et al., 2016). Concernant les VSI, il existe des stratégies pour montrer l'implication des variants génétiques en utilisant des iPSC modifiées par CRISPR/Cas9. Une étude réalisée en 2021 a utilisé la technologie des iPSC modifiés par la technologie CRISPR pour prouver la pathogénicité des VSI dans le cadre des maladies cardiovasculaires (Guo et al., 2021). Ils ont généré des iPSC à partir des cellules de contrôles et de patients atteints de maladies cardiovasculaire. Ces cellules ont été par la suite éditées par la technique du CRISPR-KI pour soit introduire les variants identifiés dans les iPSC contrôles ou soit pour corriger les iPSC des patients pour rétablir la séquence normale. La technologie CRISPR/Cas9 permet de s'affranchir de la variabilité liée au fond génétique (Cong et al., 2013; Hendriks et al., 2016). De la même manière, la génération de lignées iPSC isogéniques modifiées élimine les biais liés à des fonds génétiques différents, ce qui permet d'étudier la relation génotype-phénotype de manière plus fine (Paquet et al., 2016; Richardson et al., 2016). Ces technologies sont d'ores et déjà appliquées pour étudier les ciliopathies. Une étude réalisée en 2018 a validé de nouveaux variants identifiés dans le gène *IFT140* chez un patient atteint de nephronophtisis (NPHP) par la génération d'organoïdes rénaux dérivés des iPSC du cas index et des iPSC isogéniques corrigées. Les résultats de ces études ont montré que les tubules organoïdes du patient présentaient des cils primaires plus courts avec une morphologie anormale. La correction génétique des iPSC a permis de corriger ce phénotype (Forbes et al., 2018). D'autres types d'organoïdes ont été également réalisés tels que les organoïdes rétiniens qui constituent un modèle humain unique pour l'étude des mécanismes de pathogénicité des maladies rétiniennes et pour le développement de thérapies (Kruczek and Swaroop, 2020). Par exemple, une mutation intronique profonde identifiée dans le gène *CEP290* (c.2991+1665A>G) chez la plupart des patients atteints de LCA (Leber congenital amaurosis) est l'une des premières causes de dégénérescence rétinienne à être modélisée à l'aide d'organoïdes rétiniens tridimensionnels (den Hollander et al., 2006). Dans ce cas les photorécepteurs dérivés d'iPSC de patients présentaient des cils plus courts et une mauvaise localisation des protéines ciliaires (Parfitt et al., 2016). Il existe plusieurs exemples qui utilisent le modèle des iPSC et des organoïdes. Il s'agit d'un modèle d'étude *in vitro* qui se rapproche le plus des modèles *in vivo* et se présente comme une vraie solution à envisager pour étudier les cellules composant les organes d'intérêt (rétine, rein, cerveau et d'autres) même si elles sont difficilement accessibles.

En effet, cette technologie demande une certaine expertise et sa mise en place est longue, couteuse et ne peut pas être prise en charge par tous les laboratoires de recherche. Il faut prendre en compte des temps de différenciation entre le stade iPSC et le stade organoïde mature très longs (par exemple, il faut au moins 220 jours pour avoir des organoïdes de rétines

matures) pour avoir des résultats. Les modèles cellulaires de cellules primaires restent donc une solution pour une génération de résultats généralement plus rapidement par rapport aux modèles d'étude *in vivo* comme les organoïdes. Il est possible d'avoir recours à des modèles cellulaires primaires autre que les fibroblastes cutanés humaines obtenus par biopsie. La biopsie de peau est une technique qui est plus ou moins invasive et qui peut être refusée par les patients. Devant cette problématique, on peut se demander quelles sont les autres types cellulaires qui peuvent être facilement accessible et qui permettent de réaliser une étude du phénotype ciliaire ?

Pour répondre à cette question, le laboratoire a investigué deux types cellulaires plus facilement accessibles pour déterminer s'ils pourraient effectivement remplacer ou complémenter les fibroblastes cutanés humains comme modèles cellulaires : les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) obtenues par prise de sang ou les UREC (urine-derived renal tubular epithelial cells) contenues dans l'urine.

2. Les PBMC

Les PBMC sont les cellules mononucléaires du sang périphérique et sont isolées à partir du sang total par l'application d'un protocole d'extraction spécifique à ce type de cellules (par exemple extraction par gradient de ficoll ou avec la lymphoprep). Elles sont donc obtenues par une prise de sang qui est une technique beaucoup moins invasive que la biopsie et plus facilement toléré par les patients. Bien que ces cellules soient plus facilement accessibles étant donné que l'objectif est de les utiliser pour étudier les ciliopathies, il est nécessaire de répondre à la question suivante : est ce que les PBMC sont des cellules ciliées ? Une recherche bibliographique a identifié une première étude publiée en 2016 présentant les PBMC comme étant des cellules ciliées (Singh et al., 2016). Nous avons donc décidé d'étudier le caractère ciliaire des PBMC au laboratoire dans le cadre des projets Neurogenycs et CilRet-Pass en collaboration avec l'équipe du Dr. Jean-Michel Rozet et notamment Ema Cano (postdoctorante) à l'institut Imagine de Paris. Pendant ma thèse, j'ai participé à ce projet en appliquant certaines expériences de la « boite à outils ciliopathies » aux PBMC cette fois ci. Les PBMC sont des cellules fragiles, non adhérentes qui ne prolifèrent pas en culture. Leur manipulation a donc nécessité une adaptation de tous les protocoles que j'utilisais pour les fibroblastes cutanés. Des mises au point des protocoles d'extraction, des tests de congélation-décongélation ont été réalisées afin de trouver les meilleures conditions pour obtenir les meilleures quantités et qualités de cellules. Plusieurs tests d'IF ont été réalisés pour marquer le cil soit sur des cellules fraichement extraites d'une prise de sang sans déprivation de sérum car il est rapportés qu'elles sont ciliées *in vivo* (Singh et al., 2016), soit en les déprivant en sérum pendant 24H et 48H pour induire la ciliogénèse. Afin de résoudre le problème d'adhérence, nous avons testé des techniques d'IF sur les cellules en suspension en utilisant des lames coatées avec de la cytosine ou de la lysine ou encore des IF après le traitement des cellules avec de la poly I-C : cette activation immunitaire conduit à faire adhérer les monocytes en suspension (ce sont les plus grandes cellules constituant une population de leucocyte qui font partie des PBMC). Finalement, les résultats préliminaires montrent que les PBMC

présentent un cil primaire mais beaucoup plus petit que celui présent chez les fibroblastes de peau. Ces observations soulèvent un défi dans l'étude du phénotype ciliaire de ces cellules (notamment mesurer la longueur du cil et le nombre des cellules ciliées). Ce projet nécessite des investigations supplémentaires. Il faudrait avoir recours à des techniques plus précises nous permettant d'étudier le phénotype ciliaire des PBMC avec plus de précision et une résolution suffisante pour comparer les phénotypes des patients et des contrôles. Récemment, une étude a utilisé les PBMCs pour étudier les anomalies ciliaires chez des patients atteints d'une ciliopathie squelettique, l'EVC (Ellis-van Creveld syndrome, OMIM #225500). Ils ont observé que les PBMC des patients présentaient des cils plus longs que ceux des contrôles démontrant ainsi un défaut structurel des cils chez les ces derniers. Cette étude publiée en Juin 2023 est la deuxième étude qui caractérise le phénotype ciliaire des PBMC (Zhang et al., 2023). Les PBMC apparaissent comme une solution très prometteuse et pourraient à long terme remplacer les fibroblastes cutanés dans les projets de diagnostic et de recherche.

3. Les UREC

Les fibroblastes dérivés de biopsies cutanées conservent des informations génétiques spécifiques au patient, mais la dissection des mécanismes pathologiques moléculaires est limitée par les différences d'expression génique entre ces cellules et le tissu affecté. Le matériel primaire du patient provenant du tissu affecté n'est souvent pas disponible, en particulier dans le cas des maladies rénales, où la biopsie rénale est une procédure extrêmement invasive. L'utilisation des UREC (urine derived renal epithélium cells) permet de surmonter ces limites en fournissant un modèle cellulaire pour les maladies rénales à partir de cellules directement issues du tissu humain et spécifique de chaque patient. Les épithéliums tubulaires rénaux sont exposés à un passage continu de filtrat, et des cellules tubulaires rénales viables (UREC) sont excrétées quotidiennement dans l'urine, représentant une source non invasive de matériel primaire pour les patients. Ces cellules peuvent être isolées, cultivées et utilisées pour toute une série d'applications allant de la modélisation des maladies aux tests de médicaments *ex vivo*. En effet, les UREC se sont révélés être des modèles cellulaires précieux pour disséquer les mécanismes moléculaires des maladies rénales notamment dans le cadre des ciliopathies (Molinari and Sayer, 2019). Elles peuvent être utilisées pour identifier des isoformes spécifiques à un tissu et évaluer les niveaux d'expression de protéines dans le rein, ce qui représente un grand potentiel de diagnostic et de pronostic pour les maladies rénales. Les URECs sont des cellules ciliées (Molinari and Sayer, 2019; Yealland et al., 2023) qui présentent de nombreux avantages dans l'études des maladies rénales. Cependant, des limitations existent : il n'existe pas encore d'informations à propos de leur transformation progressive au fur et à mesure de leur maintien en culture. Il est nécessaire d'avoir une caractérisation complète de l'hétérogénéité de leur population et des variations du profil d'expression génique au cours du temps afin d'éviter toute interprétation erronée des artefacts liés à la culture cellulaire. En plus, elles ne peuvent être obtenues qu'à partir d'échantillons d'urine fraîche, ce qui nécessite une organisation spécifique de gestion du prélèvement. Des projets en cours avec l'équipe de Sophie Saunier à l'institut Imagine dans le cadre des projets du RHU

CIL-L'ICO et européen TheRaCil devraient permettre de compléter nos connaissances et valider l'utilisation de ce modèle cellulaire.

B. Etude du phénotype ciliaire

1. Ciliogénèse et longueur du cil

L'un des principaux objectifs de ma thèse était de comparer le phénotype ciliaire des fibroblastes dérivés des patients à celui des contrôles. Pour faciliter cette caractérisation, j'ai mis en place la « boite à outil ciliopathie » qui permet d'étudier la formation (ciliogénèse et longueur du cil) et la fonction (voie SHH) du cil primaire. Pour étudier le cil primaire, les fibroblastes cutanés sont mis en culture dans un milieu déprivé en sérum (0.1% SVF) pendant 48H. Les sérums d'origine animale sont traditionnellement utilisés à titre de suppléments des milieux de base pour la culture des cellules de mammifères. En effet, si le milieu de base (DMEM 1g/L glc) assure la survie des cellules, celles-ci ne peuvent se diviser que sous l'influence de facteurs mitogènes apportés par le sérum. Ainsi la déprivation en sérum empêche les cellules de se diviser, elles entrent alors en quiescence, phase G0 du cycle cellulaire, pendant laquelle les cellules génèrent leur cil primaire, cette condition est donc indispensable pour induire la ciliogénèse. Mais pourquoi étudier la ciliogénèse et la longueur du cil après une durée de 48H de déprivation ? Une étude réalisée en 2016 a quantifier la ciliogénèse et la longueur du cil des cellules htert-RPE1 à différents temps après déprivation en sérum (après 24, 48, 72 et 96H de déprivation en sérum). Les auteurs ont démontré que le nombre de cellules ciliées augmentent progressivement pour atteindre un taux maximal après 48H, il en est de même pour la longueur du cil qui est la plus importante à ce temps (Kukic et al., 2016). Au-delà des 48H, le risque de mort cellulaire augmente et risque de compromettre les expériences. Nous pouvons donc conclure que pour faire une étude statique en « end point » point final de la ciliogénèse et de la longueur du cil, 48H post traitement est le temps optimal. L'étude statique peut être suffisante pour détecter une anomalie ciliaire chez un patient en le comparant à un contrôle, mais elle ne permet pas de suivre le processus dans le temps (étude cinétique dans ce cas) et de détecter à quel niveau la biogénèse du cil primaire dysfonctionne. De plus, il est important de mentionner que même si le phénotype ciliaire d'un patient après 48H de déprivation est semblable au contrôle, l'évolution de la ciliogénèse au cours du temps chez ce dernier peut se révéler différente du contrôle : des mécanismes compensatoires peuvent intervenir. Pour étudier ce phénomène avec plus de précision, il serait intéressant de s'intéresser à la cinétique de la ciliogénèse c'est-à-dire à l'évolution de la formation du cil au cours du temps et en fonction du cycle cellulaire. Ceci peut être possible grâce aux techniques d'imageries automatisée en temps réel de cellules vivantes comme par exemple le système IncuCyte Sartorius S3 que nous utilisons au laboratoire. Le système IncuCyte Sartorius S3 propose un protocole permettant de marquer le cycle cellulaire afin de générer des mesures cinétiques (basées sur l'image) de la progression de ce dernier au fur et à mesure des divisions cellules. Le protocole consiste à transduire les cellules avec des lentivirus qui fournissent une expression homogène de deux protéines fluorescentes pour distinguer les cellules en interphase ou en phase mitotique afin de permettre la visualisation

de la progression du cycle cellulaire. Ce protocole devrait être testé au sein du laboratoire très prochainement, il permettra d'apporter de nouvelles informations et possiblement intégrer la liste des expériences de la « boite à outils ciliopathies ».

2. Automatisation de l'analyse des résultats

La fréquence des cellules ciliées et la longueur du cil primaire sont des paramètres clés dans les études de la ciliogénèse. Pendant ma thèse j'ai étudié ces deux paramètres chez un grand nombre de patients (13) et de contrôles (5) et donc sur un nombre conséquent de cellules (~8000). Voici un rappel des principales étapes de mon protocole : après avoir réalisé le marquage des cils par IF, je prenais les images avec le système IncuCyte qui permet d'acquérir un grand nombre d'images automatiquement en très peu de temps (il peut générer 16 images/puit d'une plaque 24 puits en 30mins) pour finalement aboutir à 384 images par expériences. Ce système m'a permis de gagner beaucoup de temps sur l'acquisition des images en comparaison avec un microscope confocal à fluorescence avec lequel j'aurais fait l'acquisition des images manuellement en passant les lames une à une. En revanche, j'ai effectué l'analyse de toutes les images manuellement, c'est à dire le comptage du nombre de cellules ciliées et la mesure de la longueur du cil grâce à des logiciel comme ImageJ ou bien celui de l'Incucyte. Pour avoir des résultats fiables, j'analysais plus de 400 cils par patient ou par contrôle (en réalisant des triplicats biologiques et techniques). Toutes ces étapes de traitement manuel ont été très chronophage. L'idée à long terme est d'appliquer ces expériences en routine dans le laboratoire, nous avons donc envisagé un système d'automatisation de l'analyse des images afin de faciliter l'analyse des résultats, de la rendre plus rapide et de s'affranchir du risque du biais dépendant de l'expérimentateur.

Des études ont publié des résultats basés sur l'analyse automatisée de la ciliogénèse et de la longueur du cil. Par exemple en 2019, Lauring *et al* présente un nouveau logiciel nommé ACDC (Automated Cilia Detection in Cells) qui permet une détection automatique des cils et des noyaux dans différents types de cellules (NIH3T3, RPE1) en utilisant différents marqueurs du cil (tubuline alpha acétylée, SMO-GFP, ARL13B) à partir d'images avec un grossissement 40X et 60X. Les taux de faux positifs et faux négatifs pour les cils marqués avec ARL13B sont de 1 à 6%. Le logiciel est même capable de détecter des différences significatives dans la longueur moyenne des cils entre les populations de cellules témoins et les populations de cellules traitées à la cytochalasine D (une toxine qui inhibe la polymérisation des filaments d'actine et perturbe l'organisation du cytosquelette) et a pu suivre les changements dynamiques de la longueur des cils à partir d'enregistrements vidéo. L'analyse automatisée a permis de multiplier la vitesse par 96 par rapport à l'analyse manuelle, ce qui a nécessité environ 5 s/image, soit près de 18 000 cils analysés/heure (Lauring et al., 2019). Une autre étude publiée en 2021 présente le logiciel ALPACA (Accumulation and Length Phenotype Automated Cilia Analysis) qui a été développé pour l'analyse des tests cellulaires des patients atteints de ciliopathies afin d'améliorer la précision de leur diagnostic (Doornbos et al., 2021). Ils ont développé une méthode de culture cellulaire et d'imagerie standardisée pour les fibroblastes dérivés de patients, avec une analyse automatisée des images de microscopes. L'avantage de

l'automatisation dans l'analyse d'images est d'augmenter la reproductibilité, tandis que la normalisation fournit un cadre pour une interprétation précise des données. En utilisant cette méthode standardisée, ils ont pu établir des normes d'analyse pour les paramètres des cils sains, notamment la longueur des cils, la ciliogénèse et le fonctionnement du transport IFT dans les cils (par l'étude de l'accumulation d'IFT88 à l'extrémité du cil). Sur la base de ces paramètres, ils ont pu faire une distinction fiable entre les cils des patients et ceux des contrôles et identifier des groupes distincts de patients atteints de deux sous-groupes de ciliopathies, le syndrome de Jeune ou l'ATD (Asphyxiating Thoracic Dystrophy) et le CED (Sensenbrenner syndrome) (Doornbos et al., 2021).

Avec les moyens que nous disposons au laboratoire et avec l'aide de la plateforme d'imagerie du CBRS (PICSTRA), j'ai réalisé des optimisations des protocoles d'IF et d'acquisition d'images pour pouvoir automatiser l'analyse. L'IncuCyte permet une acquisition automatique des images et nous a permis de gagner du temps sur cette partie, mais ce système ne dispose que de deux objectifs avec grossissement seulement de 10X et 20X. La résolution des images obtenues permet de réaliser des analyses manuelles mais cette résolution n'était pas suffisante pour des analyses automatiques avec des macros développées sur ImagesJ ou d'autres logiciels comme Imaris (logiciel d'analyse et de visualisation d'images microscopiques 3D). Pour solutionner ce problème, il a fallu, d'une part, travailler sur le développement d'un programme d'acquisition automatique des images sur microscope confocal comme par exemple le spinning-disk ou le scanner de lame qui, grâce à des objectifs 40X et 60X, permettent d'acquérir des images de haute qualité (résolution et contraste). D'autres parts, j'ai travaillé, en collaboration directe avec la plateforme, sur le développement d'une macro afin de reconnaitre les noyaux cellulaires et les cils, de les compter et de mesurer leur longueur de manière automatique. Ainsi, en améliorant la qualité de nos images nous allons obtenir une représentation plus précise de nos échantillons et minimiser le risque d'erreur lors de la phase de quantification automatisées. J'ai réalisé toutes les optimisations de protocole afin de mettre en place cette automatisation qui sera possible à court/moyen terme.

3. Etude de la voie SHH

Pour étudier le fonctionnement du cil primaire, je me suis intéressée à la voie SHH qui est essentiellement activée à travers le cil. Pour stimuler l'activation de la voie SHH, j'ai traité les cellules avec le SAG (Smo Agoniste) ou le rhSHH, avec et sans induction de la ciliogénèse (+ ou - SVF). J'ai ensuite quantifié le niveau d'expression de deux gènes cibles de la voie *GLI1* et *PTCH1*. Des variations d'expression (sur ou sous expression) chez les patients par rapport aux contrôles indiquent respectivement une sur ou sous-activation de la voie. Avant de sélectionner ces deux gènes, j'ai également quantifié le niveau d'expression des gènes *GLI2*, *GLI3*, *SMO* et *SUFU* qui codent pour des protéines régulatrices de la cascade de signalisation de la voie. Mais ces 4 gènes ne sont pas des cibles de la voie et leur niveau d'expression ne varie pas lorsque la voie SHH est activée contrairement à *GLI1* et *PTCH1*. Mais pourquoi se limiter seulement à deux gènes alors qu'il explique plus d'une centaine de gènes cibles de la voie SHH ? Il serait très intéressant de réaliser un séquençage complet de l'ARN par des

techniques telles que le RNA-Seq, une méthode très puissante pour caractériser le transcriptome dans un échantillon donné (Wang et al., 2009). Nous pourrions envisager de comparer des cellules de patients et de contrôles cultivées dans les 4 conditions suivantes (+SVF/+SAG, +SVF/-SAG ; -SVF/+SAG, et -SVF- SAG) pour déterminer les gènes sur et sous-exprimés en fonction des conditions dans des cellules contrôles d'une part et ensuite pouvoir comparer leurs niveaux d'expression dans les cellules de patients atteints de ciliopathies. Une étude réalisée en 2018 a identifié les gènes régulés par la voie SHH et des processus biologiques dans le mésenchyme de la crête neurale crânienne (cranial neural crest cell (cNCC)-derived mesenchyme) par une étude transcriptomique comparative. Ils ont défini le transcriptome régulé par SHH du mésenchyme dérivé du cNCC en comparant les signatures d'expression des cNCC activés par SHH *in vitro* aux tissus faciaux primordiaux exposés à l'inhibiteur de la SHH *in vivo*. Cette étude a permis d'améliorer la compréhension de la biologie des cNCC en déterminant l'identité et les rôles possibles des gènes cibles de la voie SHH spécifiques des cNCC. Cette étude présente de nouveaux gènes candidats dont l'examen dans le contexte de l'étiologie des fentes oro-faciales humaines est justifié (Everson et al., 2018). Cette étude confirme l'utilité du RNA-Seq applicable dans le cadre des ciliopathies sur les modèles cellulaires qui nous intéressent, les fibroblastes d'abord et les iPSCs éditées et les organoïdes dans le futur.

En plus du RNA-Seq, nous pourrions aussi réaliser du ChIP-Seq Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing) à partir des cellules des patients. Il s'agit d'une technique permettant d'étudier les interactions ADN/protéine à l'échelle du génome. Cette technologie combine l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), en utilisant des anticorps spécifiques d'une protéine d'intérêt et le séquençage haut débit pour déterminer les séquences du génome en interaction avec cette protéine (Park, 2009). Le but de son application dans l'étude de la voie SHH est de pouvoir cartographier tous les sites de liaisons sur l'ADN du facteur de transcription activateur GLI2-A et du facteur de transcription répresseur GLI3-R. Par l'identification de leurs sites d'interactions sur l'ADN, nous pouvons ainsi déterminer les gènes cibles de la voie par interactions directes.

Une étude réalisée en 2022 a identifié 21 gènes cibles des trois facteurs de transcriptions GLI (GLI1, GLI2 et GLI3) dans les lignées cellulaires de mélanome grâce à la combinaison du RNA-Seq et du CHIP-Seq. Cette étude donne un aperçu de la production transcriptionnelle unique et chevauchante des protéines GLI dans le mélanome. Ces résultats pourraient fournir de nouvelles cibles potentielles à prendre en compte lors de la conception de thérapies ciblées sur le mélanome (Kurtović et al., 2022). La combinaison des deux techniques précédemment citées devrait permettre d'élargir nos connaissances sur les cibles de la voie SHH et de leurs différences d'expression entre les contrôles et les patients atteint de ciliopathie. Nous pourrions ainsi comprendre et expliquer certains phénotypes causés par la dérégulation de la voie chez ces patients.

En plus de l'étude approfondie de la voie SHH d'un point de vue transcriptomique, il semble très important d'étudier la voie SHH au niveau protéique. En effet, l'information entre le transcriptome et le protéome n'est pas toujours redondante à cause de l'épissage alternatif

possible et des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Dans le projet 2, j'ai présenté les mises au point que j'ai réalisé sur les fibroblastes cutanés dérivés du patient *BBS5* pour étudier la translocation de SMO dans le cil par IF d'une part et pour quantifier PTCH1 et GLI2 dans différents compartiments cellulaires par WB après une extraction protéique différentielle d'autre part. Comme je l'ai mentionné dans la conclusion de la partie 2, ces expériences nécessitent encore des mises au point avant de pouvoir être ajoutées à la « boite à outils ciliopathies ». Leur application pourrait apporter des informations très intéressantes sur la régulation de la voie SHH, nous permettant de déterminer plus précisément à quel niveau la voie SHH est dérégulée chez les patients. Une étude réalisée en 2022 a démontré que l'altération de la voie SHH dans les cellules de patients atteints de ciliopathies est due à l'absence de la translocation de SMO dans les cils de ces derniers. L'activité des facteurs de transcription GLI2 et GLI3 est dépendante de la translation de SMO dans le cil, les auteurs ont voulu étudier l'effet de l'absence de translocation de SMO sur ces derniers. GLI3 agit majoritairement comme facteur de transcription répresseur quand la voie SHH est « OFF », donc la fraction de GLI3R est supérieure à celle de GLI3A (GLI3R>GLI3A) dans des cellules contrôles quand la voie SHH est « OFF ». La quantification de ce rapport par WB dans les cellules des patients non stimulées pour la voie SHH montre que le ratio GLI3A/GLI3R ne change pas chez les patients comme chez les contrôles. Quand la voie est « ON », GLI2A joue le rôle du facteur de transcription activateur et le rôle de GLI3R est inhibé donc la quantité de ce dernier est supposé diminuer. La quantification du rapport GLI3A/GLI3R cette fois en condition d'activation de la voie SHH a montré qu'il n'existait toujours aucune différence dans les rapports chez les patients (la quantité de GLI3R ne diminue pas). Ces résultats suggèrent une inhibition anormale réalisée par les GLI3R même quand la voie SHH est « ON » (Le et al., 2020). Cette étude est un bon exemple du grand intérêt de l'étude de la voie SHH afin de mieux comprendre les étapes clés de la cascade de signalisation chez les contrôles dans un premier temps et comment elle est dérégulée chez les patients.

Dans le projet 2, l'étude de la voie SHH et de la longueur du cil que j'ai réalisé sur les 12 patients BBS a permis de mettre en évidence une potentielle corrélation entre la longueur du cil et la voie SHH. L'analyse des résultats a montré que lorsque le cil est plus long en condition -SVF, la voie SHH est moins active en condition -SVF+SAG et vice versa quand le cil est plus court en condition -SVF, la voie SHH est plus active en condition -SVF+SAG. Ces observations suggèrent la présence de mécanismes de compensations qui visent à assurer une homéostasie cellulaire suite au déséquilibre causé par les altérations structurale et fonctionnelle du cil. Jusqu'à présent, j'ai toujours étudié la longueur du cil en condition -SVF seulement, pour comprendre et confirmer cette tendance, il faudrait mesurer la longueur du cil en condition -SVF/+SAG.

Mais comment savoir si l'anomalie ciliaire affecte le fonctionnement de la voie SHH ou vice versa ? et à quelle étape de la cascade la voie SHH se dérégule ? Encore une fois, une étude cinétique pourrait permettre de répondre à ces questions. Nous pourrions suivre l'évolution de la formation du cil et de l'activation de la voie SHH en fonction du temps.

Comme vous avez pu le constater, les expériences que j'ai réalisées depuis mon M2 jusqu'à présent m'ont permis d'obtenir des résultats préliminaires permettant dans le cadre d'une

étude comparative entre les contrôles et les patients de détecter des anomalies du phénotype ciliaire chez ce derniers. Une meilleure compréhension de la régulation de la voie SHH, de ces cibles et des conséquences de son altération nécessite de mettre en place des investigations supplémentaires comme celles que j'ai proposé ci-dessus.

4. Les tests de complémentation (sauvetage du phénotype)

Au cours de ce travail de thèse, j'ai observé des anomalies du phénotype ciliaire chez 12 patients avec des variations dans des gènes impliqués dans des pathologies du cil. Néanmoins, les expériences menées ne m'ont pas permis de faire toujours la démonstration du lien direct entre l'anomalie génétique et ce phénotype cellulaire. La meilleure façon pour faire ce lien est de réaliser des tests de complémentation (sauvetage/rescue) qui consistent à soit utiliser une version sauvage du gène ou bien corriger les variants pathogènes dans les cellules de patients (Crispr/Cas9) et observer un retour à la normale du phénotype. Pour confirmer ces résultats, l'expérience peut également être réalisée dans le sens inverse en introduisant les variants pathogènes dans des cellules contrôles et voir si leurs expressions vont causer une altération du phénotype ciliaire et reproduire le phénotype observé chez le patient. Cette deuxième expérience peut être utilisée pour valider l'effet d'un VSI lorsque les cellules des patients ne sont pas disponibles. Lorsqu'il s'agit de variants perte de fonction ou de gain de fonction, il est possible d'éditer des cellules en générant un knock-out et knock-in (par les techniques de CRISPR/CAS9, par exemples) pour étudier l'effet de l'absence ou de la surexpression du gène et comprendre ainsi sa fonction au niveau cellulaire. Il est également possible d'avoir recours à la technique de « silencing » via des siARN dirigés contre le gène d'intérêt dans des cellules contrôles ou bien des surexpressions du plasmide contenant l'ADNc WT pour le gène dans les cellules du patient. Toutes ces expériences nécessitent de réaliser les techniques de clonages moléculaire et de transfection cellulaire d'où l'intérêt de mettre au point ces techniques sur les modèles cellulaires disponibles au laboratoire. Dans le projet 2, j'ai présenté les différentes mises au point de transfection que j'ai testé sur les fibroblastes cutanés humains qui sont des cellules primaires plus difficiles à transfecter par rapport aux lignées de cellules immortalisées comme les HEK par exemple. J'ai testé les transfections à la lipofectamine et d'autres agents de transfection ainsi que la magnétofection. Aucune des techniques n'a permis d'obtenir un pourcentage de fibroblastes transfectés suffisant pour être en capacité d'étudier leur phénotype ciliaire. La transfection par électroporation pourrait donc être une solution permettant d'améliorer le taux de transfection des fibroblastes cutanées. C'est une technique qui consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes cellulaires qui sont ainsi déstabilisées ce qui crée des pores dans la membrane et augmente sa perméabilité permettant ainsi l'entrée des acides nucléiques dans les cellules. Cette expérience devrait être testée prochainement au laboratoire grâce à l'acquisition d'un Nucleofector (Lonza) qui propose deux unités pour transfecter soit les cellules adhérentes soit les cellules en suspensions. D'autres alternatives sont également envisageables, nous pourrions tester de faire des transductions en utilisant des vecteurs viraux comme les lentivirus à la place des plasmides. Les lentivirus

assurent une transduction des gènes d'intérêt plus efficacement via leur intégration dans le génome de la cellule. Leur transcription continue permet de réaliser une transfection dite stable (l'expression du gène d'intérêt ne disparait pas après plusieurs divisions cellulaires) contrairement aux expériences de transfection testées jusqu'à présent. Cette technique est déjà utilisée dans d'autres laboratoire et plusieurs études sont réalisées dans le but d'optimiser la transfection des fibroblastes primaires par les lentivirus (He et al., 2021). Au laboratoire, un système de lentivirus est en cours de développement par deux chercheurs de l'axe des maladies de la réparation, Nicolas Le May et Eleonor Real. Ce système sera testé sur différents types de cellules dont les fibroblastes humains dérivés de biopsies de peau. Les tests sont déjà en cours et nous espérons aboutir à un bon pourcentage de cellules transduites afin de pouvoir appliquer cette expérience dans tous les projets et pouvoir ainsi la rajouter à la « boite à outils ciliopathies ».

IV. Peut-on considérer que toutes les pathologies qui présentent des anomalies ciliaires sont des ciliopathies ? Finalement, qu'est-ce qu'une ciliopathie ?

Au cours de ma thèse j'ai caractérisé le phénotype ciliaire de patients atteints de ciliopathies notamment du syndrome de Bardet-Biedl. Les gènes *BBS1*, *BBS5*, *BBS10* et *IFT172/BBS20* sur lesquels j'ai travaillé sont des gènes connus du BBS qui font déjà partie du panel des gènes de ciliopathies appliqué par le laboratoire de diagnostic. Ils codent tous pour des protéines qui font parties de complexes ciliaire : BBS1 et BBS5 sont 2 des 8 sous-unités du BBSome, IFT172 appartient au complexe IFT et BBS10 fait partie du complexe chaperonine-like localisés à la base ou dans l'axonème ciliaire. Bien que l'activité précise de chaque membre de ces complexes ne soit pas encore complètement déterminée, ils sont tous essentiellement impliqués dans la formation et la fonction ciliaire. La fonction de ces protéines est donc essentielle au bon fonctionnement ciliaire et il est évident que leur dysfonctionnement provoque des altérations du cil primaire comme observé chez les patients BBS que j'ai étudiés. J'ai également résolu le cas d'un patient non BBS atteint du syndrome OCSKD (Oculoskeletodental Syndrome) causé par des variants pathogènes du gène *PIK3C2A* et j'ai participé à la résolution de 5 patients atteints du syndrome d'AI Kaissi causé par des variants pathogènes du gène *CDK10*. Ces deux syndromes sont des maladies génétiques rares récemment décrites dont les quelques patients présentent un phénotype clinique comparable à celui des patients atteint de ciliopathies.

Le gène *PIK3C2A* code pour une enzyme qui fait partie de la classe II des PI3K, dont le rôle primordial est de catalyser la phosphorylation du phosphatidylinositol (PI) et du PI(4)P en PI(3)P et PI(3,4)P2. Par son activité métabolique des (PI) et des produits qu'elle génère, cette enzyme est impliquée dans divers processus cellulaires, notamment le trafic vésiculaire, l'endocytose, l'exocytose, l'angiogenèse, le réarrangement du cytosquelette et l'autophagie. En plus de ses rôles, il a été démontré que le PI3P (l'un de ces produits) participe à une cascade de signalisation (Rab11/Rab8) impliquée dans l'élongation et la fonction du cil.

Le gène *CDK10* code pour une protéine qui appartient à la famille des kinases dépendantes des cyclines. Cette protéine joue un rôle fondamental dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et participe activement à d'autres fonctions comme la régulation transcriptionnelle au cours de la prolifération cellulaire et du développement embryonnaire. En plus de ces rôles, CDK10 forme un hétérodimère avec la cycline Q. Le couple CDK10/Cycline Q est localisé à la base du cil primaire, surtout concentré au niveau du centriole mère et joue le rôle d'un répresseur de la ciliogénèse.

Il me semble important de rappeler les fonctions connues de ces deux protéines car, dans les deux cas, il s'agit de protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Ces protéines ont été d'abord connues pour leur rôle fondamental (métabolique pour PIK3C2A et cycline pour CDK10) et ont été nommé en conséquence. Evidemment, parmi leurs nombreuses implications, ces deux protéines jouent un rôle au niveau du cil primaire. Nous avons démontré par la caractérisation du phénotype ciliaire des patients que l'altération de la fonction protéique de PIK3C2A et de CDK10 provoque des altérations ciliaires. Ces cas sont comparables à un cas qui a été résolu au laboratoire en 2016, il s'agissait d'une patiente présentant un phénotype typique de ciliopathie avec des variants pathogènes dans le gène *PIK3R4/VPS15*. La protéine VPS15 également appelé PIK3R4 est la sous unité régulatrice de VPS34 qui est une PI3K de classe III. Le complexe VSP15-VPS34 permet la formation de PI3P à partir de PIP et est essentiellement connu pour son rôle dans l'autophagie et dans le transport des vacuoles cytoplasmique. Le rôle de VPS15 (qui est une protéine multifonctions) dans le cil ainsi que son implication dans une ciliopathie n'a été évoqué qu'en 2016 (Stoetzel et al., 2016).

Cependant, l'observation de ces cas nous poussent à poser une question primordiale qui reste en suspens : s'agit-il d'un rôle primaire (direct) ou secondaire (indirect) au cil primaire ? Cette question ouvre la porte à plusieurs autres interrogations concernant les causes des syndromes et leur classification. Est-ce que le syndrome OCSKD est causé par un problème métabolique ou finalement par l'altération du cil ? De la même manière, est ce que le syndrome d'AI Kaissi est causé par les problèmes du cycle cellulaire ou finalement par l'altération du cil ? Dans d'autres termes, plus généralement, pourrions-nous considérer ces syndromes comme des ciliopathies ? Dans le cas contraire, ne devraient-ils pas être considérés comme des syndromes distincts aux ciliopathies avec des effets secondaires sur le cil ? D'un point de vue très pratique pour les diagnostics moléculaires : les gènes *PIK3C2A* et *CDK10* devraient-ils faire partie des panels des gènes de ciliopathies ?

Ces questions ont été soulevées par d'autres chercheurs, une étude réalisée par Reiter *et al* en 2017 a discuté le fait que des protéines non ciliaires influencent les fonctions du cil causent des ciliopathies et que certaines protéines ciliaires peuvent avoir des rôles non ciliaires (Reiter and Leroux, 2017). Ils ont donc proposé de classer les ciliopathies en ciliopathies de premier ordre et ciliopathies de second ordre (Figure 45). Ils ont considéré que les ciliopathies de premier ordre sont les maladies causées par le dysfonctionnement d'une protéine qui se localise et fonctionne principalement dans le corps basal et/ou le compartiment ciliaire (comme les protéines du IFT). Alors que les ciliopathies de second ordre sont des maladies causées par des variations pathogènes dans des protéines qui ne sont pas localisées dans les

cils mais qui jouent un rôle dans la formation ou la fonction des cils (comme les facteurs d'assemblage cytoplasmique des bras de dynéines impliqués dans la dyskinésie ciliaire primaire (PCD)). Leur proposition de classification des ciliopathies permet de répondre simplement mais pas forcément de manière satisfaisante à cette question surtout dans le cas des protéines multifonctionnelles pour lesquelles il est difficile de discriminer entre leur rôle primaire et leur rôle secondaire.

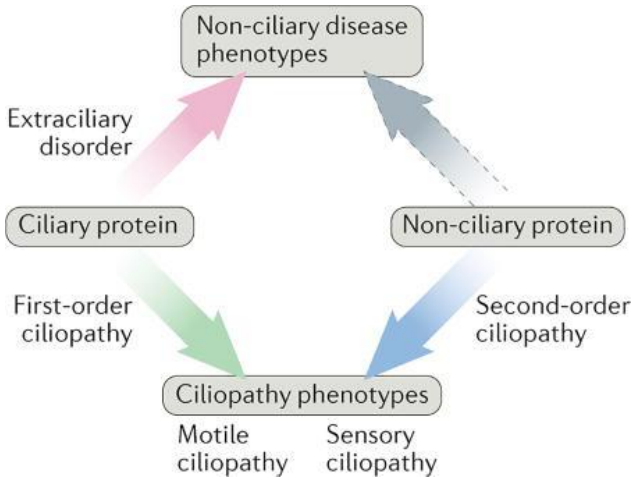


Figure 45 : Proposition de classification des ciliopathies. Les ciliopathies sont classées en ciliopathies du premier ordre et ciliopathies du second ordre en fonction de la localisation et de la fonction principale des protéines qui les causent (Reiter and Leroux, 2017).

VI.

Conclusions et perspectives

Le Laboratoire de Génétique Médicale (LGM, U1112) cherche à identifier les mécanismes moléculaires (gènes et variants) responsables des dystrophies rétiniennes syndromiques (DRS) et plus précisément des ciliopathies. Mon travail de thèse s'inscrit totalement dans une recherche translationnelle avec un aller et un retour entre le patient, le corps médical et les chercheurs afin d'apporter des réponses aux questions posées. Ces questions peuvent être médicales (quel est le diagnostic du patient ?) ou scientifiques (quel est le mécanisme biologique perturbé dans la pathologie liée au gène *BBS5* ?).

Au cours de ma thèse j'ai pu développer 3 axes de travails pour atteindre mes 2objectifs principaux.

Premièrement, j'ai pu mettre au point les tests fonctionnels dédiés au cil (« boite à outils ciliopathie ») sur les fibroblastes cutanés dérivés de cinq contrôles. Ces validations de base sont un prérequis pour obtenir les conditions initiales de ces tests et elles ont permis de déterminer le phénotype ciliaire dans des fibroblastes contrôles.

Deuxièmement j'ai pu appliquer cette boite à outils pour reclasser 10 variations de signification incertaine (classe 3) en variants probablement pathogènes (classe 4) ou pathogènes (classe 5) et de confirmer le diagnostic moléculaire de 8 familles (1 pour *BBS5*, 1 pour *PIK3C2A*, 1 pour *IFT172* et 5 pour *CDK10*). Mes travaux de validation de variants ont eu un impact direct pour ces familles qui ont bénéficiées d'un diagnostic moléculaire de certitude et leur permettra d'avoir accès à un conseil génétique fiable. Selon les cas ceci permettra de proposer une prise en charge adaptée comme par exemple lors d'un projet parental avec un diagnostic prénatal (DPN) et/ou un diagnostic préimplantatoire (DPI). Cette boite à outils ciliopathie est donc un support précieux et complémentaire aux tests fonctionnels classiques (mesure de l'expression du gène muté et l'étude de la protéine) permettant de valider et de reclasser les VSI.

Troisièmement, j'ai déterminé systématiquement le phénotype cellulaire et ciliaire des fibroblastes de peau de patients avec un diagnostic moléculaire déjà établi, ceci afin de mieux comprendre la contribution des variations et/ou des gènes BBS dans la variabilité de ce phénotype ciliaire. La recherche bibliographique sur les 24 gènes BBS a permis de conclure que le phénotype ciliaire varie en fonction de l'espèce, du type cellulaire considéré et de la technique utilisée pour induire la mutation si nécessaire. Cela m'a permis de réaliser également le peu d'information et de tests systématiques réalisés pour ces gènes. L'étude pilote comparative des phénotypes ciliaires chez 10 patients atteints du BBS réalisée dans les mêmes conditions et sur le même type cellulaire (les fibroblastes cutanées) m'a permis d'obtenir des résultats reproductibles et significatifs. La sélection des patients incluant des variants pathogènes différents dans 3 gènes distincts (*BBS1*, *BBS10*, et *IFT172*) a permis d'avoir accès aux trois compartiments fonctionnels du syndrome (BBSome, complexe chaperonin-like et complexe IFT,). Pour les deux gènes *BBS1* et *BBS10,* le phénotype ciliaire est gène-dépendant ce qui veut dire quel que soit le type de variant, le phénotype ciliaire est le même pour le gène. Pour *IFT172,* le phénotype ciliaire est variable en fonction des variants, les conclusions sont beaucoup moins solides et devront être reproduites avec d'autres variations. L'altération ciliaire causée par *BBS1* est différente de celle causée par *BBS10* et par *IFT172,* suggérant que

cette différence est due aux différentes fonctions de ces protéines et aux implications des complexes auxquelles elles appartiennent dans la formation et la fonction ciliaire. Néanmoins, cette étude correspond à une étude pilote permettant d'avoir un premier aperçu des variabilités phénotypiques ciliaires. Cette étude devra être étendue afin de caractériser un plus grand nombre de patients porteurs de mutations dans les même gènes BBS et dans d'autres gènes BBS voir d'autres ciliopathies afin de continuer à compléter la carte des informations : quel gène cause quel phénotype, comment et pourquoi ?

VII.

Références

Abu-Duhier, F., Pooranachandran, V., McDonagh, A.J.G., Messenger, A.G., Cooper-Knock, J., Bakri, Y., Heath, P.R., Tazi-Ahnini, R., 2018. Whole Genome Sequencing in an Acrodermatitis Enteropathica Family from the Middle East. Dermatology Research and Practice 2018, e1284568. https://doi.org/10.1155/2018/1284568

Afzelius, B.A., 1976. A human syndrome caused by immotile cilia. Science 193, 317–319. https://doi.org/10.1126/science.1084576

Aki, S., Yoshioka, K., Okamoto, Y., Takuwa, N., Takuwa, Y., 2015. Phosphatidylinositol 3-Kinase Class II α-Isoform PI3K-C2α Is Required for Transforming Growth Factor β-induced Smad Signaling in Endothelial Cells*. Journal of Biological Chemistry 290, 6086–6105. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.601484

Al-Hamed, M.H., van Lennep, C., Hynes, A.M., Chrystal, P., Eley, L., Al-Fadhly, F., El Sayed, R., Simms, R.J., Meyer, B., Sayer, J.A., 2014. Functional modelling of a novel mutation in BBS5. Cilia 3, 3. https://doi.org/10.1186/2046-2530-3-3

Álvarez-Satta, M., Castro-Sánchez, S., Pereiro, I., Piñeiro-Gallego, T., Baiget, M., Ayuso, C., Valverde, D., 2014. Overview of Bardet–Biedl syndrome in Spain: identification of novel mutations in BBS1, BBS10 and BBS12 genes. Clinical Genetics 86, 601–602. https://doi.org/10.1111/cge.12334

Alves, M.B.R., Girardet, L., Augière, C., Moon, K.H., Lavoie-Ouellet, C., Bernet, A., Soulet, D., Calvo, E., Teves, M.E., Beauparlant, C.J., Droit, A., Bastien, A., Robert, C., Bok, J., Hinton, B.T., Belleannée, C., 2023. Hedgehog signaling regulates Wolffian duct development through the primary cilium†. Biol Reprod 108, 241–257. https://doi.org/10.1093/biolre/ioac210

Amberger, J.S., Bocchini, C.A., Schiettecatte, F., Scott, A.F., Hamosh, A., 2015. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. Nucleic Acids Res 43, D789-798. https://doi.org/10.1093/nar/gku1205

Amendola, L.M., Jarvik, G.P., Leo, M.C., McLaughlin, H.M., Akkari, Y., Amaral, M.D., Berg, J.S., Biswas, S., Bowling, K.M., Conlin, L.K., Cooper, G.M., Dorschner, M.O., Dulik, M.C., Ghazani, A.A., Ghosh, R., Green, R.C., Hart, R., Horton, C., Johnston, J.J., Lebo, M.S., Milosavljevic, A., Ou, J., Pak, C.M., Patel, R.Y., Punj, S., Richards, C.S., Salama, J., Strande, N.T., Yang, Y., Plon, S.E., Biesecker, L.G., Rehm, H.L., 2016. Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. Am J Hum Genet 98, 1067–1076. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.03.024

Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Chul Kim, J., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., Mah, A.K., Johnsen, R.C., Cavender, J.C., Alan Lewis, R., Leroux, M.R., Beales, P.L., Katsanis, N., 2003. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet–Biedl syndrome. Nature 425, 628–633. https://doi.org/10.1038/nature02030

Antonarakis, S.E., Skotko, B.G., Rafii, M.S., Strydom, A., Pape, S.E., Bianchi, D.W., Sherman, S.L., Reeves, R.H., 2020. Down syndrome. Nat Rev Dis Primers 6, 9. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0143-7

Arcaro, A., Zvelebil, M.J., Wallasch, C., Ullrich, A., Waterfield, M.D., Domin, J., 2000. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. Mol Cell Biol 20, 3817–3830. https://doi.org/10.1128/MCB.20.11.3817-3830.2000

Aung, K.T., Yoshioka, K., Aki, S., Ishimaru, K., Takuwa, N., Takuwa, Y., 2019. The class II phosphoinositide 3-kinases PI3K-C2α and PI3K-C2β differentially regulate clathrin-dependent pinocytosis in human vascular endothelial cells. J Physiol Sci 69, 263–280. https://doi.org/10.1007/s12576-018-0644-2

Auton, A., Abecasis, G.R., Altshuler, D.M., Durbin, R.M., Abecasis, G.R., Bentley, D.R., Chakravarti, A., Clark, A.G., Donnelly, P., Eichler, E.E., Flicek, P., Gabriel, S.B., Gibbs, R.A., Green, E.D., Hurles, M.E., Knoppers, B.M., Korbel, J.O., Lander, E.S., Lee, C., Lehrach, H., Mardis, E.R., Marth, G.T., McVean, G.A., Nickerson, D.A., Schmidt, J.P., Sherry, S.T., Wang, J., Wilson, R.K., Gibbs, R.A., Boerwinkle, E., Doddapaneni, H., Han, Y., Korchina, V., Kovar, C., Lee, S., Muzny, D., Reid, J.G., Zhu, Y., Wang, J., Chang, Y., Feng, Q., Fang, X., Guo, X., Jian, M., Jiang, H., Jin, X., Lan, T., Li, G., Li, J., Li, Y., Liu, S., Liu, X., Lu, Y., Ma, X., Tang, M., Wang, B., Wang, G., Wu, H., Wu, R., Xu, X., Yin, Y., Zhang, D., Zhang, W., Zhao, J., Zhao, M., Zheng, X., Lander, E.S., Altshuler, D.M., Gabriel, S.B., Gupta, N., Gharani, N., Toji, L.H., Gerry, N.P., Resch, A.M., Flicek, P., Barker, J., Clarke, L., Gil, L., Hunt, S.E., Kelman, G., Kulesha, E., Leinonen, R., McLaren, W.M., Radhakrishnan, R., Roa, A., Smirnov, D., Smith, R.E., Streeter, I., Thormann, A., Toneva, I., Vaughan, B., Zheng-Bradley, X., Bentley, D.R., Grocock, R., Humphray, S., James, T., Kingsbury, Z., Lehrach, H., Sudbrak, R., Albrecht, M.W., Amstislavskiy, V.S., Borodina, T.A., Lienhard, M., Mertes, F., Sultan, M., Timmermann, B., Yaspo, M.-L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Fulton, L., Fulton, R., Sherry, S.T., Ananiev, V., Belaia, Z., Beloslyudtsev, D., Bouk, N., Chen, C., Church, D., Cohen, R., Cook, C., Garner, J., Hefferon, T., Kimelman, M., Liu, C., Lopez, J., Meric, P., O'Sullivan, C., Ostapchuk, Y., Phan, L., Ponomarov, S., Schneider, V., Shekhtman, E., Sirotkin, K., Slotta, D., Zhang, H., McVean, G.A., Durbin, R.M., Balasubramaniam, S., Burton, J., Danecek, P., Keane, T.M., Kolb-Kokocinski, A., McCarthy, S., Stalker, J., Quail, M., Schmidt, J.P., Davies, C.J., Gollub, J., Webster, T., Wong, B., Zhan, Y., Auton, A., Campbell, C.L., Kong, Y., Marcketta, A., Gibbs, R.A., Yu, F., Antunes, L., Bainbridge, M., Muzny, D., Sabo, A., Huang, Z., Wang, J., Coin, L.J.M., Fang, L., Guo, X., Jin, X., Li, G., Li, Q., Li, Y., Li, Z., Lin, H., Liu, B., Luo, R., Shao, H., Xie, Y., Ye, C., Yu, C., Zhang, F., Zheng, H., Zhu, H., Alkan, C., Dal, E., Kahveci, F., Marth, G.T., Garrison, E.P., Kural, D., Lee, W.-P., Fung Leong, W., Stromberg, M., Ward, A.N., Wu, J., Zhang, M., Daly, M.J., DePristo, M.A., Handsaker, R.E., Altshuler, D.M., Banks, E., Bhatia, G., del Angel, G., Gabriel, S.B., Genovese, G., Gupta, N., Li, H., Kashin, S., Lander, E.S., McCarroll, S.A., Nemesh, J.C., Poplin, R.E., Yoon, S.C., Lihm, J., Makarov, V., Clark, A.G., Gottipati, S., Keinan, A., Rodriguez-Flores, J.L., Korbel, J.O., Rausch, T., Fritz, M.H., Stütz, A.M., Flicek, P., Beal, K., Clarke, L., Datta, A., Herrero, J., McLaren, W.M., Ritchie, G.R.S., Smith, R.E., Zerbino, D., Zheng-Bradley, X., Sabeti, P.C., Shlyakhter, I., Schaffner, S.F., Vitti, J., Cooper, D.N., Ball, E.V., Stenson, P.D., Bentley, D.R., Barnes, B., Bauer, M., Keira Cheetham, R., Cox, A., Eberle, M., Humphray, S., Kahn, S., Murray, L., Peden, J., Shaw, R., Kenny, E.E., Batzer, M.A., Konkel, M.K., Walker, J.A., MacArthur, D.G., Lek, M., Sudbrak, R., Amstislavskiy, V.S., Herwig, R., Mardis, E.R., Ding, L., Koboldt, D.C., Larson, D., Ye, K., Gravel, S., The 1000 Genomes Project Consortium, Corresponding authors, Steering committee, Production group, Baylor College of Medicine, BGI-Shenzhen, Broad Institute of MIT and Harvard, Coriell Institute for Medical Research, European Molecular Biology Laboratory, E.B.I., Illumina, Max Planck Institute for Molecular Genetics, McDonnell Genome Institute at Washington University, US National Institutes of Health, University of Oxford, Wellcome Trust Sanger Institute, Analysis group, Affymetrix, Albert Einstein College of Medicine, Bilkent University, Boston College, Cold Spring Harbor Laboratory, Cornell University, European Molecular Biology Laboratory, Harvard University, Human Gene Mutation Database, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Louisiana State University, Massachusetts General Hospital, McGill University, National Eye Institute, N., 2015. A global reference for human genetic variation. Nature 526, 68–74. https://doi.org/10.1038/nature15393

Axelrod, J.D., 2008. Basal bodies, kinocilia and planar cell polarity. Nat Genet 40, 10–11. https://doi.org/10.1038/ng0108-10

Azie, N., Vincent, J., 2012. Rare diseases: the bane of modern society and the quest for cures. Clin Pharmacol Ther 92, 135–139. https://doi.org/10.1038/clpt.2012.97

Baalann, K.P., Krishnan, M., 2022. Becker's nevus. Pan Afr Med J 41, 142. https://doi.org/10.11604/pamj.2022.41.142.33417

Bachmann-Gagescu, R., 2014. Complexité génétique des ciliopathies et identification de nouveaux gènes. Med Sci (Paris) 30, 1011–1023. https://doi.org/10.1051/medsci/20143011016

Bachmann-Gagescu, R., Neuhauss, S.C., 2019. The photoreceptor cilium and its diseases. Curr Opin Genet Dev 56, 22–33. https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.05.004

Backer, J.M., 2016. The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34. Biochem J 473, 2251–2271. https://doi.org/10.1042/BCJ20160170

Badano, J.L., Leitch, C.C., Ansley, S.J., May-Simera, H., Lawson, S., Lewis, R.A., Beales, P.L., Dietz, H.C., Fisher, S., Katsanis, N., 2006. Dissection of epistasis in oligogenic Bardet–Biedl syndrome. Nature 439, 326–330. https://doi.org/10.1038/nature04370

Bagella, L., Giacinti, C., Simone, C., Giordano, A., 2006. Identification of murine cdk10: association with Ets2 transcription factor and effects on the cell cycle. J Cell Biochem 99, 978–985. https://doi.org/10.1002/jcb.20981

Baker, K., Beales, P.L., 2009. Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. Am J Med Genet C Semin Med Genet 151C, 281–295. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30231

Bangs, F., Anderson, K.V., 2017. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 9. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028175

Barker, A.R., Thomas, R., Dawe, H.R., 2014. Meckel-Gruber syndrome and the role of primary cilia in kidney, skeleton, and central nervous system development. Organogenesis 10, 96–107. https://doi.org/10.4161/org.27375

Barny, I., Perrault, I., Michel, C., Soussan, M., Goudin, N., Rio, M., Thomas, S., Attié-Bitach, T., Hamel, C., Dollfus, H., Kaplan, J., Rozet, J.-M., Gerard, X., 2018. Basal exon skipping and nonsense-associated altered splicing allows bypassing complete CEP290 loss-of-function in individuals with unusually mild retinal disease. Hum Mol Genet 27, 2689–2702. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy179

Baux, D., Van Goethem, C., Ardouin, O., Guignard, T., Bergougnoux, A., Koenig, M., Roux, A.-F., 2021. MobiDetails: online DNA variants interpretation. Eur J Hum Genet 29, 356–360. https://doi.org/10.1038/s41431-020-00755-z

Beales, P.L., Elcioglu, N., Woolf, A.S., Parker, D., Flinter, F.A., 1999. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. J Med Genet 36, 437–446.

Beales, P.L., Warner, A.M., Hitman, G.A., Thakker, R., Flinter, F.A., 1997. Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families. J Med Genet 34, 92–98. https://doi.org/10.1136/jmg.34.2.92

Belkadi, A., Bolze, A., Itan, Y., Cobat, A., Vincent, Q.B., Antipenko, A., Shang, L., Boisson, B., Casanova, J.-L., Abel, L., 2015. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 5473–5478. https://doi.org/10.1073/pnas.1418631112

Bentley-Ford, M.R., Engle, S.E., Clearman, K.R., Haycraft, C.J., Andersen, R.S., Croyle, M.J., Rains, A.B., Berbari, N.F., Yoder, B.K., 2021. A mouse model of BBS identifies developmental

and homeostatic effects of BBS5 mutation and identifies novel pituitary abnormalities. Hum Mol Genet. https://doi.org/10.1093/hmg/ddab039

Bick, D., Fraser, P.C., Gutzeit, M.F., Harris, J.M., Hambuch, T.M., Helbling, D.C., Jacob, H.J., Kersten, J.N., Leuthner, S.R., May, T., North, P.E., Prisco, S.Z., Schuler, B.A., Shimoyama, M., Strong, K.A., Van Why, S.K., Veith, R., Verbsky, J., Weborg, A.M., Wilk, B.M., Willoughby, R.E., Worthey, E.A., Dimmock, D.P., 2017. Successful Application of Whole Genome Sequencing in a Medical Genetics Clinic. J Pediatr Genet 6, 61–76. https://doi.org/10.1055/s-0036-1593968

Billingsley, G., Bin, J., Fieggen, K.J., Duncan, J.L., Gerth, C., Ogata, K., Wodak, S.S., Traboulsi, E.I., Fishman, G.A., Paterson, A., Chitayat, D., Knueppel, T., Millán, J.M., Mitchell, G.A., Deveault, C., Héon, E., 2010. Mutations in chaperonin-like BBS genes are a major contributor to disease development in a multiethnic Bardet–Biedl syndrome patient population. Journal of Medical Genetics 47, 453–463. https://doi.org/10.1136/jmg.2009.073205

Billingsley, G., Deveault, C., Héon, E., 2011. BBS mutational analysis: a strategic approach. Ophthalmic Genet 32, 181–187. https://doi.org/10.3109/13816810.2011.567319

Bloodgood, R.A., 2009a. Chapter 1 - From Central to Rudimentary to Primary: The History of an Underappreciated Organelle Whose Time Has Come.The Primary Cilium, in: Sloboda, R.D. (Ed.), Methods in Cell Biology, Primary Cilia. Academic Press, pp. 2–52. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)94001-2

Bloodgood, R.A., 2009b. From central to rudimentary to primary: the history of an underappreciated organelle whose time has come. The primary cilium. Methods Cell Biol 94, 3–52. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)94001-2

Boehlke, C., Bashkurov, M., Buescher, A., Krick, T., John, A.-K., Nitschke, R., Walz, G., Kuehn, E.W., 2010. Differential role of Rab proteins in ciliary trafficking: Rab23 regulates Smoothened levels. Journal of Cell Science 123, 1460–1467. https://doi.org/10.1242/jcs.058883

Boukhalfa, A., Nascimbeni, A.C., Ramel, D., Dupont, N., Hirsch, E., Gayral, S., Laffargue, M., Codogno, P., Morel, E., 2020. PI3KC2α-dependent and VPS34-independent generation of PI3P controls primary cilium-mediated autophagy in response to shear stress. Nat Commun 11, 294. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14086-1

Boycott, K.M., Rath, A., Chong, J.X., Hartley, T., Alkuraya, F.S., Baynam, G., Brookes, A.J., Brudno, M., Carracedo, A., den Dunnen, J.T., Dyke, S.O.M., Estivill, X., Goldblatt, J., Gonthier, C., Groft, S.C., Gut, I., Hamosh, A., Hieter, P., Höhn, S., Hurles, M.E., Kaufmann, P., Knoppers, B.M., Krischer, J.P., Macek, M., Matthijs, G., Olry, A., Parker, S., Paschall, J., Philippakis, A.A., Rehm, H.L., Robinson, P.N., Sham, P.-C., Stefanov, R., Taruscio, D., Unni, D., Vanstone, M.R., Zhang, F., Brunner, H., Bamshad, M.J., Lochmüller, H., 2017. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. The American Journal of Human Genetics 100, 695–705. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.04.003

Boycott, K.M., Vanstone, M.R., Bulman, D.E., MacKenzie, A.E., 2013. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. Nat Rev Genet 14, 681–691. https://doi.org/10.1038/nrg3555

Boyling, A., Perez-Siles, G., Kennerson, M.L., 2022. Structural Variation at a Disease Mutation Hotspot: Strategies to Investigate Gene Regulation and the 3D Genome. Frontiers in Genetics 13.

Briscoe, J., Thérond, P.P., 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 14, 416–429. https://doi.org/10.1038/nrm3598

Bujakowska, K.M., Zhang, Q., Siemiatkowska, A.M., Liu, Q., Place, E., Falk, M.J., Consugar, M., Lancelot, M.-E., Antonio, A., Lonjou, C., Carpentier, W., Mohand-Saïd, S., den Hollander, A.I., Cremers, F.P.M., Leroy, B.P., Gai, X., Sahel, J.-A., van den Born, L.I., Collin, R.W.J., Zeitz, C., Audo, I., Pierce, E.A., 2015. Mutations in IFT172 cause isolated retinal degeneration and Bardet-Biedl syndrome. Hum Mol Genet 24, 230–242. https://doi.org/10.1093/hmg/ddu441

Butler, M.G., Miller, J.L., Forster, J.L., 2019. Prader-Willi Syndrome - Clinical Genetics, Diagnosis and Treatment Approaches: An Update. Curr Pediatr Rev 15, 207–244. https://doi.org/10.2174/1573396315666190716120925

Campa, C.C., Franco, I., Hirsch, E., 2015. PI3K-C2α: One enzyme for two products coupling vesicle trafficking and signal transduction. FEBS Letters 589, 1552–1558. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.001

Canty, J.T., Tan, R., Kusakci, E., Fernandes, J., Yildiz, A., 2021. Structure and Mechanics of Dynein Motors. Annu Rev Biophys 50, 549–574. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-111020-101511

Carss, K.J., Arno, G., Erwood, M., Stephens, J., Sanchis-Juan, A., Hull, S., Megy, K., Grozeva, D., Dewhurst, E., Malka, S., Plagnol, V., Penkett, C., Stirrups, K., Rizzo, R., Wright, G., Josifova, D., Bitner-Glindzicz, M., Scott, R.H., Clement, E., Allen, L., Armstrong, R., Brady, A.F., Carmichael, J., Chitre, M., Henderson, R.H.H., Hurst, J., MacLaren, R.E., Murphy, E., Paterson, J., Rosser, E., Thompson, D.A., Wakeling, E., Ouwehand, W.H., Michaelides, M., Moore, A.T., Aitman, T., Alachkar, H., Ali, S., Allen, L., Allsup, D., Ambegaonkar, G., Anderson, J., Antrobus, R., Armstrong, R., Arno, G., Arumugakani, G., Ashford, S., Astle, W., Attwood, A., Austin, S., Bacchelli, C., Bakchoul, T., Bariana, T.K., Baxendale, H., Bennett, D., Bethune, C., Bibi, S., Bitner-Glindzicz, M., Bleda, M., Boggard, H., Bolton-Maggs, P., Booth, C., Bradley, J.R., Brady, A., Brown, M., Browning, M., Bryson, C., Burns, S., Calleja, P., Canham, N., Carmichael, J., Carss, K., Caulfield, M., Chalmers, E., Chandra, A., Chinnery, P., Chitre, M., Church, C., Clement, E., Clements-Brod, N., Clowes, V., Coghlan, G., Collins, P., Cooper, N., Creaser-Myers, A., DaCosta, R., Daugherty, L., Davies, S., Davis, J., De Vries, M., Deegan, P., Deevi, S.V.V., Deshpande, C., Devlin, L., Dewhurst, E., Doffinger, R., Dormand, N., Drewe, E., Edgar, D., Egner, W., Erber, W.N., Erwood, M., Everington, T., Favier, R., Firth, H., Fletcher, D., Flinter, F., Fox, J.C., Frary, A., Freson, K., Furie, B., Furnell, A., Gale, D., Gardham, A., Gattens, M., Ghali, N., Ghataorhe, P.K., Ghurye, R., Gibbs, S., Gilmour, K., Gissen, P., Goddard, S., Gomez, K., Gordins, P., Gräf, S., Greene, D., Greenhalgh, A., Greinacher, A., Grigoriadou, S., Grozeva, D., Hackett, S., Hadinnapola, C., Hague, R., Haimel, M., Halmagyi, C., Hammerton, T., Hart, D., Hayman, G., Heemskerk, J.W.M., Henderson, R., Hensiek, A., Henskens, Y., Herwadkar, A., Holden, S., Holder, M., Holder, S., Hu, F., Huissoon, A., Humbert, M., Hurst, J., James, R., Jolles, S., Josifova, D., Kazmi, R., Keeling, D., Kelleher, P., Kelly, A.M., Kennedy, F., Kiely, D., Kingston, N., Koziell, A., Krishnakumar, D., Kuijpers, T.W., Kumararatne, D., Kurian, M., Laffan, M.A., Lambert, M.P., Allen, H.L., Lawrie, A., Lear, S., Lees, M., Lentaigne, C., Liesner, R., Linger, R., Longhurst, H., Lorenzo, L., Machado, R., Mackenzie, R., MacLaren, R., Maher, E., Maimaris, J., Mangles, S., Manson, A., Mapeta, R., Markus, H.S., Martin, J., Masati, L., Mathias, M., Matser, V., Maw, A., McDermott, E., McJannet, C., Meacham, S., Meehan, S., Megy, K., Mehta, S., Michaelides, M., Millar, C.M., Moledina, S., Moore, A., Morrell, N., Mumford, A., Murng, S., Murphy, E., Nejentsev, S., Noorani, S., Nurden, P., Oksenhendler, E., Ouwehand, W.H., Papadia, S., Park, S.-M., Parker, A., Pasi, J., Patch, C., Paterson, J., Payne, J., Peacock, A., Peerlinck, K., Penkett, C.J., Pepke-Zaba, J., Perry, D.J., Pollock, V., Polwarth, G., Ponsford, M., Qasim, W., Quinti, I., Rankin, S., Rankin, J., Raymond, F.L., Rehnstrom, K., Reid, E., Rhodes, C.J., Richards, M., Richardson, S., Richter, A., Roberts, I.,

Rondina, M., Rosser, E., Roughley, C., Rue-Albrecht, K., Samarghitean, C., Sanchis-Juan, A., Sandford, R., Santra, S., Sargur, R., Savic, S., Schulman, S., Schulze, H., Scott, R., Scully, M., Seneviratne, S., Sewell, C., Shamardina, O., Shipley, D., Simeoni, I., Sivapalaratnam, S., Smith, K., Sohal, A., Southgate, L., Staines, S., Staples, E., Stauss, H., Stein, P., Stephens, J., Stirrups, K., Stock, S., Suntharalingam, J., Tait, R.C., Talks, K., Tan, Y., Thachil, J., Thaventhiran, J., Thomas, E., Thomas, M., Thompson, D., Thrasher, A., Tischkowitz, M., Titterton, C., Toh, C.-H., Toshner, M., Treacy, C., Trembath, R., Tuna, S., Turek, W., Turro, E., Van Geet, C., Veltman, M., Vogt, J., von Ziegenweldt, J., Vonk Noordegraaf, A., Wakeling, E., Wanjiku, I., Warner, T.Q., Wassmer, E., Watkins, H., Webster, A., Welch, S., Westbury, S., Wharton, J., Whitehorn, D., Wilkins, M., Willcocks, L., Williamson, C., Woods, G., Wort, J., Yeatman, N., Yong, P., Young, T., Yu, P., Webster, A.R., Raymond, F.L., 2017. Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. The American Journal of Human Genetics 100, 75–90. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.12.003

Castro-Sánchez, S., Álvarez-Satta, M., Cortón, M., Guillén, E., Ayuso, C., Valverde, D., 2015. Exploring genotype-phenotype relationships in Bardet-Biedl syndrome families. J Med Genet 52, 503–513. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103099

Castro-Sánchez, S., Suarez-Bregua, P., Novas, R., Álvarez-Satta, M., Badano, J.L., Rotllant, J., Valverde, D., 2019. Functional analysis of new human Bardet-Biedl syndrome loci specific variants in the zebrafish model. Sci Rep 9, 12936. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49217-7

Cavaillé, M., Ponelle-Chachuat, F., Uhrhammer, N., Viala, S., Gay-Bellile, M., Privat, M., Bidet, Y., Bignon, Y.-J., 2018. Early Onset Multiple Primary Tumors in Atypical Presentation of Cowden Syndrome Identified by Whole-Exome-Sequencing. Frontiers in Genetics 9.

Chen, I.Y., Matsa, E., Wu, J.C., 2016. Induced pluripotent stem cells: at the heart of cardiovascular precision medicine. Nat Rev Cardiol 13, 333–349. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.36

Chen, R., Shi, L., Hakenberg, J., Naughton, B., Sklar, P., Zhang, J., Zhou, H., Tian, L., Prakash, O., Lemire, M., Sleiman, P., Cheng, W.-Y., Chen, W., Shah, H., Shen, Y., Fromer, M., Omberg, L., Deardorff, M.A., Zackai, E., Bobe, J.R., Levin, E., Hudson, T.J., Groop, L., Wang, J., Hakonarson, H., Wojcicki, A., Diaz, G.A., Edelmann, L., Schadt, E.E., Friend, S.H., 2016. Analysis of 589,306 genomes identifies individuals resilient to severe Mendelian childhood diseases. Nat Biotechnol 34, 531–538. https://doi.org/10.1038/nbt.3514

Cherella, C.E., Wassner, A.J., 2020. Update on congenital hypothyroidism. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 27, 63–69. https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000520

Choi, M., Scholl, U.I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I.R., Zumbo, P., Nayir, A., Bakkaloğlu, A., Ozen, S., Sanjad, S., Nelson-Williams, C., Farhi, A., Mane, S., Lifton, R.P., 2009. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 19096–19101. https://doi.org/10.1073/pnas.0910672106

Choi, Y., Chan, A.P., 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. Bioinformatics 31, 2745–2747. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195

Chou, H.-T., Apelt, L., Farrell, D.P., White, S.R., Woodsmith, J., Svetlov, V., Goldstein, J.S., Nager, A.R., Li, Z., Muller, J., Dollfus, H., Nudler, E., Stelzl, U., DiMaio, F., Nachury, M.V., Walz, T., 2019. The Molecular Architecture of Native BBSome Obtained by an Integrated Structural Approach. Structure 27, 1384-1394.e4. https://doi.org/10.1016/j.str.2019.06.006

Choudhury, A.R., Munonye, I., Sanu, K.P., Islam, N., Gadaga, C., 2021. A review of Alström syndrome: a rare monogenic ciliopathy. Intractable Rare Dis Res 10, 257–262. https://doi.org/10.5582/irdr.2021.01113

Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.-C., Waterfield, M.D., Backer, J.M., Zerial, M., 1999. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. Nat Cell Biol 1, 249–252. https://doi.org/10.1038/12075

Cole, D.G., Diener, D.R., Himelblau, A.L., Beech, P.L., Fuster, J.C., Rosenbaum, J.L., 1998. Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in Caenorhabditis elegans sensory neurons. J Cell Biol 141, 993–1008. https://doi.org/10.1083/jcb.141.4.993

Collins, R.L., Brand, H., Karczewski, K.J., Zhao, X., Alföldi, J., Francioli, L.C., Khera, A.V., Lowther, C., Gauthier, L.D., Wang, H., Watts, N.A., Solomonson, M., O'Donnell-Luria, A., Baumann, A., Munshi, R., Walker, M., Whelan, C.W., Huang, Y., Brookings, T., Sharpe, T., Stone, M.R., Valkanas, E., Fu, J., Tiao, G., Laricchia, K.M., Ruano-Rubio, V., Stevens, C., Gupta, N., Cusick, C., Margolin, L., Taylor, K.D., Lin, H.J., Rich, S.S., Post, W.S., Chen, Y.-D.I., Rotter, J.I., Nusbaum, C., Philippakis, A., Lander, E., Gabriel, S., Neale, B.M., Kathiresan, S., Daly, M.J., Banks, E., MacArthur, D.G., Talkowski, M.E., 2020. A structural variation reference for medical and population genetics. Nature 581, 444–451. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2287-8

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819–823. https://doi.org/10.1126/science.1231143

Costa, F.F., 2014. Big data in biomedicine. Drug Discov Today 19, 433–440. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.10.012

Costanzo, M., Kuzmin, E., van Leeuwen, J., Mair, B., Moffat, J., Boone, C., Andrews, B., 2019. Global Genetic Networks and the Genotype-to-Phenotype Relationship. Cell 177, 85–100. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.033

Cring, M.R., Meyer, K.J., Searby, C.C., Hedberg-Buenz, A., Cave, M., Anderson, M.G., Wang, K., Sheffield, V.C., 2022. Ectopic expression of BBS1 rescues male infertility, but not retinal degeneration, in a BBS1 mouse model. Gene Ther 29, 227–235. https://doi.org/10.1038/s41434-021-00241-1

Cummings, B.B., Marshall, J.L., Tukiainen, T., Lek, M., Donkervoort, S., Foley, A.R., Bolduc, V., Waddell, L.B., Sandaradura, S.A., O'Grady, G.L., Estrella, E., Reddy, H.M., Zhao, F., Weisburd, B., Karczewski, K.J., O'Donnell-Luria, A.H., Birnbaum, D., Sarkozy, A., Hu, Y., Gonorazky, H., Claeys, K., Joshi, H., Bournazos, A., Oates, E.C., Ghaoui, R., Davis, M.R., Laing, N.G., Topf, A., Genotype-Tissue Expression Consortium, Kang, P.B., Beggs, A.H., North, K.N., Straub, V., Dowling, J.J., Muntoni, F., Clarke, N.F., Cooper, S.T., Bönnemann, C.G., MacArthur, D.G., 2017. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. Sci Transl Med 9, eaal5209. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal5209

Czarnecki, P.G., Shah, J.V., 2012. The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. Trends Cell Biol 22, 201–210. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.02.001

Dabdoub, A., Kelley, M.W., 2005. Planar cell polarity and a potential role for a Wnt morphogen gradient in stereociliary bundle orientation in the mammalian inner ear. J Neurobiol 64, 446–457. https://doi.org/10.1002/neu.20171

Dam, J., 2018. Trafic et signalisation du récepteur de la leptine. Biologie Aujourd'hui 212, 35–43. https://doi.org/10.1051/jbio/2018020

Darcha, C., Laffargue, F., Boutaud, L., Gallot, D., Dauphin, C., Garcier, J.M., Achaiaa, A., Nitschke, P., Fourrage, C., Goumy, C., Attie-Bitach, T., 2021. Novel CDK10 variants with multicystic dysplastic kidney, left ventricular non-compaction, and a solitary median maxillary central incisor. Clin Genet 100, 348–349. https://doi.org/10.1111/cge.13996

Das, M., Scappini, E., Martin, N.P., Wong, K.A., Dunn, S., Chen, Y.-J., Miller, S.L.H., Domin, J., O'Bryan, J.P., 2007. Regulation of neuron survival through an intersectin-phosphoinositide 3'-kinase C2beta-AKT pathway. Mol Cell Biol 27, 7906–7917. https://doi.org/10.1128/MCB.01369-07

Davidson, B.A., Hassan, S., Garcia, E.J., Tayebi, N., Sidransky, E., 2018. Exploring genetic modifiers of Gaucher disease: The next horizon. Hum Mutat 39, 1739–1751. https://doi.org/10.1002/humu.23611

Davis, R.E., Swiderski, R.E., Rahmouni, K., Nishimura, D.Y., Mullins, R.F., Agassandian, K., Philp, A.R., Searby, C.C., Andrews, M.P., Thompson, S., Berry, C.J., Thedens, D.R., Yang, B., Weiss, R.M., Cassell, M.D., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2007. A knockin mouse model of the Bardet–Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly, retinopathy, and obesity. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 19422–19427. https://doi.org/10.1073/pnas.0708571104

Delgehyr, N., Spassky, N., 2014. Cil primaire, cycle cellulaire et prolifération. Med Sci (Paris) 30, 976–979. https://doi.org/10.1051/medsci/20143011011

Delvallée, C., Dollfus, H., 2023. Retinal Degeneration Animal Models in Bardet–Biedl Syndrome and Related Ciliopathies. Cold Spring Harb Perspect Med 13, a041303. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041303

Delvallée, C., Nicaise, S., Antin, M., Leuvrey, A.-S., Nourisson, E., Leitch, C.C., Kellaris, G., Stoetzel, C., Geoffroy, V., Scheidecker, S., Keren, B., Depienne, C., Klar, J., Dahl, N., Deleuze, J.-F., Génin, E., Redon, R., Demurger, F., Devriendt, K., Mathieu-Dramard, M., Poitou-Bernert, C., Odent, S., Katsanis, N., Mandel, J.-L., Davis, E.E., Dollfus, H., Muller, J., 2021. A BBS1 SVA F retrotransposon insertion is a frequent cause of Bardet-Biedl syndrome. Clin Genet 99, 318–324. https://doi.org/10.1111/cge.13878

den Hollander, A.I., Koenekoop, R.K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M.L., Voesenek, K.E.J., Zonneveld, M.N., Strom, T.M., Meitinger, T., Brunner, H.G., Hoyng, C.B., van den Born, L.I., Rohrschneider, K., Cremers, F.P.M., 2006. Mutations in the CEP290 (NPHP6) Gene Are a Frequent Cause of Leber Congenital Amaurosis. The American Journal of Human Genetics 79, 556–561. https://doi.org/10.1086/507318

Denef, N., Neubüser, D., Perez, L., Cohen, S.M., 2000. Hedgehog Induces Opposite Changes in Turnover and Subcellular Localization of Patched and Smoothened. Cell 102, 521–531. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00056-8

Denniston, A.K., Beales, P.L., Tomlins, P.J., Good, P., Langford, M., Foggensteiner, L., Williams, D., Tsaloumas, M.D., 2014. EVALUATION OF VISUAL FUNCTION AND NEEDS IN ADULT PATIENTS WITH BARDET–BIEDL SYNDROME. RETINA 34, 2282. https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000222

Dessaud, E., McMahon, A.P., Briscoe, J., 2008. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. Development 135, 2489–2503. https://doi.org/10.1242/dev.009324

Devereaux, K., Dall'Armi, C., Alcazar-Roman, A., Ogasawara, Y., Zhou, X., Wang, F., Yamamoto, A., Camilli, P.D., Paolo, G.D., 2013. Regulation of Mammalian Autophagy by Class II and III PI 3-

Kinases through PI3P Synthesis. PLOS ONE 8, e76405. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076405

DGOS, 2023. Les maladies rares [WWW Document]. Ministère de la Santé et de la Prévention. URL https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/maladies-rares/article/les-maladies-rares (accessed 8.11.23).

DiStefano, J.K., Kingsley, C.B., 2018. Identification of Disease Susceptibility Alleles in the Next Generation Sequencing Era. Methods Mol Biol 1706, 3–16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_1

Djordjevic, S., Driscoll, P.C., 2002. Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. Trends Biochem Sci 27, 426–432. https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02136-9

Domingo, J., Baeza-Centurion, P., Lehner, B., 2019. The Causes and Consequences of Genetic Interactions (Epistasis). Annu Rev Genomics Hum Genet 20, 433–460. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118-014857

Doornbos, C., van Beek, R., Bongers, E.M.H.F., Lugtenberg, D., Klaren, P.H.M., Vissers, L.E.L.M., Roepman, R., Oud, M.M., 2021. Cell-based assay for ciliopathy patients to improve accurate diagnosis using ALPACA. Eur J Hum Genet 29, 1677–1689. https://doi.org/10.1038/s41431-021-00907-9

Dremsek, P., Schwarz, T., Weil, B., Malashka, A., Laccone, F., Neesen, J., 2021. Optical Genome Mapping in Routine Human Genetic Diagnostics—Its Advantages and Limitations. Genes 12, 1958. https://doi.org/10.3390/genes12121958

Duncan, J.L., Pierce, E.A., Laster, A.M., Daiger, S.P., Birch, D.G., Ash, J.D., Iannaccone, A., Flannery, J.G., Sahel, J.A., Zack, D.J., Zarbin, M.A., and the Foundation Fighting Blindness Scientific Advisory Board, 2018. Inherited Retinal Degenerations: Current Landscape and Knowledge Gaps. Translational Vision Science & Technology 7, 6. https://doi.org/10.1167/tvst.7.4.6

Düster, R., Ji, Y., Pan, K.-T., Urlaub, H., Geyer, M., 2022. Functional characterization of the human Cdk10/Cyclin Q complex. Open Biol 12, 210381. https://doi.org/10.1098/rsob.210381

Elawad, O.A.M.A., Dafallah, M.A., Ahmed, Mohammed Mahgoub Mirghani, Albashir, A.A.D., Abdalla, S.M.A., Yousif, H.H.M., Daw Elbait, A.A.E., Mohammed, M.E., Ali, H.I.H., Ahmed, Mohamed Mutasim Mohamed, Mohammed, N.F.N., Osman, F.H.M., Mohammed, M.A.Y., Abu Shama, E.A.E., 2022. Bardet-Biedl syndrome: a case series. J Med Case Rep 16, 169. https://doi.org/10.1186/s13256-022-03396-6

Estrada-Cuzcano, A., Etard, C., Delvallée, C., Stoetzel, C., Schaefer, E., Scheidecker, S., Geoffroy, V., Schneider, A., Studer, F., Mattioli, F., Chennen, K., Sigaudy, S., Plassard, D., Poch, O., Piton, A., Strahle, U., Muller, J., Dollfus, H., 2020. Novel IQCE variations confirm its role in postaxial polydactyly and cause ciliary defect phenotype in zebrafish. Hum. Mutat. 41, 240–254. https://doi.org/10.1002/humu.23924

Estrada-Cuzcano, A., Koenekoop, R.K., Senechal, A., De Baere, E.B.W., de Ravel, T., Banfi, S., Kohl, S., Ayuso, C., Sharon, D., Hoyng, C.B., Hamel, C.P., Leroy, B.P., Ziviello, C., Lopez, I., Bazinet, A., Wissinger, B., Sliesoraityte, I., Avila-Fernandez, A., Littink, K.W., Vingolo, E.M., Signorini, S., Banin, E., Mizrahi-Meissonnier, L., Zrenner, E., Kellner, U., Collin, R.W.J., den Hollander, A.I., Cremers, F.P.M., Klevering, B.J., 2012. BBS1 mutations in a wide spectrum of phenotypes ranging from nonsyndromic retinitis pigmentosa to Bardet-Biedl syndrome. Arch Ophthalmol 130, 1425–1432. https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2012.2434

Everson, J.L., Fink, D.M., Chung, H.M., Sun, M.R., Lipinski, R.J., 2018. Identification of sonic hedgehog-regulated genes and biological processes in the cranial neural crest mesenchyme by comparative transcriptomics. BMC Genomics 19, 497. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4885-5

Falasca, M., Maffucci, T., 2012. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. Biochemical Journal 443, 587–601. https://doi.org/10.1042/BJ20120008

Farag, T.I., Teebi, A.S., 1989. High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. Clin Genet 36, 463–464. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1989.tb03378.x

Feng, S., Knödler, A., Ren, J., Zhang, J., Zhang, X., Hong, Y., Huang, S., Peränen, J., Guo, W., 2012. A Rab8 Guanine Nucleotide Exchange Factor-Effector Interaction Network Regulates Primary Ciliogenesis*. Journal of Biological Chemistry 287, 15602–15609. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333245

Ferreira, C.R., van Karnebeek, C.D.M., 2019. Chapter 22 - Inborn errors of metabolism, in: de Vries, L.S., Glass, H.C. (Eds.), Handbook of Clinical Neurology, Neonatal Neurology. Elsevier, pp. 449–481. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00022-9

Focșa, I.O., Budișteanu, M., Bălgrădean, M., 2021. Clinical and genetic heterogeneity of primary ciliopathies (Review). International Journal of Molecular Medicine 48, 1–15. https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5009

Forbes, T.A., Howden, S.E., Lawlor, K., Phipson, B., Maksimovic, J., Hale, L., Wilson, S., Quinlan, C., Ho, G., Holman, K., Bennetts, B., Crawford, J., Trnka, P., Oshlack, A., Patel, C., Mallett, A., Simons, C., Little, M.H., 2018. Patient-iPSC-Derived Kidney Organoids Show Functional Validation of a Ciliopathic Renal Phenotype and Reveal Underlying Pathogenetic Mechanisms. The American Journal of Human Genetics 102, 816–831. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.014

Forsyth, R., Gunay-Aygun, M., 1993. Bardet-Biedl Syndrome Overview, in: Adam, M.P., Everman, D.B., Mirzaa, G.M., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Gripp, K.W., Amemiya, A. (Eds.), GeneReviews®. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).

Forsythe, E., Beales, P.L., 2013. Bardet-Biedl syndrome. Eur J Hum Genet 21, 8–13. https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.115

Forsythe, E., Kenny, J., Bacchelli, C., Beales, P.L., 2018. Managing Bardet-Biedl Syndrome-Now and in the Future. Front Pediatr 6, 23. https://doi.org/10.3389/fped.2018.00023

Fougerat, A., Gayral, S., Malet, N., Briand-Mesange, F., Breton-Douillon, M., Laffargue, M., 2009. Phosphoinositide 3-kinases and their role in inflammation: potential clinical targets in atherosclerosis? Clin Sci (Lond) 116, 791–804. https://doi.org/10.1042/CS20080549

Franco, I., Gulluni, F., Campa, C.C., Costa, C., Margaria, J.P., Ciraolo, E., Martini, M., Monteyne, D., De Luca, E., Germena, G., Posor, Y., Maffucci, T., Marengo, S., Haucke, V., Falasca, M., Perez-Morga, D., Boletta, A., Merlo, G.R., Hirsch, E., 2014. PI3K Class II α Controls Spatially Restricted Endosomal PtdIns3P and Rab11 Activation to Promote Primary Cilium Function. Developmental Cell 28, 647–658. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.022

Fry, A.M., Leaper, M.J., Bayliss, R., 2014. The primary cilium: guardian of organ development and homeostasis. Organogenesis 10, 62–68. https://doi.org/10.4161/org.28910

Gaidarov, I., Zhao, Y., Keen, J.H., 2005. Individual phosphoinositide 3-kinase C2alpha domain activities independently regulate clathrin function. J Biol Chem 280, 40766–40772. https://doi.org/10.1074/jbc.M507731200

Galarreta, C.I., Kennedy, C., Blair, D.R., Slavotinek, A., 2022. Expanding the phenotype of PIK3C2A related syndrome: Report of two siblings with novel features and genotype. American Journal of Medical Genetics Part A 188, 2724–2731. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62881

Garcia-Gonzalo, F.R., Reiter, J.F., 2017. Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. Cold Spring Harb Perspect Biol 9, a028134. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028134

Garcia-Gonzalo, F.R., Reiter, J.F., 2012. Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. J Cell Biol 197, 697–709. https://doi.org/10.1083/jcb.201111146

Gentyane [WWW Document], n.d. URL https://gentyane.clermont.inrae.fr/contenu/carte-optique-sur-bionano-genomics-saphyr (accessed 8.1.23).

Geoffroy, V., Stoetzel, C., Scheidecker, S., Schaefer, E., Perrault, I., Bär, S., Kröll, A., Delbarre, M., Antin, M., Leuvrey, A.-S., Henry, C., Blanché, H., Decker, E., Kloth, K., Klaus, G., Mache, C., Martin-Coignard, D., McGinn, S., Boland, A., Deleuze, J.-F., Friant, S., Saunier, S., Rozet, J.-M., Bergmann, C., Dollfus, H., Muller, J., 2018. Whole-genome sequencing in patients with ciliopathies uncovers a novel recurrent tandem duplication in IFT140. Human Mutation 39, 983–992. https://doi.org/10.1002/humu.23539

Ghossoub, R., Molla-Herman, A., Bastin, P., Benmerah, A., 2011. The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. Biol Cell 103, 131–144. https://doi.org/10.1042/BC20100128

Goetz, S.C., Anderson, K.V., 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. Nat Rev Genet 11, 331–344. https://doi.org/10.1038/nrg2774

Goetz, S.C., Ocbina, P.J.R., Anderson, K.V., 2009. The primary cilium as a Hedgehog signal transduction machine. Methods Cell Biol 94, 199–222. https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)94010-3

Gorivodsky, M., Mukhopadhyay, M., Wilsch-Braeuninger, M., Phillips, M., Teufel, A., Kim, C., Malik, N., Huttner, W., Westphal, H., 2009. Intraflagellar transport protein 172 is essential for primary cilia formation and plays a vital role in patterning the mammalian brain. Dev Biol 325, 24–32. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.09.019

Goto, H., Inaba, H., Inagaki, M., 2017. Mechanisms of ciliogenesis suppression in dividing cells. Cell Mol Life Sci 74, 881–890. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2369-9

Gouronc, A., Zilliox, V., Jacquemont, M.-L., Darcel, F., Leuvrey, A.-S., Nourisson, E., Antin, M., Alessandri, J.-L., Doray, B., Gueguen, P., Payet, F., Randrianaivo, H., Stoetzel, C., Scheidecker, S., Flodrops, H., Dollfus, H., Muller, J., 2020. High prevalence of Bardet-Biedl syndrome in La Réunion Island is due to a founder variant in ARL6/BBS3. Clin. Genet. https://doi.org/10.1111/cge.13768

Grudzinska Pechhacker, M.K., Jacobson, S.G., Drack, A.V., Scipio, M.D., Strubbe, I., Pfeifer, W., Duncan, J.L., Dollfus, H., Goetz, N., Muller, J., Vincent, A.L., Aleman, T.S., Tumber, A., Van Cauwenbergh, C., De Baere, E., Bedoukian, E., Leroy, B.P., Maynes, J.T., Munier, F.L., Tavares, E., Saleh, E., Vincent, A., Heon, E., 2021. Comparative Natural History of Visual Function From Patients With Biallelic Variants in BBS1 and BBS10. Invest Ophthalmol Vis Sci 62, 26. https://doi.org/10.1167/iovs.62.15.26

Guen, V.J., Edvardson, S., Fraenkel, N.D., Fattal-Valevski, A., Jalas, C., Anteby, I., Shaag, A., Dor, T., Gillis, D., Kerem, E., Lees, J.A., Colas, P., Elpeleg, O., 2018. A homozygous deleterious CDK10 mutation in a patient with agenesis of corpus callosum, retinopathy, and deafness. Am J Med Genet A 176, 92–98. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38506

Guen, V.J., Gamble, C., Flajolet, M., Unger, S., Thollet, A., Ferandin, Y., Superti-Furga, A., Cohen, P.A., Meijer, L., Colas, P., 2013. CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 19525–19530. https://doi.org/10.1073/pnas.1306814110

Guen, V.J., Gamble, C., Lees, J.A., Colas, P., 2017. The awakening of the CDK10/Cyclin M protein kinase. Oncotarget 8, 50174–50186. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15024

Guen, V.J., Gamble, C., Perez, D.E., Bourassa, S., Zappel, H., Gärtner, J., Lees, J.A., Colas, P., 2016. STAR syndrome-associated CDK10/Cyclin M regulates actin network architecture and ciliogenesis. Cell Cycle 15, 678–688. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1147632

Guo, D.-F., Cui, H., Zhang, Q., Morgan, D.A., Thedens, D.R., Nishimura, D., Grobe, J.L., Sheffield, V.C., Rahmouni, K., 2016. The BBSome Controls Energy Homeostasis by Mediating the Transport of the Leptin Receptor to the Plasma Membrane. PLOS Genetics 12, e1005890. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005890

Guo, H., Liu, L., Nishiga, M., Cong, L., Wu, J.C., 2021. Deciphering pathogenicity of variants of uncertain significance with CRISPR-edited iPSCs. Trends in Genetics 37, 1109–1123. https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.08.009

Gupta, N., D'Acierno, M., Zona, E., Capasso, G., Zacchia, M., 2022. Bardet–Biedl syndrome: The pleiotropic role of the chaperonin-like BBS6, 10, and 12 proteins. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics 190, 9–19. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31970

Halbritter, J., Bizet, A.A., Schmidts, M., Porath, J.D., Braun, D.A., Gee, H.Y., McInerney-Leo, A.M., Krug, P., Filhol, E., Davis, E.E., Airik, R., Czarnecki, P.G., Lehman, A.M., Trnka, P., Nitschké, P., Bole-Feysot, C., Schueler, M., Knebelmann, B., Burtey, S., Szabó, A.J., Tory, K., Leo, P.J., Gardiner, B., McKenzie, F.A., Zankl, A., Brown, M.A., Hartley, J.L., Maher, E.R., Li, C., Leroux, M.R., Scambler, P.J., Zhan, S.H., Jones, S.J., Kayserili, H., Tuysuz, B., Moorani, K.N., Constantinescu, A., Krantz, I.D., Kaplan, B.S., Shah, J.V., UK10K Consortium, Hurd, T.W., Doherty, D., Katsanis, N., Duncan, E.L., Otto, E.A., Beales, P.L., Mitchison, H.M., Saunier, S., Hildebrandt, F., 2013. Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans. Am J Hum Genet 93, 915–925. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.012

Hammarsjö, A., Pettersson, M., Chitayat, D., Handa, A., Anderlid, B.-M., Bartocci, M., Basel, D., Batkovskyte, D., Beleza-Meireles, A., Conner, P., Eisfeldt, J., Girisha, K.M., Chung, B.H.-Y., Horemuzova, E., Hyodo, H., Korņejeva, L., Lagerstedt-Robinson, K., Lin, A.E., Magnusson, M., Moosa, S., Nayak, S.S., Nilsson, D., Ohashi, H., Ohashi-Fukuda, N., Stranneheim, H., Taylan, F., Traberg, R., Voss, U., Wirta, V., Nordgren, A., Nishimura, G., Lindstrand, A., Grigelioniene, G., 2021. High diagnostic yield in skeletal ciliopathies using massively parallel genome sequencing, structural variant screening and RNA analyses. J Hum Genet 66, 995–1008. https://doi.org/10.1038/s10038-021-00925-x

Harville, H.M., Held, S., Diaz-Font, A., Davis, E.E., Diplas, B.H., Lewis, R.A., Borochowitz, Z.U., Zhou, W., Chaki, M., MacDonald, J., Kayserili, H., Beales, P.L., Katsanis, N., Otto, E., Hildebrandt, F., 2010. Identification of 11 novel mutations in eight BBS genes by high-resolution homozygosity mapping. Journal of Medical Genetics 47, 262–267. https://doi.org/10.1136/jmg.2009.071365

Haslam, R.J., Koide, H.B., Hemmings, B.A., 1993. Pleckstrin domain homology. Nature 363, 309–310. https://doi.org/10.1038/363309b0

Hayeems, R.Z., Dimmock, D., Bick, D., Belmont, J.W., Green, R.C., Lanpher, B., Jobanputra, V., Mendoza, R., Kulkarni, S., Grove, M.E., Taylor, S.L., Ashley, E., 2020. Clinical utility of genomic sequencing: a measurement toolkit. npj Genom. Med. 5, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41525-020-00164-7

He, M., Agbu, S., Anderson, K.V., 2017. Microtubule Motors Drive Hedgehog Signaling in Primary Cilia. Trends in Cell Biology 27, 110–125. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.09.010

He, S., Liu, X., Ye, X., Tetsuya, S., 2022. Analysis of Drug Repositioning and Prediction Techniques: A Concise Review. Curr Top Med Chem 22, 1897–1906. https://doi.org/10.2174/1568026622666220317164016

He, X., He, Q., Yu, W., Huang, J., Yang, M., Chen, W., Han, W., 2021. Optimized protocol for high-titer lentivirus production and transduction of primary fibroblasts. Journal of Basic Microbiology 61, 430–442. https://doi.org/10.1002/jobm.202100008

Hendriks, W.T., Warren, C.R., Cowan, C.A., 2016. Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions. Cell Stem Cell 18, 53–65. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.002

Heng, E.Y.Z., Maffucci, T., 2022. An Overview of Class II Phosphoinositide 3-Kinases, in: Dominguez-Villar, M. (Ed.), PI3K and AKT Isoforms in Immunity : Mechanisms and Therapeutic Opportunities, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing, Cham, pp. 51–68. https://doi.org/10.1007/978-3-031-06566-8_2

Hernandez-Hernandez, V., Pravincumar, P., Diaz-Font, A., May-Simera, H., Jenkins, D., Knight, M., Beales, P.L., 2013. Bardet-Biedl syndrome proteins control the cilia length through regulation of actin polymerization. Hum Mol Genet 22, 3858–3868. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt241

Hey, C.A.B., Larsen, L.J., Tümer, Z., Brøndum-Nielsen, K., Grønskov, K., Hjortshøj, T.D., Møller, L.B., 2021. BBS Proteins Affect Ciliogenesis and Are Essential for Hedgehog Signaling, but Not for Formation of iPSC-Derived RPE-65 Expressing RPE-Like Cells. Int J Mol Sci 22. https://doi.org/10.3390/ijms22031345

Hichri, H., Stoetzel, C., Laurier, V., Caron, S., Sigaudy, S., Sarda, P., Hamel, C., Martin-Coignard, D., Gilles, M., Leheup, B., Holder, M., Kaplan, J., Bitoun, P., Lacombe, D., Verloes, A., Bonneau, D., Perrin-Schmitt, F., Brandt, C., Besancon, A.-F., Mandel, J.-L., Cossée, M., Dollfus, H., 2005. Testing for triallelism: analysis of six BBS genes in a Bardet–Biedl syndrome family cohort. Eur J Hum Genet 13, 607–616. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201372

Hjortshøj, T.D., Grønskov, K., Philp, A.R., Nishimura, D.Y., Riise, R., Sheffield, V.C., Rosenberg, T., Brøndum-Nielsen, K., 2010. Bardet-Biedl syndrome in Denmark—report of 13 novel sequence variations in six genes. Human Mutation 31, 429–436. https://doi.org/10.1002/humu.21204

Holmans, P.A., Massey, T.H., Jones, L., 2017. Genetic modifiers of Mendelian disease: Huntington's disease and the trinucleotide repeat disorders. Hum Mol Genet 26, R83–R90. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx261

Hu, J., Ng, P.C., 2013. SIFT Indel: Predictions for the Functional Effects of Amino Acid Insertions/Deletions in Proteins. PLOS ONE 8, e77940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077940

Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M.P., Nachury, M.V., Spiliotis, E.T., Nelson, W.J., 2010. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. Science 329, 436–439. https://doi.org/10.1126/science.1191054

Huangfu, D., Anderson, K.V., 2005. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 11325–11330. https://doi.org/10.1073/pnas.0505328102

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A.S., Murcia, N.S., Niswander, L., Anderson, K.V., 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. Nature 426, 83–87. https://doi.org/10.1038/nature02061

Humke, E.W., Dorn, K.V., Milenkovic, L., Scott, M.P., Rohatgi, R., 2010. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. Genes Dev. 24, 670–682. https://doi.org/10.1101/gad.1902910

Huyard, C., 2009. How did uncommon disorders become “rare diseases”? History of a boundary object. Sociol Health Illn 31, 463–477. https://doi.org/10.1111/j.1467-9566.2008.01143.x

Hyvönen, M., Macias, M.J., Nilges, M., Oschkinat, H., Saraste, M., Wilmanns, M., 1995. Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. EMBO J 14, 4676–4685. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00149.x

Imani, S., Cheng, J., Fu, Jiewen, Mobasher-Jannat, A., Wei, C., Mohazzab-Torabi, S., Jadidi, K., Khosravi, M.H., Shasaltaneh, M.D., Yang, L., Khan, M.A., Fu, Junjiang, 2019. Novel splicing variant c. 208+2T>C in BBS5 segregates with Bardet-Biedl syndrome in an Iranian family by targeted exome sequencing. Biosci. Rep. 39. https://doi.org/10.1042/BSR20181544

Imhoff, O., Marion, V., Stoetzel, C., Durand, M., Holder, M., Sigaudy, S., Sarda, P., Hamel, C.P., Brandt, C., Dollfus, H., Moulin, B., 2011. Bardet-Biedl syndrome: a study of the renal and cardiovascular phenotypes in a French cohort. Clin J Am Soc Nephrol 6, 22–29. https://doi.org/10.2215/CJN.03320410

Ishikawa, H., Thompson, J., Yates, J.R., Marshall, W.F., 2012. Proteomic analysis of mammalian primary cilia. Curr Biol 22, 414–419. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.031

Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., Inagaki, M., 2015. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. Cilia 4, 12. https://doi.org/10.1186/s13630-015-0021-1

Jamee, M., Moniri, S., Zaki-Dizaji, M., Olbrich, P., Yazdani, R., Jadidi-Niaragh, F., Aghamahdi, F., Abolhassani, H., Condliffe, A.M., Aghamohammadi, A., Azizi, G., 2020. Clinical, Immunological, and Genetic Features in Patients with Activated PI3Kδ Syndrome (APDS): a Systematic Review. Clin Rev Allergy Immunol 59, 323–333. https://doi.org/10.1007/s12016-019-08738-9

Janssen, S., Ramaswami, G., Davis, E.E., Hurd, T., Airik, R., Kasanuki, J.M., Van Der Kraak, L., Allen, S.J., Beales, P.L., Katsanis, N., Otto, E.A., Hildebrandt, F., 2011. Mutation analysis in Bardet–Biedl syndrome by DNA pooling and massively parallel resequencing in 105 individuals. Hum Genet 129, 79–90. https://doi.org/10.1007/s00439-010-0902-8

Jean, S., Cox, S., Schmidt, E.J., Robinson, F.L., Kiger, A., 2012. Sbf/MTMR13 coordinates PI(3)P and Rab21 regulation in endocytic control of cellular remodeling. MBoC 23, 2723–2740. https://doi.org/10.1091/mbc.e12-05-0375

Jean, S., Kiger, A.A., 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. J Cell Sci 127, 923–928. https://doi.org/10.1242/jcs.093773

Jean, S., Kiger, A.A., 2012. Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. Nat Rev Mol Cell Biol 13, 463–470. https://doi.org/10.1038/nrm3379

Johnson, K.A., Rosenbaum, J.L., 1992. Polarity of flagellar assembly in Chlamydomonas. J Cell Biol 119, 1605–1611. https://doi.org/10.1083/jcb.119.6.1605

Kanie, T., Abbott, K.L., Mooney, N.A., Plowey, E.D., Demeter, J., Jackson, P.K., 2017. The CEP19-RABL2 GTPase Complex Binds IFT-B to Initiate Intraflagellar Transport at the Ciliary Base. Developmental Cell 42, 22-36.e12. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.016

Karam, A., Delvallée, C., Estrada-Cuzcano, A., Geoffroy, V., Lamouche, J.-B., Leuvrey, A.-S., Nourisson, E., Tarabeux, J., Stoetzel, C., Scheidecker, S., Porter, L.F., Génin, E., Redon, R., Sandron, F., Boland, A., Deleuze, J.-F., Le May, N., Dollfus, H., Muller, J., 2023. WGS Revealed Novel BBS5 Pathogenic Variants, Missed by WES, Causing Ciliary Structure and Function Defects. International Journal of Molecular Sciences 24, 8729. https://doi.org/10.3390/ijms24108729

Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G., Cummings, B.B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R.L., Laricchia, K.M., Ganna, A., Birnbaum, D.P., Gauthier, L.D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N.A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E.M., Seaby, E.G., Kosmicki, J.A., Walters, R.K., Tashman, K., Farjoun, Y., Banks, E., Poterba, T., Wang, A., Seed, C., Whiffin, N., Chong, J.X., Samocha, K.E., Pierce-Hoffman, E., Zappala, Z., O'Donnell-Luria, A.H., Minikel, E.V., Weisburd, B., Lek, M., Ware, J.S., Vittal, C., Armean, I.M., Bergelson, L., Cibulskis, K., Connolly, K.M., Covarrubias, M., Donnelly, S., Ferriera, S., Gabriel, S., Gentry, J., Gupta, N., Jeandet, T., Kaplan, D., Llanwarne, C., Munshi, R., Novod, S., Petrillo, N., Roazen, D., Ruano-Rubio, V., Saltzman, A., Schleicher, M., Soto, J., Tibbetts, K., Tolonen, C., Wade, G., Talkowski, M.E., Neale, B.M., Daly, M.J., MacArthur, D.G., 2020. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature 581, 434–443. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7

Kasahara, K., Inagaki, M., 2021. Primary ciliary signaling: links with the cell cycle. Trends in Cell Biology 31, 954–964. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.009

Kasten, M., Giordano, A., 2001. Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. Oncogene 20, 1832–1838. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204295

Katsanis, N., Ansley, S.J., Badano, J.L., Eichers, E.R., Lewis, R.A., Hoskins, B.E., Scambler, P.J., Davidson, W.S., Beales, P.L., Lupski, J.R., 2001. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. Science 293, 2256–2259. https://doi.org/10.1126/science.1063525

Keppler-Noreuil, K.M., Rios, J.J., Parker, V.E.R., Semple, R.K., Lindhurst, M.J., Sapp, J.C., Alomari, A., Ezaki, M., Dobyns, W., Biesecker, L.G., 2015. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. Am J Med Genet A 167A, 287–295. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36836

Kerr, W.G., Pedicone, C., Dormann, S., Pacherille, A., Chisholm, J.D., 2020. Small molecule targeting of SHIP1 and SHIP2. Biochemical Society Transactions 48, 291–300. https://doi.org/10.1042/BST20190775

Khan, S. a., Muhammad, N., Khan, M. a., Kamal, A., Rehman, Z. u., Khan, S., 2016. Genetics of human Bardet–Biedl syndrome, an updates. Clinical Genetics 90, 3–15. https://doi.org/10.1111/cge.12737

Khanna, H., Davis, E.E., Murga-Zamalloa, C.A., Estrada-Cuzcano, A., Lopez, I., den Hollander, A.I., Zonneveld, M.N., Othman, M.I., Waseem, N., Chakarova, C.F., Maubaret, C., Diaz-Font, A., MacDonald, I., Muzny, D.M., Wheeler, D.A., Morgan, M., Lewis, L.R., Logan, C.V., Tan, P.L., Beer, M.A., Inglehearn, C.F., Lewis, R.A., Jacobson, S.G., Bergmann, C., Beales, P.L., Attié-Bitach, T., Johnson, C.A., Otto, E.A., Bhattacharya, S.S., Hildebrandt, F., Gibbs, R.A., Koenekoop, R.K.,

Swaroop, A., Katsanis, N., 2009. A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies. Nat Genet 41, 739–745. https://doi.org/10.1038/ng.366

Kim, H., Xu, H., Yao, Q., Li, W., Huang, Q., Outeda, P., Cebotaru, V., Chiaravalli, M., Boletta, A., Piontek, K., Germino, G.G., Weinman, E.J., Watnick, T., Qian, F., 2014. Ciliary membrane proteins traffic through the Golgi via a Rabep1/GGA1/Arl3-dependent mechanism. Nat Commun 5, 5482. https://doi.org/10.1038/ncomms6482

Kim, J.C., Ou, Y.Y., Badano, J.L., Esmail, M.A., Leitch, C.C., Fiedrich, E., Beales, P.L., Archibald, J.M., Katsanis, N., Rattner, J.B., Leroux, M.R., 2005. MKKS/BBS6, a divergent chaperonin-like protein linked to the obesity disorder Bardet-Biedl syndrome, is a novel centrosomal component required for cytokinesis. Journal of Cell Science 118, 1007–1020. https://doi.org/10.1242/jcs.01676

Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., 2013. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. Annu Rev Biochem 82, 323–355. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442

Klena, N., Pigino, G., 2022. Structural Biology of Cilia and Intraflagellar Transport. Annu Rev Cell Dev Biol 38, 103–123. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-034238

Klink, B.U., Gatsogiannis, C., Hofnagel, O., Wittinghofer, A., Raunser, S., 2020. Structure of the human BBSome core complex. Elife 9. https://doi.org/10.7554/eLife.53910

Knopp, C., Rudnik-Schöneborn, S., Eggermann, T., Bergmann, C., Begemann, M., Schoner, K., Zerres, K., Ortiz Brüchle, N., 2015. Syndromic ciliopathies: From single gene to multi gene analysis by SNP arrays and next generation sequencing. Mol Cell Probes 29, 299–307. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.05.008

Kogerman, P., Grimm, T., Kogerman, L., Krause, D., Undén, A.B., Sandstedt, B., Toftgård, R., Zaphiropoulos, P.G., 1999. Mammalian Suppressor-of-Fused modulates nuclear–cytoplasmic shuttling of GLI-1. Nat Cell Biol 1, 312–319. https://doi.org/10.1038/13031

König, J., Kranz, B., König, S., Schlingmann, K.P., Titieni, A., Tönshoff, B., Habbig, S., Pape, L., Häffner, K., Hansen, M., Büscher, A., Bald, M., Billing, H., Schild, R., Walden, U., Hampel, T., Staude, H., Riedl, M., Gretz, N., Lablans, M., Bergmann, C., Hildebrandt, F., Omran, H., Konrad, M., Gesellschaft für Pädiatrische Nephrologie (GPN), 2017. Phenotypic Spectrum of Children with Nephronophthisis and Related Ciliopathies. Clin J Am Soc Nephrol 12, 1974–1983. https://doi.org/10.2215/CJN.01280217

Kose, M.D., Canda, E., Kağnıcı, M., Uçar, S.K., Onay, H., Yıldırım Sozmen, E., Karapınar, D., Özkınay, F., Çoker, M., 2019. Coexistence of Gaucher Disease and severe congenital neutropenia. Blood Cells Mol Dis 76, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2018.07.001

Kosugi, S., Momozawa, Y., Liu, X., Terao, C., Kubo, M., Kamatani, Y., 2019. Comprehensive evaluation of structural variation detection algorithms for whole genome sequencing. Genome Biol 20, 1–18. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1720-5

Kousi, M., Söylemez, O., Ozanturk, A., Mourtzi, N., Akle, S., Jungreis, I., Muller, J., Cassa, C.A., Brand, H., Mokry, J.A., Wolf, M.Y., Sadeghpour, A., McFadden, K., Lewis, R.A., Talkowski, M.E., Dollfus, H., Kellis, M., Davis, E.E., Sunyaev, S.R., Katsanis, N., 2020. Evidence for secondary-variant genetic burden and non-random distribution across biological modules in a recessive ciliopathy. Nat Genet 52, 1145–1150. https://doi.org/10.1038/s41588-020-0707-1

Kremer, L.S., Bader, D.M., Mertes, C., Kopajtich, R., Pichler, G., Iuso, A., Haack, T.B., Graf, E., Schwarzmayr, T., Terrile, C., Koňaříková, E., Repp, B., Kastenmüller, G., Adamski, J., Lichtner, P., Leonhardt, C., Funalot, B., Donati, A., Tiranti, V., Lombes, A., Jardel, C., Gläser, D., Taylor, R.W.,

Ghezzi, D., Mayr, J.A., Rötig, A., Freisinger, P., Distelmaier, F., Strom, T.M., Meitinger, T., Gagneur, J., Prokisch, H., 2017. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. Nat Commun 8, 15824. https://doi.org/10.1038/ncomms15824

Kruczek, K., Swaroop, A., 2020. Pluripotent stem cell-derived retinal organoids for disease modeling and development of therapies. Stem Cells 38, 1206–1215. https://doi.org/10.1002/stem.3239

Kukic, I., Rivera-Molina, F., Toomre, D., 2016. The IN/OUT assay: a new tool to study ciliogenesis. Cilia 5, 23. https://doi.org/10.1186/s13630-016-0044-2

Kumaran, N., Moore, A.T., Weleber, R.G., Michaelides, M., 2017. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. British Journal of Ophthalmology 101, 1147–1154. https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309975

Kurtović, M., Piteša, N., Bartoniček, N., Ozretić, P., Musani, V., Čonkaš, J., Petrić, T., King, C., Sabol, M., 2022. RNA-seq and ChIP-seq Identification of Unique and Overlapping Targets of GLI Transcription Factors in Melanoma Cell Lines. Cancers (Basel) 14, 4540. https://doi.org/10.3390/cancers14184540

Lacey, S.E., Foster, H.E., Pigino, G., 2023. The molecular structure of IFT-A and IFT-B in anterograde intraflagellar transport trains. Nat Struct Mol Biol 30, 584–593. https://doi.org/10.1038/s41594-022-00905-5

Lane, N., 2015. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) "Concerning little animals." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 370, 20140344. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0344

Lappalainen, T., Scott, A.J., Brandt, M., Hall, I.M., 2019. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. Cell 177, 70–84. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.032

Laurence, J.Z., Moon, R.C., 1995. Four cases of "retinitis pigmentosa" occurring in the same family, and accompanied by general imperfections of development. 1866. Obes Res 3, 400–403. https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1995.tb00166.x

Laurier, V., Stoetzel, C., Muller, J., Thibault, C., Corbani, S., Jalkh, N., Salem, N., Chouery, E., Poch, O., Licaire, S., Danse, J.-M., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Mégarbané, A., Mandel, J.-L., Dollfus, H., 2006. Pitfalls of homozygosity mapping: an extended consanguineous Bardet–Biedl syndrome family with two mutant genes (BBS2, BBS10), three mutations, but no triallelism. Eur J Hum Genet 14, 1195–1203. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201688

Lauring, M.C., Zhu, T., Luo, W., Wu, W., Yu, F., Toomre, D., 2019. New software for automated cilia detection in cells (ACDC). Cilia 8, 1. https://doi.org/10.1186/s13630-019-0061-z

Lauth, M., Bergström, A., Shimokawa, T., Toftgård, R., 2007. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 8455–8460. https://doi.org/10.1073/pnas.0609699104

Le, T.-L., Sribudiani, Y., Dong, X., Huber, C., Kois, C., Baujat, G., Gordon, C.T., Mayne, V., Galmiche, L., Serre, V., Goudin, N., Zarhrate, M., Bole-Feysot, C., Masson, C., Nitschké, P., Verheijen, F.W., Pais, L., Pelet, A., Sadedin, S., Pugh, J.A., Shur, N., White, S.M., El Chehadeh, S., Christodoulou, J., Cormier-Daire, V., Hofstra, R.M.W., Lyonnet, S., Tan, T.Y., Attié-Bitach, T., Kerstjens-Frederikse, W.S., Amiel, J., Thomas, S., 2020. Bi-allelic Variations of SMO in Humans Cause a Broad Spectrum of Developmental Anomalies Due to Abnormal Hedgehog Signaling. The American Journal of Human Genetics 106, 779–792. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.04.010

Leaf, A., Von Zastrow, M., 2015. Dopamine receptors reveal an essential role of IFT-B, KIF17, and Rab23 in delivering specific receptors to primary cilia. eLife 4, e06996. https://doi.org/10.7554/eLife.06996

Lechtreck, K.-F., Johnson, E.C., Sakai, T., Cochran, D., Ballif, B.A., Rush, J., Pazour, G.J., Ikebe, M., Witman, G.B., 2009. The Chlamydomonas reinhardtii BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella. Journal of Cell Biology 187, 1117–1132. https://doi.org/10.1083/jcb.200909183

Lee, C.H., Kang, G.M., Kim, M.-S., 2022. Mechanisms of Weight Control by Primary Cilia. Mol Cells 45, 169–176. https://doi.org/10.14348/molcells.2022.2046

Lee, H., Ko, H.W., 2016. Ciliary smoothened-mediated noncanonical hedgehog signaling promotes tubulin acetylation. Biochemical and Biophysical Research Communications 480, 574–579. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.093

Lee, L., 2011. Mechanisms of mammalian ciliary motility: Insights from primary ciliary dyskinesia genetics. Gene 473, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.11.006

Li, J.B., Gerdes, J.M., Haycraft, C.J., Fan, Y., Teslovich, T.M., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O.E., Li, L., Leitch, C.C., Lewis, R.A., Green, J.S., Parfrey, P.S., Leroux, M.R., Davidson, W.S., Beales, P.L., Guay-Woodford, L.M., Yoder, B.K., Stormo, G.D., Katsanis, N., Dutcher, S.K., 2004. Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. Cell 117, 541–552. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00450-7

Lindeboom, R.G.H., Vermeulen, M., Lehner, B., Supek, F., 2019. The impact of nonsense-mediated mRNA decay on genetic disease, gene editing and cancer immunotherapy. Nat Genet 51, 1645–1651. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0517-5

Lindstrand, A., Frangakis, S., Carvalho, C.M.B., Richardson, E.B., McFadden, K.A., Willer, J.R., Pehlivan, D., Liu, P., Pediaditakis, I.L., Sabo, A., Lewis, R.A., Banin, E., Lupski, J.R., Davis, E.E., Katsanis, N., 2016. Copy-Number Variation Contributes to the Mutational Load of Bardet-Biedl Syndrome. Am J Hum Genet 99, 318–336. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.04.023

Liu, W., Liu, S., Li, P., Yao, K., 2022. Retinitis Pigmentosa: Progress in Molecular Pathology and Biotherapeutical Strategies. International Journal of Molecular Sciences 23, 4883. https://doi.org/10.3390/ijms23094883

Lo, W.-T., Zhang, Y., Vadas, O., Roske, Y., Gulluni, F., De Santis, M.C., Zagar, A.V., Stephanowitz, H., Hirsch, E., Liu, F., Daumke, O., Kudryashev, M., Haucke, V., 2022. Structural basis of phosphatidylinositol 3-kinase C2α function. Nat Struct Mol Biol 29, 218–228. https://doi.org/10.1038/s41594-022-00730-w

Long, H., Huang, K., 2020. Transport of Ciliary Membrane Proteins. Frontiers in Cell and Developmental Biology 7.

Long, H., Zhang, F., Xu, N., Liu, G., Diener, D.R., Rosenbaum, J.L., Huang, K., 2016. Comparative Analysis of Ciliary Membranes and Ectosomes. Curr Biol 26, 3327–3335. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.055

Louison, S., Blanc, J., Pallot, C., Alassane, S., Praudel, A., Bron, A.-M., Creuzot-Garcher, C., 2019. Visual outcomes and complications of congenital cataract surgery. J Fr Ophtalmol 42, 368–374. https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.10.007

Luo, M., Lin, Z., Zhu, T., Jin, M., Meng, D., He, R., Cao, Z., Shen, Y., Lu, C., Cai, R., Zhao, Y., Wang, X., Li, H., Wu, S., Zou, X., Luo, G., Cao, L., Huang, M., Jiao, H., Gao, H., Sui, R., Zhao, C., Ma, X., Cao, M., 2021. Disrupted intraflagellar transport due to IFT74 variants causes Joubert

syndrome. Genetics in Medicine 23, 1041–1049. https://doi.org/10.1038/s41436-021-01106-z

Luo, N., West, C.C., Murga-Zamalloa, C.A., Sun, L., Anderson, R.M., Wells, C.D., Weinreb, R.N., Travers, J.B., Khanna, H., Sun, Y., 2012. OCRL localizes to the primary cilium: a new role for cilia in Lowe syndrome. Hum Mol Genet 21, 3333–3344. https://doi.org/10.1093/hmg/dds163

Lupieri, A., Smirnova, N., Malet, N., Gayral, S., Laffargue, M., 2015. PI3K signaling in arterial diseases: Non redundant functions of the PI3K isoforms. Adv Biol Regul 59, 4–18. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.06.002

Ma, Y., He, J., Li, S., Yao, D., Huang, C., Wu, J., Lei, M., 2023. Structural insight into the intraflagellar transport complex IFT-A and its assembly in the anterograde IFT train. Nat Commun 14, 1506. https://doi.org/10.1038/s41467-023-37208-2

Ma, Z., Qin, M., Liang, H., Chen, R., Cai, S., Huang, Z., Tai, G., 2020. Primary cilia-dependent signaling is involved in regulating mesenchymal stem cell proliferation and pluripotency maintenance. J Mol Histol 51, 241–250. https://doi.org/10.1007/s10735-020-09876-7

Madhivanan, K., Aguilar, R.C., 2014. Ciliopathies: The Trafficking Connection. Traffic 15, 1031–1056. https://doi.org/10.1111/tra.12195

Mantere, T., Neveling, K., Pebrel-Richard, C., Benoist, M., van der Zande, G., Kater-Baats, E., Baatout, I., van Beek, R., Yammine, T., Oorsprong, M., Hsoumi, F., Olde-Weghuis, D., Majdali, W., Vermeulen, S., Pauper, M., Lebbar, A., Stevens-Kroef, M., Sanlaville, D., Dupont, J.M., Smeets, D., Hoischen, A., Schluth-Bolard, C., El Khattabi, L., 2021. Optical genome mapping enables constitutional chromosomal aberration detection. Am J Hum Genet 108, 1409–1422. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.05.012

Marchese, E., Caterino, M., Fedele, R., Pirozzi, F., Cevenini, A., Gupta, N., Ingrosso, D., Perna, A., Capasso, G., Ruoppolo, M., Zacchia, M., 2022. Multi-Omics Studies Unveil Extraciliary Functions of BBS10 and Show Metabolic Aberrations Underlying Renal Disease in Bardet–Biedl Syndrome. International Journal of Molecular Sciences 23, 9420. https://doi.org/10.3390/ijms23169420

Marchese, E., Ruoppolo, M., Perna, A., Capasso, G., Zacchia, M., 2020. Exploring Key Challenges of Understanding the Pathogenesis of Kidney Disease in Bardet-Biedl Syndrome. Kidney Int Rep 5, 1403–1415. https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.06.017

Marion, V., Schlicht, D., Mockel, A., Caillard, S., Imhoff, O., Stoetzel, C., van Dijk, P., Brandt, C., Moulin, B., Dollfus, H., 2011. Bardet-Biedl syndrome highlights the major role of the primary cilium in efficient water reabsorption. Kidney Int 79, 1013–1025. https://doi.org/10.1038/ki.2010.538

Maroilley, T., Tarailo-Graovac, M., 2019. Uncovering Missing Heritability in Rare Diseases. Genes (Basel) 10, 275. https://doi.org/10.3390/genes10040275

Marshall, W.F., Nonaka, S., 2006. Cilia: tuning in to the cell's antenna. Curr Biol 16, R604-614. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.012

Martin, F.J., Amode, M.R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A.G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S.K., Bignell, A., Boddu, S., Branco Lins, P.R., Brooks, L., Ramaraju, S.B., Charkhchi, M., Cockburn, A., Da Rin Fiorretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., Donaldson, S., El Houdaigui, B., El Naboulsi, T., Fatima, R., Giron, C.G., Genez, T., Ghattaoraya, G.S., Martinez, J.G., Guijarro, C., Hardy, M., Hollis, Z., Hourlier, T., Hunt, T., Kay, M., Kaykala, V., Le, T., Lemos, D., Marques-Coelho, D., Marugán, J.C., Merino, G.A., Mirabueno, L.P., Mushtaq, A., Hossain, S.N., Ogeh, D.N., Sakthivel, M.P., Parker, A., Perry, M., Piližota, I., Prosovetskaia, I.,

Pérez-Silva, J.G., Salam, A.I.A., Saraiva-Agostinho, N., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sinha, S., Sipos, B., Stark, W., Steed, E., Sukumaran, R., Sumathipala, D., Suner, M.-M., Surapaneni, L., Sutinen, K., Szpak, M., Tricomi, F.F., Urbina-Gómez, D., Veidenberg, A., Walsh, T.A., Walts, B., Wass, E., Willhoft, N., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Chakiachvili, M., Flint, B., Giorgetti, S., Haggerty, L., Ilsley, G.R., Loveland, J.E., Moore, B., Mudge, J.M., Tate, J., Thybert, D., Trevanion, S.J., Winterbottom, A., Frankish, A., Hunt, S.E., Ruffier, M., Cunningham, F., Dyer, S., Finn, R.D., Howe, K.L., Harrison, P.W., Yates, A.D., Flicek, P., 2023. Ensembl 2023. Nucleic Acids Res 51, D933–D941. https://doi.org/10.1093/nar/gkac958

Martinez-Lopez, A., Blasco-Morente, G., Perez-Lopez, I., Herrera-Garcia, J. d., Luque-Valenzuela, M., Sanchez-Cano, D., Lopez-Gutierrez, J. c., Ruiz-Villaverde, R., Tercedor-Sanchez, J., 2017. CLOVES syndrome: review of a PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). Clinical Genetics 91, 14–21. https://doi.org/10.1111/cge.12832

Mary, L., Chennen, K., Stoetzel, C., Antin, M., Leuvrey, A., Nourisson, E., Alanio-Detton, E., Antal, M.C., Attié-Bitach, T., Bouvagnet, P., Bouvier, R., Buenerd, A., Clémenson, A., Devisme, L., Gasser, B., Gilbert-Dussardier, B., Guimiot, F., Khau Van Kien, P., Leroy, B., Loget, P., Martinovic, J., Pelluard, F., Perez, M.-J., Petit, F., Pinson, L., Rooryck-Thambo, C., Poch, O., Dollfus, H., Schaefer, E., Muller, J., 2019. Bardet-Biedl syndrome: Antenatal presentation of forty-five fetuses with biallelic pathogenic variants in known Bardet-Biedl syndrome genes. Clin Genet 95, 384–397. https://doi.org/10.1111/cge.13500

Masek, M., Zang, J., Mateos, J.M., Garbelli, M., Ziegler, U., Neuhauss, S.C.F., Bachmann-Gagescu, R., 2023. Chapter 7 - Studying the morphology, composition and function of the photoreceptor primary cilium in zebrafish, in: Bravo-San Pedro, J.M., Galluzzi, L. (Eds.), Methods in Cell Biology, Cilia: From Mechanisms to Disease - Part A. Academic Press, pp. 97–128. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.10.004

Mateus, H.E., Pérez, A.M., Mesa, M.L., Escobar, G., Gálvez, J.M., Montaño, J.I., Ospina, M.L., Laissue, P., 2017. A first description of the Colombian national registry for rare diseases. BMC Res Notes 10, 514. https://doi.org/10.1186/s13104-017-2840-1

Matissek, S.J., Elsawa, S.F., 2020. GLI3: a mediator of genetic diseases, development and cancer. Cell Commun Signal 18, 54. https://doi.org/10.1186/s12964-020-00540-x

Matthijs, G., Souche, E., Alders, M., Corveleyn, A., Eck, S., Feenstra, I., Race, V., Sistermans, E., Sturm, M., Weiss, M., Yntema, H., Bakker, E., Scheffer, H., Bauer, P., 2016. Erratum: Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. Eur J Hum Genet 24, 1515–1515. https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.63

May, V., Arnold, A.A., Pagad, S., Somagutta, M.R., Sridharan, S., Nanthakumaran, S., Malik, B.H., 2020. Duchenne's Muscular Dystrophy: The Role of Induced Pluripotent Stem Cells and Genomic Editing on Muscle Regeneration. Cureus 12, e10600. https://doi.org/10.7759/cureus.10600

Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L., Baltimore, D., 1993. A putative modular domain present in diverse signaling proteins. Cell 73, 629–630. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90244-k

Mayer, S.K., Thomas, J., Helms, M., Kothapalli, A., Cherascu, I., Salesevic, A., Stalter, E., Wang, K., Datta, P., Searby, C., Seo, S., Hsu, Y., Bhattarai, S., Sheffield, V.C., Drack, A.V., 2022. Progressive retinal degeneration of rods and cones in a Bardet-Biedl syndrome type 10 mouse model. Disease Models & Mechanisms 15, dmm049473. https://doi.org/10.1242/dmm.049473

Mazo, G., Soplop, N., Wang, W.-J., Uryu, K., Tsou, M.F.B., 2016. Spatial Control of Primary Ciliogenesis by Subdistal Appendages Alters Sensation-Associated Properties of Cilia. Dev Cell 39, 424–437. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.006

McColgan, P., Tabrizi, S.J., 2018. Huntington's disease: a clinical review. Eur J Neurol 25, 24–34. https://doi.org/10.1111/ene.13413

McConnachie, D.J., Stow, J.L., Mallett, A.J., 2021. Ciliopathies and the Kidney: A Review. American Journal of Kidney Diseases 77, 410–419. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.08.012

McIntyre, J.C., Hege, M.M., Berbari, N.F., 2016. Chapter 3 - Trafficking of ciliary G protein-coupled receptors, in: K. Shukla, A. (Ed.), Methods in Cell Biology, G Protein-Coupled Receptors. Academic Press, pp. 35–54. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.11.009

Meehan, T.F., Conte, N., West, D.B., Jacobsen, J.O., Mason, J., Warren, J., Chen, C.-K., Tudose, I., Relac, M., Matthews, P., Karp, N., Santos, L., Fiegel, T., Ring, N., Westerberg, H., Greenaway, S., Sneddon, D., Morgan, H., Codner, G.F., Stewart, M.E., Brown, J., Horner, N., International Mouse Phenotyping Consortium, Haendel, M., Washington, N., Mungall, C.J., Reynolds, C.L., Gallegos, J., Gailus-Durner, V., Sorg, T., Pavlovic, G., Bower, L.R., Moore, M., Morse, I., Gao, X., Tocchini-Valentini, G.P., Obata, Y., Cho, S.Y., Seong, J.K., Seavitt, J., Beaudet, A.L., Dickinson, M.E., Herault, Y., Wurst, W., de Angelis, M.H., Lloyd, K.C.K., Flenniken, A.M., Nutter, L.M.J., Newbigging, S., McKerlie, C., Justice, M.J., Murray, S.A., Svenson, K.L., Braun, R.E., White, J.K., Bradley, A., Flicek, P., Wells, S., Skarnes, W.C., Adams, D.J., Parkinson, H., Mallon, A.-M., Brown, S.D.M., Smedley, D., 2017. Disease model discovery from 3,328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. Nat Genet 49, 1231–1238. https://doi.org/10.1038/ng.3901

Melluso, A., Secondulfo, F., Capolongo, G., Capasso, G., Zacchia, M., 2023. Bardet-Biedl Syndrome: Current Perspectives and Clinical Outlook. TCRM 19, 115–132. https://doi.org/10.2147/TCRM.S338653

Merrill, N.M., Schipper, J.L., Karnes, J.B., Kauffman, A.L., Martin, K.R., MacKeigan, J.P., 2017. PI3K-C2α knockdown decreases autophagy and maturation of endocytic vesicles. PLoS One 12, e0184909. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184909

Meyer, J.R., Krentz, A.D., Berg, R.L., Richardson, J.G., Pomeroy, J., Hebbring, S.J., Haws, R.M., 2022. Kidney failure in Bardet–Biedl syndrome. Clinical Genetics 101, 429–441. https://doi.org/10.1111/cge.14119

Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I.-I., Badoiu, S.C., Stefani, C., Greabu, M., 2021. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. International Journal of Molecular Sciences 22, 173. https://doi.org/10.3390/ijms22010173

Mishra, R., Patel, H., Alanazi, S., Kilroy, M.K., Garrett, J.T., 2021. PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects. Int J Mol Sci 22, 3464. https://doi.org/10.3390/ijms22073464

Mitchison, H.M., Valente, E.M., 2017. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. The Journal of Pathology 241, 294–309. https://doi.org/10.1002/path.4843

Molinari, E., Sayer, J.A., 2019. Using human urine-derived renal epithelial cells to model kidney disease in inherited ciliopathies. TRD 4, 87–95. https://doi.org/10.3233/TRD-190034

Moore, S.J., Green, J.S., Fan, Y., Bhogal, A.K., Dicks, E., Fernandez, B.A., Stefanelli, M., Murphy, C., Cramer, B.C., Dean, J.C.S., Beales, P.L., Katsanis, N., Bassett, A.S., Davidson, W.S., Parfrey,

P.S., 2005. Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study. Am J Med Genet A 132A, 352–360. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30406

Morena, J., Gupta, A., Hoyle, J.C., 2019. Charcot-Marie-Tooth: From Molecules to Therapy. Int J Mol Sci 20, 3419. https://doi.org/10.3390/ijms20143419

Mountford, J.K., Petitjean, C., Putra, H.W.K., McCafferty, J.A., Setiabakti, N.M., Lee, H., Tønnesen, L.L., McFadyen, J.D., Schoenwaelder, S.M., Eckly, A., Gachet, C., Ellis, S., Voss, A.K., Dickins, R.A., Hamilton, J.R., Jackson, S.P., 2015. The class II PI 3-kinase, PI3KC2α, links platelet internal membrane structure to shear-dependent adhesive function. Nat Commun 6, 6535. https://doi.org/10.1038/ncomms7535

Mourão, A., Nager, A.R., Nachury, M.V., Lorentzen, E., 2014. Structural basis for membrane targeting of the BBSome by ARL6. Nat Struct Mol Biol 21, 1035–1041. https://doi.org/10.1038/nsmb.2920

Muller, J., Stoetzel, C., Vincent, M.C., Leitch, C.C., Laurier, V., Danse, J.M., Hellé, S., Marion, V., Bennouna-Greene, V., Vicaire, S., Megarbane, A., Kaplan, J., Drouin-Garraud, V., Hamdani, M., Sigaudy, S., Francannet, C., Roume, J., Bitoun, P., Goldenberg, A., Philip, N., Odent, S., Green, J., Cossée, M., Davis, E.E., Katsanis, N., Bonneau, D., Verloes, A., Poch, O., Mandel, J.L., Dollfus, H., 2010. Identification of 28 novel mutations in the Bardet–Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. Hum Genet 127, 583–593. https://doi.org/10.1007/s00439-010-0804-9

Mykytyn, K., Nishimura, D.Y., Searby, C.C., Shastri, M., Yen, H., Beck, J.S., Braun, T., Streb, L.M., Cornier, A.S., Cox, G.F., Fulton, A.B., Carmi, R., Lüleci, G., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Jacobson, S.G., Heckenlively, J.R., Weleber, R.G., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2002. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. Nat Genet 31, 435–438. https://doi.org/10.1038/ng935

Nachury, M.V., 2018. The molecular machines that traffic signaling receptors into and out of cilia. Current Opinion in Cell Biology, Cell Signalling 51, 124–131. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.004

Nachury, M.V., 2014. How do cilia organize signalling cascades? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 369, 20130465. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0465

Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peränen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., Sheffield, V.C., Jackson, P.K., 2007. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. Cell 129, 1201–1213. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.053

Nassar, L.R., Barber, G.P., Benet-Pagès, A., Casper, J., Clawson, H., Diekhans, M., Fischer, C., Gonzalez, J.N., Hinrichs, A.S., Lee, B.T., Lee, C.M., Muthuraman, P., Nguy, B., Pereira, T., Nejad, P., Perez, G., Raney, B.J., Schmelter, D., Speir, M.L., Wick, B.D., Zweig, A.S., Haussler, D., Kuhn, R.M., Haeussler, M., Kent, W.J., 2023. The UCSC Genome Browser database: 2023 update. Nucleic Acids Res 51, D1188–D1195. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1072

Neveling, K., Mantere, T., Vermeulen, S., Oorsprong, M., van Beek, R., Kater-Baats, E., Pauper, M., van der Zande, G., Smeets, D., Weghuis, D.O., Stevens-Kroef, M.J.P.L., Hoischen, A., 2021. Next-generation cytogenetics: Comprehensive assessment of 52 hematological malignancy genomes by optical genome mapping. Am J Hum Genet 108, 1423–1435. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.06.001

Nevers, Y., Prasad, M.K., Poidevin, L., Chennen, K., Allot, A., Kress, A., Ripp, R., Thompson, J.D., Dollfus, H., Poch, O., Lecompte, O., 2017. Insights into Ciliary Genes and Evolution from Multi-Level Phylogenetic Profiling. Mol Biol Evol 34, 2016–2034. https://doi.org/10.1093/molbev/msx146

Newton, A.C., 1995. Protein Kinase C: Seeing two domains. Current Biology 5, 973–976. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00191-6

Niederlova, V., Modrak, M., Tsyklauri, O., Huranova, M., Stepanek, O., 2019. Meta-analysis of genotype-phenotype associations in Bardet-Biedl syndrome uncovers differences among causative genes. Human Mutation 40, 2068–2087. https://doi.org/10.1002/humu.23862

Novas, R., Cardenas-Rodriguez, M., Irigoín, F., Badano, J.L., 2015. Bardet-Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction? FEBS Lett 589, 3479–3491. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.031

Nozaki, S., Katoh, Y., Kobayashi, T., Nakayama, K., 2018. BBS1 is involved in retrograde trafficking of ciliary GPCRs in the context of the BBSome complex. PLoS One 13, e0195005. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195005

Oehler, J.B., Wright, H., Stark, Z., Mallett, A.J., Schmitz, U., 2023. The application of long-read sequencing in clinical settings. Hum Genomics 17, 1–13. https://doi.org/10.1186/s40246-023-00522-3

Oh, E.C., Katsanis, N., 2013. Context-dependent regulation of Wnt signaling through the primary cilium. J Am Soc Nephrol 24, 10–18. https://doi.org/10.1681/ASN.2012050526

Orozco, J.T., Wedaman, K.P., Signor, D., Brown, H., Rose, L., Scholey, J.M., 1999. Movement of motor and cargo along cilia. Nature 398, 674. https://doi.org/10.1038/19448

Pablos, M., Casanueva-Álvarez, E., González-Casimiro, C.M., Merino, B., Perdomo, G., Cózar-Castellano, I., 2022. Primary Cilia in Pancreatic β- and α-Cells: Time to Revisit the Role of Insulin-Degrading Enzyme. Frontiers in Endocrinology 13.

Pampliega, O., Orhon, I., Patel, B., Sridhar, S., Díaz-Carretero, A., Beau, I., Codogno, P., Satir, B.H., Satir, P., Cuervo, A.M., 2013. Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. Nature 502, 194–200. https://doi.org/10.1038/nature12639

Pan, J., Seeger-Nukpezah, T., Golemis, E.A., 2013. The role of the cilium in normal and abnormal cell cycles: emphasis on renal cystic pathologies. Cell. Mol. Life Sci. 70, 1849–1874. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1052-z

Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., Olsen, K.M., Gregg, A., Noggle, S., Tessier-Lavigne, M., 2016. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. Nature 533, 125–129. https://doi.org/10.1038/nature17664

Parfitt, D.A., Lane, A., Ramsden, C.M., Carr, A.-J.F., Munro, P.M., Jovanovic, K., Schwarz, N., Kanuga, N., Muthiah, M.N., Hull, S., Gallo, J.-M., da Cruz, L., Moore, A.T., Hardcastle, A.J., Coffey, P.J., Cheetham, M.E., 2016. Identification and Correction of Mechanisms Underlying Inherited Blindness in Human iPSC-Derived Optic Cups. Cell Stem Cell 18, 769–781. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.021

Park, P.J., 2009. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. Nat Rev Genet 10, 669–680. https://doi.org/10.1038/nrg2641

Patnaik, S.R., Farag, A., Brücker, L., Volz, A.-K., Schneider, S., Kretschmer, V., May-Simera, H.L., 2020. Tissue-dependent differences in Bardet–Biedl syndrome gene expression. Biology of the Cell 112, 39–52. https://doi.org/10.1111/boc.201900077

Pazour, G.J., Dickert, B.L., Vucica, Y., Seeley, E.S., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., Cole, D.G., 2000. Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. J Cell Biol 151, 709–718. https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.709

Pazour, G.J., San Agustin, J.T., Follit, J.A., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., 2002. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. Curr Biol 12, R378-380. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00877-1

Pazour, G.J., Witman, G.B., 2003. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. Curr Opin Cell Biol 15, 105–110. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00012-1

Pedersen, L.B., Miller, M.S., Geimer, S., Leitch, J.M., Rosenbaum, J.L., Cole, D.G., 2005. Chlamydomonas IFT172 is encoded by FLA11, interacts with CrEB1, and regulates IFT at the flagellar tip. Curr Biol 15, 262–266. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.037

Pedroso, J.L., Vale, T.C., Braga-Neto, P., Dutra, L.A., França, M.C., Teive, H.A.G., Barsottini, O.G.P., 2019. Acute cerebellar ataxia: differential diagnosis and clinical approach. Arq Neuropsiquiatr 77, 184–193. https://doi.org/10.1590/0004-282X20190020

Perea-Romero, I., Solarat, C., Blanco-Kelly, F., Sanchez-Navarro, I., Bea-Mascato, B., Martin-Salazar, E., Lorda-Sanchez, I., Swafiri, S.T., Avila-Fernandez, A., Martin-Merida, I., Trujillo-Tiebas, M.J., Carreño, E., Jimenez-Rolando, B., Garcia-Sandoval, B., Minguez, P., Corton, M., Valverde, D., Ayuso, C., 2022. Allelic overload and its clinical modifier effect in Bardet-Biedl syndrome. npj Genom. Med. 7, 1–7. https://doi.org/10.1038/s41525-022-00311-2

Piasecki, B.P., Burghoorn, J., Swoboda, P., 2010. Regulatory Factor X (RFX)-mediated transcriptional rewiring of ciliary genes in animals. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 12969–12974. https://doi.org/10.1073/pnas.0914241107

Piperno, G., Mead, K., 1997. Transport of a novel complex in the cytoplasmic matrix of Chlamydomonas flagella. Proceedings of the National Academy of Sciences 94, 4457–4462. https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4457

Placzek, M., Briscoe, J., 2018. Sonic hedgehog in vertebrate neural tube development. Int. J. Dev. Biol. 62, 225–234. https://doi.org/10.1387/ijdb.170293jb

Pogue, R.E., Cavalcanti, D.P., Shanker, S., Andrade, R.V., Aguiar, L.R., de Carvalho, J.L., Costa, F.F., 2018. Rare genetic diseases: update on diagnosis, treatment and online resources. Drug Discov Today 23, 187–195. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.11.002

Polla, D.L., Cardoso, M.T.O., Silva, M.C.B., Cardoso, I.C.C., Medina, C.T.N., Araujo, R., Fernandes, C.C., Reis, A.M.M., de Andrade, R.V., Pereira, R.W., Pogue, R., 2015. Use of Targeted Exome Sequencing for Molecular Diagnosis of Skeletal Disorders. PLoS One 10, e0138314. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138314

Pomeroy, J., Krentz, A.D., Richardson, J.G., Berg, R.L., VanWormer, J.J., Haws, R.M., 2021. Bardet-Biedl syndrome: Weight patterns and genetics in a rare obesity syndrome. Pediatric Obesity 16, e12703. https://doi.org/10.1111/ijpo.12703

Prasai, A., Schmidt Cernohorska, M., Ruppova, K., Niederlova, V., Andelova, M., Draber, P., Stepanek, O., Huranova, M., 2020. The BBSome assembly is spatially controlled by BBS1 and BBS4 in human cells. J Biol Chem 295, 14279–14290. https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013905

Priya, S., Nampoothiri, S., Sen, P., Sripriya, S., 2016. Bardet-Biedl syndrome: Genetics, molecular pathophysiology, and disease management. Indian J Ophthalmol 64, 620–627. https://doi.org/10.4103/0301-4738.194328

Prosseda, P.P., Luo, N., Wang, B., Alvarado, J.A., Hu, Y., Sun, Y., 2017. Loss of OCRL increases ciliary PI(4,5)P2 in Lowe oculocerebrorenal syndrome. J Cell Sci 130, 3447–3454. https://doi.org/10.1242/jcs.200857

Pruski, M., Hu, L., Yang, C., Wang, Y., Zhang, J.-B., Zhang, L., Huang, Y., Rajnicek, A.M., St Clair, D., McCaig, C.D., Lang, B., Ding, Y.-Q., 2019. Roles for IFT172 and Primary Cilia in Cell Migration, Cell Division, and Neocortex Development. Front Cell Dev Biol 7, 287. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00287

Putoux, A., Attie-Bitach, T., Martinovic, J., Gubler, M.-C., 2012. Phenotypic variability of Bardet-Biedl syndrome: focusing on the kidney. Pediatr Nephrol 27, 7–15. https://doi.org/10.1007/s00467-010-1751-3

Radha Rama Devi, A., Naushad, S.M., Lingappa, L., 2020. Clinical and Molecular Diagnosis of Joubert Syndrome and Related Disorders. Pediatric Neurology 106, 43–49. https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.01.012

Rahit, K.M.T.H., Tarailo-Graovac, M., 2020. Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. Genes 11, 239. https://doi.org/10.3390/genes11030239

Ramensky, V., Bork, P., Sunyaev, S., 2002. Human non-synonymous SNPs: server and survey. Nucleic Acids Res 30, 3894–3900. https://doi.org/10.1093/nar/gkf493

Reiter, J.F., Blacque, O.E., Leroux, M.R., 2012. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. EMBO Rep 13, 608–618. https://doi.org/10.1038/embor.2012.73

Reiter, J.F., Leroux, M.R., 2017. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. Nat Rev Mol Cell Biol 18, 533–547. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.60

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., ACMG Laboratory Quality Assurance Committee, 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 17, 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Richardson, C.D., Ray, G.J., DeWitt, M.A., Curie, G.L., Corn, J.E., 2016. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. Nat Biotechnol 34, 339–344. https://doi.org/10.1038/nbt.3481

Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., Tabin, C., 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. Cell 75, 1401–1416. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90626-2

Riggs, E.R., Andersen, E.F., Cherry, A.M., Kantarci, S., Kearney, H., Patel, A., Raca, G., Ritter, D.I., South, S.T., Thorland, E.C., Pineda-Alvarez, D., Aradhya, S., Martin, C.L., 2020. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). Genetics in Medicine 22, 245–257. https://doi.org/10.1038/s41436-019-0686-8

Roberson, E.C., Dowdle, W.E., Ozanturk, A., Garcia-Gonzalo, F.R., Li, C., Halbritter, J., Elkhartoufi, N., Porath, J.D., Cope, H., Ashley-Koch, A., Gregory, S., Thomas, S., Sayer, J.A., Saunier, S., Otto, E.A., Katsanis, N., Davis, E.E., Attié-Bitach, T., Hildebrandt, F., Leroux, M.R., Reiter, J.F., 2015. TMEM231, mutated in orofaciodigital and Meckel syndromes, organizes the ciliary transition zone. J Cell Biol 209, 129–142. https://doi.org/10.1083/jcb.201411087

Robert, T., Dock-Bregeon, A.-C., Colas, P., 2021. Functional characterization of CDK10 and cyclin M truncated variants causing severe developmental disorders. Mol Genet Genomic Med 9, e1782. https://doi.org/10.1002/mgg3.1782

Robert, T., Johnson, J.L., Guichaoua, R., Yaron, T.M., Bach, S., Cantley, L.C., Colas, P., 2020. Development of a CDK10/CycM in vitro Kinase Screening Assay and Identification of First Small-Molecule Inhibitors. Front Chem 8, 147. https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00147

Rogac, M., Kovanda, A., Lovrečić, L., Peterlin, B., 2023. Optical genome mapping in an atypical Pelizaeus-Merzbacher prenatal challenge. Frontiers in Genetics 14.

Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., 2002. Intraflagellar transport. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 813–825. https://doi.org/10.1038/nrm952

Ross, L., Normark, B.B., 2015. Evolutionary problems in centrosome and centriole biology. J Evol Biol 28, 995–1004. https://doi.org/10.1111/jeb.12620

Rubinstein, Y.R., Groft, S.C., Bartek, R., Brown, K., Christensen, R.A., Collier, E., Farber, A., Farmer, J., Ferguson, J.H., Forrest, C.B., Lockhart, N.C., McCurdy, K.R., Moore, H., Pollen, G.B., Richesson, R., Miller, V.R., Hull, S., Vaught, J., 2010. Creating a global rare disease patient registry linked to a rare diseases biorepository database: Rare Disease-HUB (RD-HUB). Contemp Clin Trials 31, 394–404. https://doi.org/10.1016/j.cct.2010.06.007

Ruel, L., Thérond, P.P., 2009. Variations in Hedgehog signaling: divergence and perpetuation in Sufu regulation of Gli. Genes Dev. 23, 1843–1848. https://doi.org/10.1101/gad.1838109

Salomon, R., Saunier, S., Niaudet, P., 2009. Nephronophthisis. Pediatr Nephrol 24, 2333–2344. https://doi.org/10.1007/s00467-008-0840-z

Sasai, N., Toriyama, M., Kondo, T., 2019. Hedgehog Signal and Genetic Disorders. Frontiers in Genetics 10.

Satir, P., Christensen, S.T., 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. Annu Rev Physiol 69, 377–400. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236

Sayers, E.W., Bolton, E.E., Brister, J.R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D.C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., Tse, T., Wang, J., Williams, R., Trawick, B.W., Pruitt, K.D., Sherry, S.T., 2022. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Res 50, D20–D26. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112

Schaefer, E., Delvallée, C., Mary, L., Stoetzel, C., Geoffroy, V., Marks-Delesalle, C., Holder-Espinasse, M., Ghoumid, J., Dollfus, H., Muller, J., 2019. Identification and Characterization of Known Biallelic Mutations in the IFT27 (BBS19) Gene in a Novel Family With Bardet-Biedl Syndrome. Frontiers in Genetics 10.

Schaefer, E., Lauer, J., Durand, M., Pelletier, V., Obringer, C., Claussmann, A., Braun, J.-J., Redin, C., Mathis, C., Muller, J., Schmidt-Mutter, C., Flori, E., Marion, V., Stoetzel, C., Dollfus, H., 2014. Mesoaxial polydactyly is a major feature in Bardet–Biedl syndrome patients with LZTFL1 (BBS17) mutations. Clinical Genetics 85, 476–481. https://doi.org/10.1111/cge.12198

Schaefer, E., Stoetzel, C., Scheidecker, S., Geoffroy, V., Prasad, M.K., Redin, C., Missotte, I., Lacombe, D., Mandel, J.-L., Muller, J., Dollfus, H., 2016. Identification of a novel mutation confirms the implication of IFT172 (BBS20) in Bardet-Biedl syndrome. J Hum Genet 61, 447–450. https://doi.org/10.1038/jhg.2015.162

Schaefer, E., Zaloszyc, A., Lauer, J., Durand, M., Stutzmann, F., Perdomo-Trujillo, Y., Redin, C., Bennouna Greene, V., Toutain, A., Perrin, L., Gérard, M., Caillard, S., Bei, X., Lewis, R.A.,

Christmann, D., Letsch, J., Kribs, M., Mutter, C., Muller, J., Stoetzel, C., Fischbach, M., Marion, V., Katsanis, N., Dollfus, H., 2011. Mutations in SDCCAG8/NPHP10 Cause Bardet-Biedl Syndrome and Are Associated with Penetrant Renal Disease and Absent Polydactyly. Molecular Syndromology 1, 273–281. https://doi.org/10.1159/000331268

Scheeff, E.D., Bourne, P.E., 2005. Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. PLoS Comput Biol 1, e49. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010049

Scheidecker, S., Etard, C., Haren, L., Stoetzel, C., Hull, S., Arno, G., Plagnol, V., Drunat, S., Passemard, S., Toutain, A., Obringer, C., Koob, M., Geoffroy, V., Marion, V., Strähle, U., Ostergaard, P., Verloes, A., Merdes, A., Moore, A.T., Dollfus, H., 2015a. Mutations in TUBGCP4 Alter Microtubule Organization via the γ-Tubulin Ring Complex in Autosomal-Recessive Microcephaly with Chorioretinopathy. The American Journal of Human Genetics 96, 666–674. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.02.011

Scheidecker, S., Hull, S., Perdomo, Y., Studer, F., Pelletier, V., Muller, J., Stoetzel, C., Schaefer, E., Defoort-Dhellemmes, S., Drumare, I., Holder, G.E., Hamel, C.P., Webster, A.R., Moore, A.T., Puech, B., Dollfus, H.J., 2015b. Predominantly Cone-System Dysfunction as Rare Form of Retinal Degeneration in Patients With Molecularly Confirmed Bardet-Biedl Syndrome. American Journal of Ophthalmology 160, 364-372.e1. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2015.05.007

Schwartz, D.C., Li, X., Hernandez, L.I., Ramnarain, S.P., Huff, E.J., Wang, Y.K., 1993. Ordered restriction maps of Saccharomyces cerevisiae chromosomes constructed by optical mapping. Science 262, 110–114. https://doi.org/10.1126/science.8211116

Sedmak, T., Wolfrum, U., 2011. Intraflagellar transport proteins in ciliogenesis of photoreceptor cells. Biol Cell 103, 449–466. https://doi.org/10.1042/BC20110034

Seo, S., Baye, L.M., Schulz, N.P., Beck, J.S., Zhang, Q., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., 2010. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 1488–1493. https://doi.org/10.1073/pnas.0910268107

Seo, S., Guo, D.-F., Bugge, K., Morgan, D.A., Rahmouni, K., Sheffield, V.C., 2009. Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. Hum Mol Genet 18, 1323–1331. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp031

Sergère, J.C., Thuret, J.Y., Le Roux, G., Carosella, E.D., Leteurtre, F., 2000. Human CDK10 gene isoforms. Biochem Biophys Res Commun 276, 271–277. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3395

Shamseldin, H.E., Shaheen, R., Ewida, N., Bubshait, D.K., Alkuraya, H., Almardawi, E., Howaidi, A., Sabr, Y., Abdalla, E.M., Alfaifi, A.Y., Alghamdi, J.M., Alsagheir, A., Alfares, A., Morsy, H., Hussein, M.H., Al–Muhaizea, M.A., Shagrani, M., Al Sabban, E., Salih, M.A., Meriki, N., Khan, R., Almugbel, M., Qari, A., Tulba, M., Mahnashi, M., Alhazmi, K., Alsalamah, A.K., Nowilaty, S.R., Alhashem, A., Hashem, M., Abdulwahab, F., Ibrahim, N., Alshidi, T., AlObeid, E., Alenazi, M.M., Alzaidan, H., Rahbeeni, Z., Al–Owain, M., Sogaty, S., Seidahmed, M.Z., Alkuraya, F.S., 2020. The morbid genome of ciliopathies: an update. Genetics in Medicine 22, 1051–1060. https://doi.org/10.1038/s41436-020-0761-1

Sharma, M., Jain, N., Singh, V., Singla, S., Aftab, I., 2022. Ophthalmic registries for rare eye diseases. Indian J Ophthalmol 70, 2225–2230. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_302_22

Shin, H.-W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M.R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., Frankel, W.N., Solimena, M., De

Camilli, P., Zerial, M., 2005. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. Journal of Cell Biology 170, 607–618. https://doi.org/10.1083/jcb.200505128

Sigafoos, A.N., Paradise, B.D., Fernandez-Zapico, M.E., 2021. Hedgehog/GLI Signaling Pathway: Transduction, Regulation, and Implications for Disease. Cancers (Basel) 13, 3410. https://doi.org/10.3390/cancers13143410

Silva, E., Dharmaraj, S., Li, Y.Y., Pina, A.L., Carter, R.C., Loyer, M., Traboulsi, E., Theodossiadis, G., Koenekoop, R., Sundin, O., Maumenee, I., 2004. A missense mutation in GUCY2D acts as a genetic modifier in RPE65-related Leber Congenital Amaurosis. Ophthalmic Genet 25, 205–217. https://doi.org/10.1080/13816810490513451

Simonini, C., Floeck, A., Strizek, B., Mueller, A., Gembruch, U., Geipel, A., 2022. Fetal ciliopathies: a retrospective observational single-center study. Arch Gynecol Obstet 306, 71–83. https://doi.org/10.1007/s00404-021-06265-7

Singh, M., Chaudhry, P., Merchant, A.A., 2016. Primary cilia are present on human blood and bone marrow cells and mediate Hedgehog signaling. Exp Hematol 44, 1181-1187.e2. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.08.009

Singh, S.K., Gui, M., Koh, F., Yip, M.C., Brown, A., 2020. Structure and activation mechanism of the BBSome membrane protein trafficking complex. Elife 9. https://doi.org/10.7554/eLife.53322

Singla, V., Reiter, J.F., 2006. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. Science 313, 629–633. https://doi.org/10.1126/science.1124534

Sirmaci, A., Edwards, Y.J.K., Akay, H., Tekin, M., 2012. Challenges in whole exome sequencing: an example from hereditary deafness. PLoS One 7, e32000. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032000

Skoda, A.M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., Serman, L., 2018. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. Bosn J Basic Med Sci 18, 8–20. https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.2756

Slaats, G.G., Isabella, C.R., Kroes, H.Y., Dempsey, J.C., Gremmels, H., Monroe, G.R., Phelps, I.G., Duran, K.J., Adkins, J., Kumar, S.A., Knutzen, D.M., Knoers, N.V., Mendelsohn, N.J., Neubauer, D., Mastroyianni, S.D., Vogt, J., Worgan, L., Karp, N., Bowdin, S., Glass, I.A., Parisi, M.A., Otto, E.A., Johnson, C.A., Hildebrandt, F., van Haaften, G., Giles, R.H., Doherty, D., 2016. MKS1 regulates ciliary INPP5E levels in Joubert syndrome. J Med Genet 53, 62–72. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103250

Smith, A.C., Neveling, K., Kanagal-Shamanna, R., 2022. Optical genome mapping for structural variation analysis in hematologic malignancies. Am J Hematol 97, 975–982. https://doi.org/10.1002/ajh.26587

Solarat, C., Valverde, D., 2023. Chapter 7 - Clinical and molecular diagnosis of Bardet-Biedl syndrome (BBS), in: Bravo-San Pedro, J.M., Galluzzi, L. (Eds.), Methods in Cell Biology, Cilia: From Mechanisms to Disease - Part B. Academic Press, pp. 125–137. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.12.014

Sorokin, S., 1962. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. J Cell Biol 15, 363–377. https://doi.org/10.1083/jcb.15.2.363

Sorokin, S.P., 1968. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. Journal of Cell Science 3, 207–230. https://doi.org/10.1242/jcs.3.2.207

Spiess, C., Meyer, A.S., Reissmann, S., Frydman, J., 2004. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. Trends in Cell Biology 14, 598–604. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.015

Starks, R.D., Beyer, A.M., Guo, D.F., Boland, L., Zhang, Q., Sheffield, V.C., Rahmouni, K., 2015. Regulation of Insulin Receptor Trafficking by Bardet Biedl Syndrome Proteins. PLoS Genet 11, e1005311. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005311

Stenson, P.D., Mort, M., Ball, E.V., Chapman, M., Evans, K., Azevedo, L., Hayden, M., Heywood, S., Millar, D.S., Phillips, A.D., Cooper, D.N., 2020. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. Hum Genet 139, 1197–1207. https://doi.org/10.1007/s00439-020-02199-3

Stenson, P.D., Mort, M., Ball, E.V., Evans, K., Hayden, M., Heywood, S., Hussain, M., Phillips, A.D., Cooper, D.N., 2017. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. Hum Genet 136, 665–677. https://doi.org/10.1007/s00439-017-1779-6

Stepanek, L., Pigino, G., 2016. Microtubule doublets are double-track railways for intraflagellar transport trains. Science 352, 721–724. https://doi.org/10.1126/science.aaf4594

Stoetzel, C., Bär, S., De Craene, J.-O., Scheidecker, S., Etard, C., Chicher, J., Reck, J.R., Perrault, I., Geoffroy, V., Chennen, K., Strähle, U., Hammann, P., Friant, S., Dollfus, H., 2016. A mutation in VPS15 (PIK3R4) causes a ciliopathy and affects IFT20 release from the cis-Golgi. Nat Commun 7, 13586. https://doi.org/10.1038/ncomms13586

Stoetzel, C., Laurier, V., Davis, E.E., Muller, J., Rix, S., Badano, J.L., Leitch, C.C., Salem, N., Chouery, E., Corbani, S., Jalk, N., Vicaire, S., Sarda, P., Hamel, C., Lacombe, D., Holder, M., Odent, S., Holder, S., Brooks, A.S., Elcioglu, N.H., Silva, E.D., Rossillion, B., Sigaudy, S., de Ravel, T.J.L., Alan Lewis, R., Leheup, B., Verloes, A., Amati-Bonneau, P., Mégarbané, A., Poch, O., Bonneau, D., Beales, P.L., Mandel, J.-L., Katsanis, N., Dollfus, H., 2006. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. Nat Genet 38, 521–524. https://doi.org/10.1038/ng1771

Stoetzel, C., Muller, J., Laurier, V., Davis, E.E., Zaghloul, N.A., Vicaire, S., Jacquelin, C., Plewniak, F., Leitch, C.C., Sarda, P., Hamel, C., de Ravel, T.J.L., Lewis, R.A., Friederich, E., Thibault, C., Danse, J.-M., Verloes, A., Bonneau, D., Katsanis, N., Poch, O., Mandel, J.-L., Dollfus, H., 2007. Identification of a Novel BBS Gene (BBS12) Highlights the Major Role of a Vertebrate-Specific Branch of Chaperonin-Related Proteins in Bardet-Biedl Syndrome. The American Journal of Human Genetics 80, 1–11. https://doi.org/10.1086/510256

Sudmant, P.H., Rausch, T., Gardner, E.J., Handsaker, R.E., Abyzov, A., Huddleston, J., Zhang, Y., Ye, K., Jun, G., Hsi-Yang Fritz, M., Konkel, M.K., Malhotra, A., Stütz, A.M., Shi, X., Paolo Casale, F., Chen, J., Hormozdiari, F., Dayama, G., Chen, K., Malig, M., Chaisson, M.J.P., Walter, K., Meiers, S., Kashin, S., Garrison, E., Auton, A., Lam, H.Y.K., Jasmine Mu, X., Alkan, C., Antaki, D., Bae, T., Cerveira, E., Chines, P., Chong, Z., Clarke, L., Dal, E., Ding, L., Emery, S., Fan, X., Gujral, M., Kahveci, F., Kidd, J.M., Kong, Y., Lameijer, E.-W., McCarthy, S., Flicek, P., Gibbs, R.A., Marth, G., Mason, C.E., Menelaou, A., Muzny, D.M., Nelson, B.J., Noor, A., Parrish, N.F., Pendleton, M., Quitadamo, A., Raeder, B., Schadt, E.E., Romanovitch, M., Schlattl, A., Sebra, R., Shabalin, A.A., Untergasser, A., Walker, J.A., Wang, M., Yu, F., Zhang, C., Zhang, J., Zheng-Bradley, X., Zhou, W., Zichner, T., Sebat, J., Batzer, M.A., McCarroll, S.A., Mills, R.E., Gerstein, M.B., Bashir, A., Stegle, O., Devine, S.E., Lee, C., Eichler, E.E., Korbel, J.O., 2015. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. Nature 526, 75–81. https://doi.org/10.1038/nature15394

Sun, R., Liu, M., Lu, L., Zheng, Y., Zhang, P., 2015. Congenital Heart Disease: Causes, Diagnosis, Symptoms, and Treatments. Cell Biochem Biophys 72, 857–860. https://doi.org/10.1007/s12013-015-0551-6

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861–872. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

Takeda, S., Narita, K., 2012. Structure and function of vertebrate cilia, towards a new taxonomy. Differentiation 83, S4-11. https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.002

Tarailo-Graovac, M., Zhu, J.Y.A., Matthews, A., van Karnebeek, C.D.M., Wasserman, W.W., 2017. Assessment of the ExAC data set for the presence of individuals with pathogenic genotypes implicated in severe Mendelian pediatric disorders. Genet Med 19, 1300–1308. https://doi.org/10.1038/gim.2017.50

Taruscio, D., Vittozzi, L., Choquet, R., Heimdal, K., Iskrov, G., Kodra, Y., Landais, P., Posada, M., Stefanov, R., Steinmueller, C., Swinnen, E., Van Oyen, H., 2015. National registries of rare diseases in Europe: an overview of the current situation and experiences. Public Health Genomics 18, 20–25. https://doi.org/10.1159/000365897

Taschner, M., Lorentzen, A., Mourão, A., Collins, T., Freke, G.M., Moulding, D., Basquin, J., Jenkins, D., Lorentzen, E., 2018. Crystal structure of intraflagellar transport protein 80 reveals a homo-dimer required for ciliogenesis. eLife 7, e33067. https://doi.org/10.7554/eLife.33067

Taschner, M., Weber, K., Mourão, A., Vetter, M., Awasthi, M., Stiegler, M., Bhogaraju, S., Lorentzen, E., 2016. Intraflagellar transport proteins 172, 80, 57, 54, 38, and 20 form a stable tubulin-binding IFT-B2 complex. EMBO J 35, 773–790. https://doi.org/10.15252/embj.201593164

Tatour, Y., Ben-Yosef, T., 2020. Syndromic Inherited Retinal Diseases: Genetic, Clinical and Diagnostic Aspects. Diagnostics 10, 779. https://doi.org/10.3390/diagnostics10100779

Teekakirikul, P., Zhu, W., Huang, H.C., Fung, E., 2019. Hypertrophic Cardiomyopathy: An Overview of Genetics and Management. Biomolecules 9, 878. https://doi.org/10.3390/biom9120878

Teglund, S., Toftgård, R., 2010. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 1805, 181–208. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.003

Thiadens, A.A.H.J., Phan, T.M.L., Zekveld-Vroon, R.C., Leroy, B.P., van den Born, L.I., Hoyng, C.B., Klaver, C.C.W., Writing Committee for the Cone Disorders Study Group Consortium, Roosing, S., Pott, J.-W.R., van Schooneveld, M.J., van Moll-Ramirez, N., van Genderen, M.M., Boon, C.J.F., den Hollander, A.I., Bergen, A.A.B., De Baere, E., Cremers, F.P.M., Lotery, A.J., 2012. Clinical course, genetic etiology, and visual outcome in cone and cone-rod dystrophy. Ophthalmology 119, 819–826. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.10.011

Tiosano, D., Baris, H.N., Chen, A., Hitzert, M.M., Schueler, M., Gulluni, F., Wiesener, A., Bergua, A., Mory, A., Copeland, B., Gleeson, J.G., Rump, P., Meer, H. van, Sival, D.A., Haucke, V., Kriwinsky, J., Knaup, K.X., Reis, A., Hauer, N.N., Hirsch, E., Roepman, R., Pfundt, R., Thiel, C.T., Wiesener, M.S., Aslanyan, M.G., Buchner, D.A., 2019. Mutations in PIK3C2A cause syndromic short stature, skeletal abnormalities, and cataracts associated with ciliary dysfunction. PLOS Genetics 15, e1008088. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008088

Tory, K., Lacoste, T., Burglen, L., Morinière, V., Boddaert, N., Macher, M.-A., Llanas, B., Nivet, H., Bensman, A., Niaudet, P., Antignac, C., Salomon, R., Saunier, S., 2007. High NPHP1 and

NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. J Am Soc Nephrol 18, 1566–1575. https://doi.org/10.1681/ASN.2006101164

Travaglini, L., Brancati, F., Silhavy, J., Iannicelli, M., Nickerson, E., Elkhartoufi, N., Scott, E., Spencer, E., Gabriel, S., Thomas, S., Ben-Zeev, B., Bertini, E., Boltshauser, E., Chaouch, M., Roberta Cilio, M., de Jong, M.M., Kayserili, H., Ogur, G., Poretti, A., Signorini, S., Uziel, G., Zaki, M.S., Johnson, C., Attié-Bitach, T., Gleeson, J.G., Valente, E.M., 2013. Phenotypic spectrum and prevalence of INPP5E mutations in Joubert Syndrome and related disorders. Eur J Hum Genet 21, 1074–1078. https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.305

Tsang, S.H., Aycinena, A.R.P., Sharma, T., 2018. Ciliopathy: Bardet-Biedl Syndrome. Adv Exp Med Biol 1085, 171–174. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95046-4_33

Tsang, S.H., Sharma, T., 2018. Rod Monochromatism (Achromatopsia), in: Tsang, S.H., Sharma, T. (Eds.), Atlas of Inherited Retinal Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 119–123. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95046-4_24

Tsao, C.-C., Gorovsky, M.A., 2008. Different effects of Tetrahymena IFT172 domains on anterograde and retrograde intraflagellar transport. Mol Biol Cell 19, 1450–1461. https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0403

van Dijk, E.L., Naquin, D., Gorrichon, K., Jaszczyszyn, Y., Ouazahrou, R., Thermes, C., Hernandez, C., 2023. Genomics in the long-read sequencing era. Trends Genet 39, 649–671. https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.04.006

Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., Bilanges, B., 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 11, 329–341. https://doi.org/10.1038/nrm2882

Vannuccini, E., Paccagnini, E., Cantele, F., Gentile, M., Dini, D., Fino, F., Diener, D., Mencarelli, C., Lupetti, P., 2016. Two classes of short intraflagellar transport train with different 3D structures are present in Chlamydomonas flagella. J Cell Sci 129, 2064–2074. https://doi.org/10.1242/jcs.183244

Veitia, R.A., Caburet, S., Birchler, J.A., 2018. Mechanisms of Mendelian dominance. Clin Genet 93, 419–428. https://doi.org/10.1111/cge.13107

Venot, Q., Blanc, T., Rabia, S.H., Berteloot, L., Ladraa, S., Duong, J.-P., Blanc, E., Johnson, S.C., Hoguin, C., Boccara, O., Sarnacki, S., Boddaert, N., Pannier, S., Martinez, F., Magassa, S., Yamaguchi, J., Knebelmann, B., Merville, P., Grenier, N., Joly, D., Cormier-Daire, V., Michot, C., Bole-Feysot, C., Picard, A., Soupre, V., Lyonnet, S., Sadoine, J., Slimani, L., Chaussain, C., Laroche-Raynaud, C., Guibaud, L., Broissand, C., Amiel, J., Legendre, C., Terzi, F., Canaud, G., 2018. Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. Nature 558, 540–546. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0217-9

Verbakel, S.K., van Huet, R.A.C., Boon, C.J.F., den Hollander, A.I., Collin, R.W.J., Klaver, C.C.W., Hoyng, C.B., Roepman, R., Klevering, B.J., 2018. Non-syndromic retinitis pigmentosa. Progress in Retinal and Eye Research 66, 157–186. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005

Vertii, A., Hung, H.-F., Hehnly, H., Doxsey, S., 2016. Human basal body basics. Cilia 5, 13. https://doi.org/10.1186/s13630-016-0030-8

Wallmeier, J., Nielsen, K.G., Kuehni, C.E., Lucas, J.S., Leigh, M.W., Zariwala, M.A., Omran, H., 2020. Motile ciliopathies. Nat Rev Dis Primers 6, 1–29. https://doi.org/10.1038/s41572-020-0209-6

Wang, H., Wang, L.-S., Schellenberg, G., Lee, W.-P., 2023. The role of structural variations in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. Frontiers in Aging Neuroscience 14.

Wang, J., Silva, M., Haas, L.A., Morsci, N.S., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H., Barr, M.M., 2014. C. elegans ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication. Curr Biol 24, 519–525. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.002

Wang, L., Dynlacht, B.D., 2018. The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. Development 145, dev151407. https://doi.org/10.1242/dev.151407

Wang, L., Liu, Y., Stratigopoulos, G., Panigrahi, S., Sui, L., Zhang, Y., Leduc, C.A., Glover, H.J., De Rosa, M.C., Burnett, L.C., Williams, D.J., Shang, L., Goland, R., Tsang, S.H., Wardlaw, S., Egli, D., Zheng, D., Doege, C.A., Leibel, R.L., 2021. Bardet-Biedl syndrome proteins regulate intracellular signaling and neuronal function in patient-specific iPSC-derived neurons. J Clin Invest 131, e146287, 146287. https://doi.org/10.1172/JCI146287

Wang, S., Sun, S., Xu, J., 2018. Analysis of deep learning methods for blind protein contact prediction in CASP12. Proteins 86 Suppl 1, 67–77. https://doi.org/10.1002/prot.25377

Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet 10, 57–63. https://doi.org/10.1038/nrg2484

Waters, A.M., Beales, P.L., 2011. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. Pediatr Nephrol 26, 1039–1056. https://doi.org/10.1007/s00467-010-1731-7

Webber, W.A., Lee, J., 1975. Fine structure of mammalian renal cilia. Anat Rec 182, 339–343. https://doi.org/10.1002/ar.1091820307

Wei, Q., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, Q., Ling, K., Hu, J., 2012. The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia. Nat Cell Biol 14, 950–957. https://doi.org/10.1038/ncb2560

Wheway, G., Nazlamova, L., Hancock, J.T., 2018. Signaling through the Primary Cilium. Front Cell Dev Biol 6. https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008

Wheway, G., Schmidts, M., Mans, D.A., Szymanska, K., Nguyen, T.-M.T., Racher, H., Phelps, I.G., Toedt, G., Kennedy, J., Wunderlich, K.A., Sorusch, N., Abdelhamed, Z.A., Natarajan, S., Herridge, W., van Reeuwijk, J., Horn, N., Boldt, K., Parry, D.A., Letteboer, S.J.F., Roosing, S., Adams, M., Bell, S.M., Bond, J., Higgins, J., Morrison, E.E., Tomlinson, D.C., Slaats, G.G., van Dam, T.J.P., Huang, L., Kessler, K., Giessl, A., Logan, C.V., Boyle, E.A., Shendure, J., Anazi, S., Aldahmesh, M., Al Hazzaa, S., Hegele, R.A., Ober, C., Frosk, P., Mhanni, A.A., Chodirker, B.N., Chudley, A.E., Lamont, R., Bernier, F.P., Beaulieu, C.L., Gordon, P., Pon, R.T., Donahue, C., Barkovich, A.J., Wolf, L., Toomes, C., Thiel, C.T., Boycott, K.M., McKibbin, M., Inglehearn, C.F., Stewart, F., Omran, H., Huynen, M.A., Sergouniotis, P.I., Alkuraya, F.S., Parboosingh, J.S., Innes, A.M., Willoughby, C.E., Giles, R.H., Webster, A.R., Ueffing, M., Blacque, O., Gleeson, J.G., Wolfrum, U., Beales, P.L., Gibson, T., Doherty, D., Mitchison, H.M., Roepman, R., Johnson, C.A., 2015. An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. Nat Cell Biol 17, 1074–1087. https://doi.org/10.1038/ncb3201

Wijgerde, M., Ooms, M., Hoogerbrugge, J.W., Grootegoed, J.A., 2005. Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells. Endocrinology 146, 3558–3566. https://doi.org/10.1210/en.2005-0311

Williams, C.L., McIntyre, J.C., Norris, S.R., Jenkins, P.M., Zhang, L., Pei, Q., Verhey, K., Martens, J.R., 2014. Direct evidence for BBSome-associated intraflagellar transport reveals distinct properties of native mammalian cilia. Nat Commun 5, 5813. https://doi.org/10.1038/ncomms6813

Windpassinger, C., Piard, J., Bonnard, C., Alfadhel, M., Lim, S., Bisteau, X., Blouin, S., Ali, N.B., Ng, A.Y.J., Lu, H., Tohari, S., Talib, S.Z.A., van Hul, N., Caldez, M.J., Van Maldergem, L., Yigit, G., Kayserili, H., Youssef, S.A., Coppola, V., de Bruin, A., Tessarollo, L., Choi, H., Rupp, V., Roetzer, K., Roschger, P., Klaushofer, K., Altmüller, J., Roy, S., Venkatesh, B., Ganger, R., Grill, F., Ben Chehida, F., Wollnik, B., Altunoglu, U., Al Kaissi, A., Reversade, B., Kaldis, P., 2017. CDK10 Mutations in Humans and Mice Cause Severe Growth Retardation, Spine Malformations, and Developmental Delays. Am J Hum Genet 101, 391–403. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.003

Witzgall, R., 2018. Golgi bypass of ciliary proteins. Seminars in Cell & Developmental Biology, SI: Unconventional protein secretion 83, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.010

Wloga, D., Joachimiak, E., Louka, P., Gaertig, J., 2017. Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia. Cold Spring Harb Perspect Biol 9, a028159. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028159

Xu, Q., Zhang, Y., Wei, Q., Huang, Y., Li, Y., Ling, K., Hu, J., 2015. BBS4 and BBS5 show functional redundancy in the BBSome to regulate the degradative sorting of ciliary sensory receptors. Sci Rep 5, 11855. https://doi.org/10.1038/srep11855

Yanardag, S., Pugacheva, E.N., 2021. Primary Cilium Is Involved in Stem Cell Differentiation and Renewal through the Regulation of Multiple Signaling Pathways. Cells 10, 1428. https://doi.org/10.3390/cells10061428

Yealland, G., Jevtic, M., Eckardt, K.-U., Schueler, M., 2023. Modeling ciliopathies in patient-derived primary cells. Methods Cell Biol 176, 139–158. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2023.02.016

Yee, L.E., Garcia-Gonzalo, F.R., Bowie, R.V., Li, C., Kennedy, J.K., Ashrafi, K., Blacque, O.E., Leroux, M.R., Reiter, J.F., 2015. Conserved Genetic Interactions between Ciliopathy Complexes Cooperatively Support Ciliogenesis and Ciliary Signaling. PLoS Genet 11, e1005627. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005627

Yoder, B.K., Hou, X., Guay-Woodford, L.M., 2002. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. J Am Soc Nephrol 13, 2508–2516. https://doi.org/10.1097/01.asn.0000029587.47950.25

Yoshimura, S., Egerer, J., Fuchs, E., Haas, A.K., Barr, F.A., 2007. Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation. Journal of Cell Biology 178, 363–369. https://doi.org/10.1083/jcb.200703047

Yoshioka, K., Yoshida, K., Cui, H., Wakayama, T., Takuwa, N., Okamoto, Y., Du, W., Qi, X., Asanuma, K., Sugihara, K., Aki, S., Miyazawa, H., Biswas, K., Nagakura, C., Ueno, M., Iseki, S., Schwartz, R.J., Okamoto, H., Sasaki, T., Matsui, O., Asano, M., Adams, R.H., Takakura, N., Takuwa, Y., 2012. Endothelial PI3K-C2α, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. Nat Med 18, 1560–1569. https://doi.org/10.1038/nm.2928

Youn, Y.H., Han, Y.-G., 2018. Primary Cilia in Brain Development and Diseases. Am J Pathol 188, 11–22. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.031

Young, T.-L., Woods, M.O., Parfrey, P.S., Green, J.S., Hefferton, D., Davidson, W.S., 1999. A Founder Effect in the Newfoundland Population Reduces the Bardet-Biedl Syndrome I (BBS1) Interval to 1 cM. The American Journal of Human Genetics 65, 1680–1687. https://doi.org/10.1086/302686

Yu, J.-H., Zhong, X.-Y., Zhang, W.-G., Wang, Z.-D., Dong, Q., Tai, S., Li, H., Cui, Y.-F., 2012. CDK10 functions as a tumor suppressor gene and regulates survivability of biliary tract cancer cells. Oncol Rep 27, 1266–1276. https://doi.org/10.3892/or.2011.1617

Yuan, X., Yang, S., 2015. Cilia/Ift protein and motor -related bone diseases and mouse models. Front Biosci (Landmark Ed) 20, 515–555. https://doi.org/10.2741/4323

Zacchia, M., Blanco, F.D.V., Trepiccione, F., Blasio, G., Torella, A., Melluso, A., Capolongo, G., Pollastro, R.M., Piluso, G., Di Iorio, V., Simonelli, F., Viggiano, D., Perna, A., Nigro, V., Capasso, G., 2021. Nephroplex: a kidney-focused NGS panel highlights the challenges of PKD1 sequencing and identifies a founder BBS4 mutation. J Nephrol 34, 1855–1874. https://doi.org/10.1007/s40620-021-01048-4

Zacchia, M., Capolongo, G., Trepiccione, F., Marion, V., 2017a. Impact of Local and Systemic Factors on Kidney Dysfunction in Bardet-Biedl Syndrome. Kidney and Blood Pressure Research 42, 784–793. https://doi.org/10.1159/000484301

Zacchia, M., Di Iorio, V., Trepiccione, F., Caterino, M., Capasso, G., 2017b. The Kidney in Bardet-Biedl Syndrome: Possible Pathogenesis of Urine Concentrating Defect. Kidney Diseases 3, 57–65. https://doi.org/10.1159/000475500

Zaghloul, N.A., Katsanis, N., 2009. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. J Clin Invest 119, 428–437. https://doi.org/10.1172/JCI37041

Zehra, M., Mushtaq, S., Ghulam Musharraf, S., Ghani, R., Ahmed, N., 2019. Association of Cyclin Dependent Kinase 10 and Transcription Factor 2 during Human Corneal Epithelial Wound Healing in vitro model. Sci Rep 9, 11802. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48092-6

Zhang, D., Zhang, C., Zhu, Y., Xie, H., Yue, C., Li, M., Wei, W., Peng, Y., Yin, G., Guo, Y., Guan, Y., 2023. Recruitment of transcription factor ETS1 to activated accessible regions promotes the transcriptional program of cilia genes. Nucleic Acids Research 51, 6684–6701. https://doi.org/10.1093/nar/gkad506

Zhang, Q., Yu, D., Seo, S., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 2012. Intrinsic Protein-Protein Interaction-mediated and Chaperonin-assisted Sequential Assembly of Stable Bardet-Biedl Syndrome Protein Complex, the BBSome*. Journal of Biological Chemistry 287, 20625–20635. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341487

Zhao, H., Khan, Z., Westlake, C.J., 2023. Ciliogenesis membrane dynamics and organization. Seminars in Cell & Developmental Biology, Special Issue: Membrane dynamics during tissue morphogenesis and differentiation by Stefano De Renzis and Anna Marie Sokac 133, 20–31. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.021

Zhao, H., Yang, Y., Lin, H., Zhang, X., Mort, M., Cooper, D.N., Liu, Y., Zhou, Y., 2013. DDIG-in: discriminating between disease-associated and neutral non-frameshifting micro-indels. Genome Biology 14, R23. https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-3-r23

Zheng, N.-X., Miao, Y.-T., Zhang, X., Huang, M.-Z., Jahangir, M., Luo, S., Lang, B., 2023. Primary cilia-associated protein IFT172 in ciliopathies. Frontiers in Cell and Developmental Biology 11.

Zurcher, K., Kawashima, A., 2021. Kartagener's Syndrome. N Engl J Med 384, e45. https://doi.org/10.1056/NEJMicm2028152

VIII.

Annexes : Matériels et Méthodes

I. Les méthodes

A. Culture cellulaire

Le laboratoire dispose des fibroblastes dérivés de patients obtenues par explants à partir d'une biopsie de peau mise en culture selon le protocole publié par Scheidecker *et al* (Scheidecker et al., 2015a). Les cultures primaires de fibroblastes humains cutanés et les lignées cellulaires de HEK293T sont cultivées dans un incubateur maintenu à 37°C et dans une atmosphère très humide (98%) à teneur de CO2 contrôlée (5%). Le milieu de culture utilisé pour les fibroblastes est le DMEM-Glutamax à 1g/L de glucose (21885-025, Gibco), et celui utilisé pour les HEK293T est le DMEM-Glutamax à 4.5g/L de glucose (10569010, Gibco), ils sont supplémentés en sérum de veau fœtal SVF (10%) et en antibiotiques Pénicilline-Streptomycine PS (1%).

1. Induction de la ciliogénèse

Pour induire la ciliogénèse (la formation du cil primaire), les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM déprivé en sérum (0,1% SVF +1% de PS), pendant 48H.

2. Stimulation de la voie SHH

Pour permettre l'activation de la voie SHH, les fibroblastes cutanés sont cultivés dans le milieu DMEM, +1% de PS contenant 10% de SVF (+SVF) ou 0.1% de SVF (-SVF) supplémenté avec le SAG ou pas (Smo AGonist) (ab145866 Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) à cf=100 nM pendant 48H. Le SAG est obtenu sous forme d'une poudre qui est resuspendue dans du DMSO et stockée à ci=4mM à -20°C. Selon la question biologique, la voie SHH peut aussi être stimulée avec le ligand rhSHH (recombinant human Sonic Hedgehog, Biotechne, 8908-SH-005) qui est aussi ajouté au milieu de culture à cf=80nM pendant 48H.

B. Validation des variants génétiques

1. Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

L'extraction d'ARN s'effectue à partir de culots de fibroblastes cutanées, en suivant les instructions des 2 kits QUIAshredder (Qiagen, ref 79654) et RNeasy Minikit (Qiagen, ref 74104). La quantification de l'ARN est réalisée par spectrophotomètre (Eppendorf Bio Photometer Plus) à 260nm. L'ADNc est produit par reverse transcription en utilisant le kit "iScript ™ c Synthesis Kit" (170-889, Bio-Rad, USA) selon les instructions du fournisseur à partir de 500ng d'ARN. L'ARN est stocké à -20°C et l'ADNc à 4°C.

2. Design des amorces

Les amorces sont générées au laboratoire grâce aux logiciels Ensembl-Browser (Martin et al., 2023), Primer3 (https://github.com/primer3-org), UCSC browser « in silico PCR » (Nassar et al., 2023) et NCBI primers (Sayers et al., 2022). Le choix des couples d'amorces est fait en

respectant certains critères : les séquences font 25pb, ont une température d'hybridation Tm aux alentours de 60°C et une proportion en GC entre 40 et 60%. Pour les couples générés dans le but d'amplifier de l'ADNg ou de l'ADNc par PCR ou RT-PCR, les couples d'amorces sont choisis pour cibler des séquences d'exons ou d'introns en fonctions de la localisation du variants de sorte à être de part et d'autre de ce dernier avec une taille maximale de 1000pb. Pour les couples d'amorces utilisés dans les qRT-PCR, les couples sont choisis pour cibler les exons uniquement, de préférence à cheval entre deux exons et espacé d'un grand intron pour être sûre d'amplifier l'ARN et pas d'ADNg. Les couples sont choisis pour avoir un fragment de moins de 200pb. Les amorces que j'ai utilisées pour tous les projets de ma thèse sont référencés dans le (Tableau 4).

3. PCR et RT-PCR

L'amplification des ADNg et ADNc est réalisée par PCR et RT-PCR respectivement. Pour une PCR classique, la réaction est réalisée avec 10ng d'ADNs par réaction, le couple d'amorces approprié est dilué à cf=0,5µM, la Taq polymérase (2U/réaction) et le mix PCR 5X dilué à 1X. Dans le thermocycleur, la dénaturation est effectuée à 95°C, l'hybridation à 60° et l'élongation à 72°C. Le protocole de PCR classique peut être adapté en fonction de la question biologique et des caractéristiques des séquences à amplifier. Par exemple, la PCR « Touch down » est une méthode particulière de réaction en chaine par polymérase, ce protocole est utilisé pour amplifier des fragments d'ADN faiblement représentés grâce à l'application d'une température d'hybridation inférieure de plusieurs degrés à la Tm estimée des amorces lors des premiers cycles afin d'assurer une forte stringence et donc une amplification spécifique de la séquence d'intérêt, qui devient alors majoritaire vis-à-vis de ses compétiteurs. Le protocole est réalisé avec 10ng d'ADN par réaction. Dans le thermocycleur, la dénaturation est effectuée à 95°C et est suivie de 14 cycles à 61,5°C puis une amplification durant 35 cycles à une de température de 63,5°C.

Dans d'autres conditions une PCR duplex peut aussi être réalisée, elle consiste à utiliser 2 couples d'amorces un 1er couple spécifique du gène d'intérêt et un 2ème couple spécifique d'un gène de référence (dont l'amplification est sure, contrôle positif). Les conditions expérimentales sont les même que ceux pour la PCR « Touch down ».

Si les amorces ou les séquences à amplifier sont riches en GC, l'ajout du DMSO en quantité variable (3, 5, 10%) au milieu réactionnel peut augmenter la stringence de l'amplification. L'autre alternative est de réaliser la PCR avec le kit « Phusion High-Fidelity DNA polymerase » (Thermofisher, F-530L) selon les instructions du fournisseur.

J'ai réalisé les différents types de PCR en m'adaptant aux différentes conditions en fonction des projets.

La visualisation des fragments amplifiés se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Un volume du produit de PCR est alourdi avec un bleu de charge et l'ensemble est déposé sur le gel d'agarose en parallèle du dépôt d'un marqueur de taille. Si la bande amplifiée est spécifique et unique, le reste du volume sera purifié sur membrane et envoyé au séquençage Sanger via la compagnie eurofins.

4. Séquençage Sanger

Pour obtenir la séquence exacte des fragments amplifiés, le produit PCR est toujours purifié pour éliminer les résidus de Taq, d'amorces et de dNTP non incorporés et cela en le déposant sur une membrane placée sous vide pendant 10 min. Seuls les fragments PCR persistent sur la membrane, et seront resuspendus dans l'eau pendant 15min sous une légère agitation. La solution récupérée est ensuite envoyée avec l'amorce à utiliser pour le séquençage. Le laboratoire sous-traite l'étape de séquençage par Eurofins. Nous observons les séquences grâce à des logiciels comme Bioedit (https://bioedit.software.informer.com/) et ApE (A plasmid Editor) et nous alignons les séquences grâce à des logiciel comme multAlin (https://multalin.toulouse.inra.fr).

C. Etude de l'expression génétique

1. RT-qPCR, PCR quantitative en temps réel

Pour quantifier l'expression d'un gène, j'utilise l'ADNc obtenus à partir de l'ARN extrait à partir des culots de fibroblastes dérivés des patients en triplicats biologiques (issu de trois cultures différentes), et ceux de trois contrôles différents pour comparer les résultats. L'ADNc est dilué au 5ème ou 10ème dans chaque puit (dans les plaques 384 puits). L'iQTM SYBR Green Supermix Biorad (170-8886) est mélangé avec les amorces (ci=100 µM) diluées pour avoir cf=0,75 µM. La qPCR est réalisée selon le protocole suivant : première dénaturation à 95°C (5 min) suivie de 39 cycles à 95°C (10 s), 60°C (30 s) suivie d'une augmentation de 0,5°C (5 s/étape) de 65°C à 95°C pour générer les courbes de fusion ou « melting curves ». Le niveau d'expression des gènes a été calculé à l'aide la méthode de quantification relative basée sur la comparaison des (Ct) des cycles ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Les (Ct) de l'ARN messager (ARNm) cible ont été normalisé par rapport à ceux du gène de référence *GAPDH* à l'aide du logiciel CFX Manager version 1.5 et des calculs sur Microsoft Excel. Les données sont présentées sous forme d'expressions relatives ± SEM (standard error of mean). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les valeurs *p* ont été déterminées à l'aide d'un test ANOVA à deux voies (test de comparaison multiple de Tukey). ns : non significatif; * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

D. Etude de l'expression protéique

1. Extraction de protéines totales

L'extraction de protéines totales est réalisée avec le RIPA, c'est un tampon de lyse obtenu constitué de NA3VO4 (1M), de NaF (1M), et du cocktail anti-protéase 25X (Complete EDTA free, 05056489001, Roche). Selon la taille du culot cellulaire, un volume de RIPA lui est ajouté (normalement 3X le volume du culot), et les cellules sont lysés par une lyse mécanique avec des mouvement d'aspiration-reflux à la pipette. La lyse est suivie d'une centrifugation à 15000rpm pendant 20min à 4°C permettant de séparer les protéines libérer dans le surnageant des débris membranaires qui forme un culot. Le surnageant est récupéré et les protéines sont quantifiées par le test de Bradford qui consiste à mélanger 200µl du réactif de Bradford (Bio-

rad protein assay, cat.#500-0006, Bio-rad laboratories GmbH, München) avec 800µL d'eau distillée et 1µL de l'échantillon. La concentration protéique des échantillons est obtenue en se référant à une gamme de concentration de BSA.

2. Extraction différentielle de protéine

Le culot cellulaire est d'abord lysé par des mouvements d'aspiration-reflux dans un 1ml du tampon (1) contenant du PBS1X supplémenté avec du cocktail anti-protéase 25X dilué au 1X (Complete EDTA free, 05056489001, Roche). Le lysat est ensuite congelé à -80°C pendant 1H puis décongelé, le cycle de congélation/décongélation est réalisé 3 fois. Un volume du lysat est prélevé dans un tube à part et correspond à la fraction de protéine totale (Input, I). Le reste du lysat est centrifugé à 13000g pendant 25min à 4°C. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et correspond à la fraction de protéine cytoplasmique (C). Le culot restant est resuspendu dans 500µl du tampon (2) contenant du Tris HCl (cf=20mM, PH=7,5) du NaCl cf=150mM, de l'EDTA (cf=1mM), du triton 100X à 1% et de l'antiprotéase à 1X. Une sonication de l'échantillon est par la suite réalisée (2 cycles de pulse pendant 30s) pour bien libérer les protéines membranaires. L'échantillon est par la suite centrifugé à 13000g pendant 25min à 4°C. Le surnageant est récupéré et correspond à la fraction des protéines membranaires solubilisées (M). Enfin le culot restant est resuspendu dans le tampon (2) pour obtenir la fraction de protéines nucléaires (N). Ainsi toutes les fractions protéiques sont obtenues séparément.

3. Western blot

Le Western blot (WB) est une technique semi-quantitative qui permet la détection et l'identification de protéines. 30 à 40 µg d'extrait total de protéines sont mélangés avec du Laemmli 4X (dilué au 1/4) (Laemmli Sample buffer, cat.#161-0747, Bio-Rad laboratories) contenant du β-mercapto-éthanol (un agent réducteur) et chauffée à 95°C pendant 15 min afin d'éliminer les complexes protéiques résiduels. Les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide SDS-page 10% Mini PROTEAN TGX, Bio-RAD (456-1034), ou un gel de polyacrylamide de 8 ou 10%. La migration est lancée dans un tampon TGS1X (préparé à partir de 10X, 25mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% (w/v) SDS, 161-0772, Biorad). Un marqueur de taille est systématiquement ajouté en parallèle (Precision plus protein™ all blue, cat.#161-0373, Biorad). Une fois cette migration terminée, l'électrotransfert du gel est réalisée sur une membrane de PVDF (0.2 µM) Trans-Blot Turbo, Transfer Pack, Bio-RaD (1704156) au moyen d'un Transblot® Turbo™ transfer system (Biorad). Pour saturer les sites aspécifiques la membrane est bloqué avec du lait 5% TBS1X-Tween 0.1% pendant 1H à température ambiante (RT). La membrane est par la suite incubée avec un anticorps primaire pendant 2H à RT ou pendant la nuit à 4°C selon les conditions de chaque anticorps, lavée au TBS1X-T 0.1% puis incubée avec l'anticorps secondaire (pendant 1H à RT). Par la suite la membrane est lavée TBS1X-T 0,1% puis au TBS1X pour être finalement révélée par chimiluminescence avec un Chemidoc™ MP imaging System (biorad) en utilisant les solutions Super signal R West femto Maximum Sensitivity substrate (prod#34095, thermoscientific) ou PierceTM ECL Western (ref 32209, Thermoscientific). La quantification des bandes est réalisée avec le logiciel Image Lab software 6.0.1 (Bio-Rad). Les WB sont réalisés en triplicat (n=3) et la quantité des protéines d'intérêt est normalisée par rapport aux protéines de références

cytoplasmiques la β-Tubuline (50KDa) ou la GAPDH (37KDa), nucléaire : l'histone H3 (20KDa), membranaire : la sodium potassium ATPase (112KDa) et la protéine disulfure isomérase (PDI, 57KDa) situé dans le cytoplasme et la lumière du réticulum endoplasmique. Les anticorps utilisés dans ces expériences sont disponibles dans le (Tableau 5)

E. Etude de la fonction enzymatique (kinase)

1. Extraction lipidique et ELISA

J'ai réalisé l'ELISA dans le projet portant sur PIK3C2A (dans le projet 2) dans le but de déterminer son activité kinase en quantifiant un de ses produits qui est la phosphoinositide PI3P et en comparant sa quantité dans les fibroblastes cutanés des patients et des contrôles. L'ELISA et l'extraction de lipides ont été réalisés en suivant les instructions du fabricant du kit (Echelon Biosciences Inc, K-3300). Après avoir suivi un protocole d'extraction de lipides, les échantillons de PI3P obtenus à partir de millions de cellules sont détectés par un ELISA compétitif. Les échantillons lipidiques sont mélangés et incubés avec une protéine détectrice de PI3P, puis ajoutés à une microplaque recouverte de PI3P pour une liaison compétitive. Un détecteur secondaire lié à la peroxydase et une révélation colorimétrique sont utilisés pour détecter la liaison de la protéine PI3P à la plaque. L'absorbance est détectée à 450 nm sur un lecteur de plaque. Le signal colorimétrique est inversement proportionnel à la quantité de PI3P obtenue. Le test est sensible à 1,0 pmol de PI3P. Les quantités de PI3P ont été estimées en comparant les valeurs des puits contenant les échantillons d'extraction de PI3P aux valeurs de la courbe standard. L'expérience a été réalisée sur des échantillons biologiques en trois exemplaires et les extraits de PI3P ont été déposés en quatre exemplaires sur la plaque ELISA. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les valeurs *p* ont été déterminées à l'aide du test ANOVA ordinaire à sens unique (test de comparaison multiple de Tukey). ns : non significatif, **** : $p < 0,0001$

F. Immunofluorescence

Pour les analyses de la ciliogénèse et la longueur du cil réalisées avec le système d'imagerie IncuCyte S3-Sartorius, les fibroblastes cutanés dérivés de patients et de contrôles sont cultivés dans des plaques 24 puits (Falcon, 3226). Pour l'acquisition d'images plus précises avec un microscope à objectif de plus grand grossissement (Thermo Scientific Nunc 15411), les fibroblastes sont cultivés dans des Lab-Tek8 à 8 chambres. Après l'induction de la ciliogénèse pendant 48H, les cellules sont fixées dans du méthanol glacé pendant 10 minutes à -20 °C, ou dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 10min à RT. Elles sont ensuite perméabilisées avec du 0,1 %TritonX-100-PBS1X à, et bloquées dans du 10 % SVF-PBS1X pendant 1H à RT. L'incubation avec les anticorps primaires dilués dans 2 % SVF-PBS1X est réalisée pendant 1H à RT ou sur la nuit à 4 °C. L'incubation des anticorps secondaires est effectuée pendant 1H à RT, ils sont dilués dans la même solution.

Pour les cellules cultivées dans les Lab-Tek8, les noyaux sont marqués avec du Hoechst dilué au 1/1000ème dans du PBS1X. Le montage des lames/lamelles est réalisé avec le milieu de montage ProLong Gold Antifade (Thermofisher, P36930). Les images sont acquises avec un

microscope confocal à fluorescence inversé (Zeiss LSM 800, objectif à l'huile d'immersion 63×), ou avec un microscope Spinning disk à fluorescence inversé (Olympus spinning disk, objectif à eau, 60×).

Pour celles réalisées dans des plaques 24 puits, les images sont obtenues à l'aide du système d'imageries automatique d'IncuCyte S3-Sartorius.

- Pour l'étude de la ciliogénèse, les images sont traitées avec ImageJ pour le comptage des cellules et des cils. La fréquence des cils est calculée par la division du nombre de cellules ciliées par le nombre total de cellules (n = 400 cellules analysées par échantillon). Les valeurs *p* sont déterminées à l'aide d'une ANOVA ordinaire à sens unique **** : p < 0,0001.
- La longueur du cil est mesurée avec le logiciel IncuCyte, quel que soit l'angle d'orientation du cil (n = 400 cils sont mesurés). Les valeurs *p* sont calculées par le test de Kruskal-Wallis **** : p < 0,0001.

Les données sont collectées à partir de deux expériences distinctes réalisées sur des triplicats biologiques de chaque échantillon dans chaque expérience. Les analyses statistiques et les graphiques sont générés à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les anticorps utilisés dans ces expériences sont disponibles dans le (Tableau 5).

G. Test de prolifération cellulaire

Pour mesurer la prolifération cellulaire, les cellules sont détachées de leur support de culture à l'aide de la trypsine et comptées avec un compteur de cellules automatique (LUNA-FL™). Elles sont ensuite ensemencées dans des plaques 24 puits avec une même quantité de 10^4 cellules/puits (faire des triplicats de puits par lignée). Le réactif IncuCyte® NucLight Rapid Red (Sartorius Cat# 4717) qui marque par fluorescence le noyau des cellules vivantes est ensuite dilué au 1/50ème et rajouté directement dans chaque puit. La viabilité des cellules est mesurée grâce à l'IncuCyte S3-Sartorius qui est un système d'imagerie des cellules vivantes en temps réel. Un programme d'imagerie automatique est régulé pour acquérir des images toutes les 2h sur une durée de 10 jours. Pour analyser les résultats, chaque mesure est normalisée par rapport au jour 0 (le lendemain de l'ensemencement après adhérence des cellules) et exprime l'évolution de la prolifération sur le temps (fold increase). Trois expériences indépendantes sont réalisées à chaque fois (n=3). Les graphiques et les tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les valeurs *p* sont déterminées à l'aide du test ANOVA à deux voies. ns : non significatif, ** *p* < 0,01

H. Expériences de complémentation

1. La lipofection

J'ai réalisé les mises au point des expériences de transfection dans le cadre du projet *BBS5* dans le but de compenser la mutation dans les fibroblastes cutanés dérivés du patient et voir si le phénotype ciliaire pouvait être corrigé ou pas. Les mises au point de transfection ont été

réalisées sur deux types cellulaires, sur des cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney) et sur les fibroblastes cutanées (des cellules primaires) issues du patient *BBS5* et de contrôles. Les HEK 293T sont des lignées cellulaires immortalisés qui ont été générées dans le laboratoire de Frank Graham en utilisant la technique de transfection par phosphate de calcium dans des cellules eucaryotes (incorporation de l'antigène grand T SV40 du virus dans le génome des HEK293). Ces lignées cellulaires sont connues pour leur grande capacité de prolifération permettant de générer une quantité importante de matériel biologique rapidement. Elles sont normalement facilement transfectable. Je les utilise donc comme des contrôles positifs pour les réactions de transfection.

- Lipofectamine 3000

C'est le système de transfection avec des nanoparticules lipidiques permettant l'intégration du gène d'intérêt dans les cellules. Les cellules sont détachées de leur support de culture avec la trypsine et comptées avec le compteur automatique LUNA. Elles sont ensemencées dans les plaques 24 puits, 2.10^5 cellules/puits pour les HEK et 8.10^4 cellules/puits pour les fibroblastes du patient *BBS5*. Le milieu de culture utilisé pour les HEK est le DMEM 4.5g/l de glc (10%SVF, 1%PS) alors que celui utilisé pour les fibroblastes est le DMEM 1g/l de glc (10% SVF, 1%PS). Les plaques de cellules sont ensemencées la veille et transfectés le lendemain le milieu de culture DMEM est alors remplacé par l'optimem (500µl/puit) (ThermoFischer Scientific, 31985062), et les différents mélanges d'optimem, lipofectamine 3000 (Invitrogen, L3000-008) et plasmides sont préparés selon les instructions du fournisseur. Deux types de plasmides sont utilisés, un plasmide GFP vide comme contrôles positif, et le plasmide *BBS5*-WT-GFP (ORIGENE, RG208464). Trois mélanges différents sont préparés : mélange (1) avec de l'optimem et la lipofectamine 3000, mélange (2) correspond au mélange (1) avec le plasmide GFP-vide à 100ng/µl et le mélange (3) correspond au mélange 1 avec en plus le plasmide BBS5WT-GFP-tagged testé pour 3 concentrations 100, 250 et 500ng/µl, le ratio 1 :1 de l'ADN dilué et de la lipofectamine 3000 doit être respecté. Les mélanges sont ensuite vortexés et laissés à RT pendant 20min. Ensuite les mélanges sont distribués dans une plaque 24 puits selon le plan correspondant, 50µl/puit ajouté goute à goute. La plaque est placée dans l'IncuCyte S3 (Sartorius) qui par un système automatique d'acquisition d'images (toutes les 2H sur 48H) nous permet de suivre la transfection cellulaire (apparition de la fluorescence verte de la GFP dans les cellules est un contrôle de bonne transfection).

- Lipofectamine LTX and PLUS™ Reagent

Les fibroblastes du patient *BBS5* et ceux d'un contrôle sont ensemencées dans une plaque 24 puits (2.10^5 cellules/puit) et laisser à l'incubateur pour adhérer sur la nuit. Le lendemain le milieu de culture DMEM 1g/l (10%SVF, 1%PS) est renouvelé (500µl/puit) et les mélanges sont préparés à partir de l'optimem, la lipofectamine LTX (1.5µl/puit) (Invitrogen, 15338-030), le PLUS™ Reagent (0.5µl/puit) et les deux plasmides GFP-vide (contrôle positif) et le BBS5WT-GFP (500ng/puit) séparément. Après incubation des mélanges 5min à RT ils sont distribués

selon le plan de plaque dans les puits goutte à goutte (50µl/puit). Le milieu DMEM 1g/l (10%SVF) est changé en milieu DMEM 1g/l (0.1%SVF) après 24H pour certains puits et après 48H pour d'autres afin de déterminer les conditions pour lesquelles la transfection et l'expression de BBS5-WT est optimale et le plus stable dans les cellules ciliées. La transfection est suivie dans Incucyte pendant 72H.

- X-tremeGENE 9 DNA

Les cellules sont détachées de leur support de culture avec la trypsine et comptées avec le compteur automatique LUNA. Elles sont ensemencées dans les plaques 24 puits, 2.10^5 cellules/puits pour les HEK et 8.10^4 cellules/puits pour les fibroblastes du patient *BBS5*. Les cellules adhèrent sur la nuit à 4°C. Le lendemain un changement des milieux de culture (DMEM 4.5g/l pour les HEK et DMEM1g/l pour les fibroblastes) est réalisées avec (10%) et sans (0.1%) SVF pour faire des transfections avec et sans induction de la ciliogénèse. Les mélanges d'optimem, X-tremeGENE 9 (Roche, 6365779001) et des 2 types de plasmides GFP-vide et *BBS5*-GFP sont réalisée avec 500ng de plasmide/puit en respectant le ratio 3 : 1 (ADN, X-tremeGENE 9). Les mélanges sont gardés 20min à RT avant d'être distribuées goutte à goutte dans les puits de la plaque en respectant le plan. La transfection est suivie avec l'Incucyte et son système automatique d'acquisition des images toutes les 2H pendant 48H.

- X-tremeGENE^{TM} HP

Le protocole utilisant l'X-tremeGENE^{TM} HP (Roche, 6366236001) est le même qu'avec l'X-tremeGENE 9. Avec cet agent de transfection, j'ai réalisé des modifications quant à l'induction de la ciliogénèse, le milieu +SVF a été changé en milieu -SVF après 24H du début de la transfection pour certains puits et après 48H pour d'autres afin de déterminer les conditions pour lesquelles la transfection et l'expression de BBS5-WT est optimale et la plus stable dans les cellules ciliées. La transfection est suivie toujours avec l'Incucyte pendant 72H.

2. La magnétofection

La magnétofection est une transfection assistée par aimant, c'est une méthode qui exploite la force magnétique exercée sur les vecteurs de gènes associés à des particules magnétiques pour conduire les acides nucléiques vers et dans les cellules cibles (Figure 46).
J'ai réalisé ces deux tests de magnétofection avec deux agents différents cette fois que sur les fibroblastes du patients *BBS5* et d'un contrôle.

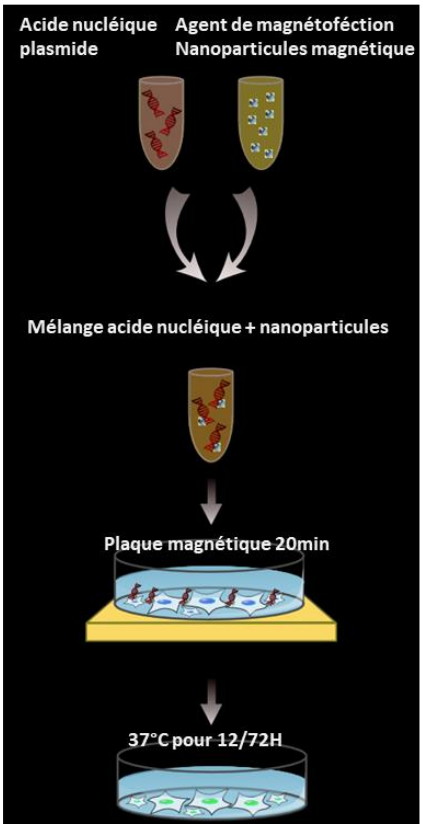


Figure 46 : La magnétofection. Schéma présentant le principe de la magnétofection avec ses différentes étapes.

- Glial-Mag

Glial-Mag (OZBIOSCIENCES, GL-00250) est conçu pour atteindre une efficacité de transfection optimale avec les lignées cellulaires microgliales et les cellules primaires. Le kit Glial-Mag est l'association d'une formulation spécifique de nanoparticules magnétiques (réactif Glial-Mag), issue de la technologie Magnetofection™ et d'un booster (Glial-Boost) conçu pour améliorer l'efficacité de la transfection.

Les fibroblastes sont ensemencés dans la plaque 24 puits ($10^{\wedge 5}$ cellules/puits) et adhèrent sur la nuit dans l'incubateur à37°C. Le lendemain (~70% de confluence cellulaire) les mélanges sont préparer selon les volumes indiqués dans le tableau ci-dessous. L'ADN (les plasmides GFP-vide et BBS5-GFP) et le Glial-Mag sont mélangés par des mouvement d'aspiration-reflux à l'aide de la pipette le mix est incubé pendant 20min à RT. 100µl du mélange sont rajouté dans chaque puit goutte à goutte. Le Glial-Boost est rajouté directement dans chacun des puits pour cf=1X. Les cellules sont ensuite placées sur la plaque magnétique pendant 30 minutes, suivit de 2H dans l'incubateur à 37°C. Un changement de milieu est effectué après les 2H de transfection et la plaque est placée dans l'Incucyte pour suivre la transfection pendant 72H avec ou sans changement de milieu pour induire la ciliogénèse.

Plaque	Quantité d'ADN (µg)	Volume de dilution (µl)	Glial-Mag (µl)	Gial-Boost (µl)	Volume de transfection
24 puits	0.2	100	0.4/0.6/0.7/0.8	5	500 µL

- PolyMag Neo

Le réactif PolyMag Neo Magnetofection™ (OZBIOSCIENCES, PG60100) est spécifiquement conçu pour obtenir une efficacité de transfection élevée dans les cellules primaires et les cellules difficiles à transfecter, combinée à un niveau d'expression du transgène supérieur. Il est composé de nanoparticules magnétiques enrobées de molécules cationiques.
Les fibroblastes sont ensemencés dans la plaque 24 puits ($10^{\wedge 5}$ cellules/puits) et adhèrent sur la nuit dans l'incubateur à 37°C. Le lendemain (~70% de confluence cellulaire) les mélanges sont préparer selon les volumes indiqués dans le tableau ci-dessous. Après 20min d'incubation RT 100µl des mélanges sont rajouté aux puits selon le plan de plaque et la plaque des cellules est placé sur la plaque magnétique pendant 30min à RT. Ensuite la plaque est maintenue à 37°C pendant plusieurs jours pour évaluer la transfection avec et sans induction de la ciliogénèse.

Plaque	Quantité d'ADN (µg)	Volume de dilution (µl)	PolyMag Neo (µl)	Volume de transfection
24 puits	0.5-2	100	0.5-2	500µl

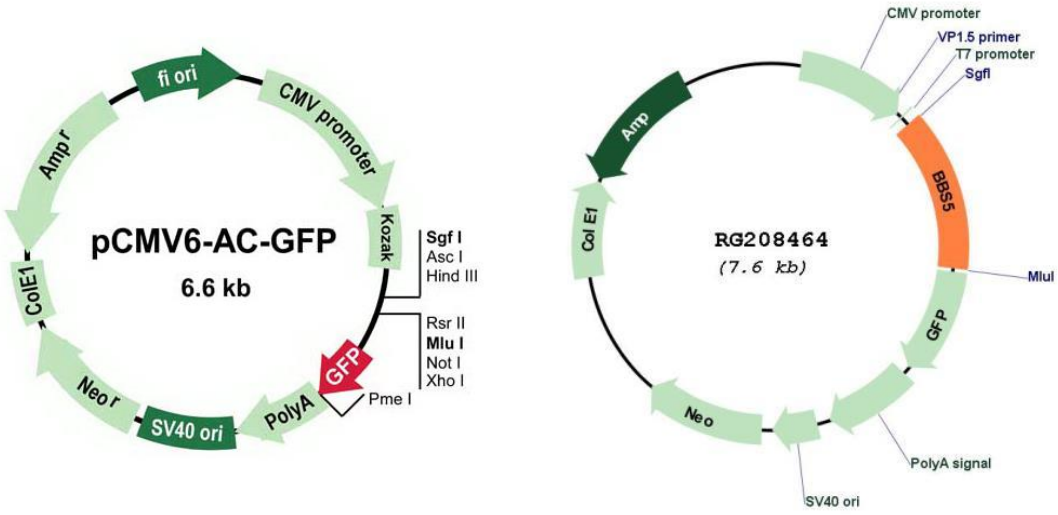


Figure 47 : Carte des plasmides GFP-vide (ORIGEN, PS100010) et BBS5WT-GFP-tagged (ORIGENE, RG208464).

II. Le matériel

A. Tableau 4 : Liste des amorces

Applications	Gènes (HGVS)	Introns/Exons	Amorces sens (5'-3')	Amorces antisens (5'-3')	Taille (pb)
Projet 2 portant sur *BBS5*					
PCR duplex1 ADNg	*BBS5*	F1 et R1	GGCACCAGGATTCTCATACC	TGGGTCACTTGAAGTCAGGA	389/6309
	PSMC3	7 - 8	GGCGTGTCCCTGAGTTAGAG	AGGAACCACAATTTAGCACAA	603
PCR duplex2 ADNg	*BBS5*	F2 et R2	TGTACACTCACGTTCCTTTGTC	CAGAGAAGCAGGCTTACAACAG	663/6580
	DISC1	10	ACCCTGTACTTGGAGGTATGTG	ACCCCTGCCCTCCAATATTTGT	925
qRT-PCR ADNc	*BBS5*	6-7 à 8	TCCAGTGATCAGGGCAATTT	TGAGAGCTTTCTATGACAAGAGC	167
	BBS5	1 à 3	ATGCCAAAGAGTGCCAGAGA	TCCGTTTCGACCTGTCCG	153
	BBS5	5-6 à 6-7	TGGCAGTACACGAGCTTATGA	TGATCAGGGCAATTTAGGAACC	164
	BBS5	9 à 9-10	GTGGTGGATATGTTCTTGGCT	CTGGGGCTTTTCTTCCATCTC	140
	GLI1	7 à 9	CTGCAGCCAGGAATTTGACT	CGAGGCGTGAGTATGACTTCC	224
	GLI2	2 à 3	AAGCAAGAAGCCAAAAGTGG	TGGTACCTTCCTTCCTGGTG	188
	GLI3	2 à 3	GGCATTTTTGGTCGAAGAGA	GGACATTCTGTGGCTGCATA	238
	SUFU	2-3 à 3	ACAGAGTCCATGAGTTTACAGG	CGTATCGTGCCAAGCCCT	138
	PTCH1	2-3 à 3	GTGGAAGTTGGAGGACGAGT	AGTCCAGGTGTTGTAGGAGC	154
	SMO	2 à 3	TGCCCAAGTGTGAGAATGAC	TACCAGCTCTTGGGGTTGTC	229
	GAPDH	4-5 à 6	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197
	HPRT	1-2 à 2-3	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	AGACGTTCAGTCCTGTCCATAA	131
Projet 2 portant sur *PIK3C2A*					
PCR ADNg	*PIK3C2A*	Ex1-int2	AGCCTAAGGTGGATAATGTGGA	GGCAGGAGAAGGGTGTGAA	426bp
	PIK3C2A	Int23-int24	TCCCAGTTTGTATGCTATTGAGA	TATGTTCAAATGGAGCCGCG	409bp
PCR ADNc	*PIK3C2A*	2 à 3	TCAAAAGTCAGCAATCTACAGGT	TGGCAAACTACTGGTCCCAT	345bp
	PIK3C2A	22 à 24-25	TTTCAAATGTCTCTCAACTGGC	CCGATCCCTTTTGAAGCTG	347bp
qRT-PCR ADNc	*PIK3C2A*	19 à 20	CCAGACAGGTTGTTCTCCAA	AGAACTGAAGAAGGAACACGAC	134bp
	PIK3C2A	29 à 31	CGGATGTAGCAGAGTGTGATCT	TGGATAATTTCACAGCTCCTCC	144bp
	GLI1	7 à 9	CTGCAGCCAGGAATTTGACT	CGAGGCGTGAGTATGACTTCC	224bp
	PTCH1	2-3 à 3	GTGGAAGTTGGAGGACGAGT	AGTCCAGGTGTTGTAGGAGC	154bp
	GAPDH	4-5 à 6	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197bp
Projet 2 portant sur *CDK10*					
PCR ADNc	*CDK10*	7 à 12-13	CCAACTTGCTCATGACCGAC	TCACAGGGTAGGGGCTTCT	493bp
	CDK10	1 à 5	ATCTGGAGTGCGAGCAGATC	GCTCACAGTAACCCATCACC	351bp
	CDK10	4 à 10-13	AACATCGTGGAGCTGAAGGA	TCAGGGTTTACAGCGCTTG	795bp
	CDK10	5 à 7-8	GGTGATGGGTTACTGTGAGC	CGAAATCCGCTGTCTTCACA	203bp
qRT-PCR ADNc	*CDK10*	4 à 5	GCCTGCGTCATCCGAACAT	AGGGTGTTGGCATATTCTCCAG	129
	CDK10	4-5 à 6	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197

Projet 3 portant sur *BBS1*, *BBS10* et *IFT172*					
qRT-PCR ADNc	*GLI1*	7 à 9	CTGCAGCCAGGAATTTGACT	CGAGGCGTGAGTATGACTTCC	224bp
	PTCH1	2-3 à 3	GTGGAAGTTGGAGGACGAGT	AGTCCAGGTGTTGTAGGAGC	154bp
	GAPDH	4-5 à 6	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197bp

B. Tableau 5 : Liste des anticorps

Type d'AC	Nom	Espèce	Dilution	Référence	Fournisseur
Projet 2 portant sur *BBS5*					
WB					
Primaire	Anti-BBS5	Lapin	1/500	14569-1-AP,	Proteintech
	Anti-β-Tubuline	Mouse	1/2500	AG-tub-2012	Euromedex
	Anti-PTCH1	Lapin	1/1000	ab53715	abcam
	Anti-GLLI2	Lapin	1/2000	18989-1-AP	ProteinTech
	Anti-GLI2	Chèvre	1/1000	AF-3635	R&D systems
	Anti-GAPDH	Souris	1/3000	ab139413	abcam
	Anti-Sodium Potassium ATPase	Souris	1/3000	ab139413	abcam
	Anti-Histone	Souris	1/3000	ab139413	abcam
Secondaire	Anti-souris (HRP linked)	Cheval	1/2000	7076	Cell signaling
	Anti-lapin (HRP linked)	Ane	1/2000	7074	Cell signaling
	Anti-chèvre (HRP linked)	Souris	1/3000	sc-2354	Santa Cruz
IF					
Primaire	Anti-ARL13B	Souris	1/500	Sc-515784	Santa cruz biotechnology
	Anti-γ-Tubuline	Lapin	1/500	PA5-34815	Invitrogen
	Anti-SMO	Souris	1/500	Sc-166685	Santa cruz biotechnology
Secondaire	Anti-souris (Alexa Fluor™ 488)	Chèvre	1/1000	A11001	Invitrogen
	Anti-lapin (Alexa Fluor™ 594)	Ane	1/1000	A21207	Invitrogen
Projet 2 portant sur *PIK3C2A*					
WB					
Primaire	Anti-PIK3C2A	Lapin	1/1500	22028-1-AP	Proteintech
	Anti-βTubuline	Lapin	1/2500	2128	Cell signaling
Secondaire	Anti-souris (HRP linked)	Cheval	1/2000	7076	Cell signaling
	Anti-lapin (HRP linked)	Ane	1/2000	7074	Cell signaling
IF					
Primaire	Anti-ARL13B	Souris	1/500	Sc-515784	Santa cruz biotechnology
	Anti-ARL13B	Lapin	1/200	17711-1-AP	Proteintech
	Anti-γTubuline	Lapin	1/500	PA5-34815	Invitrogen
	Anti-PI3P	Souris	1/200	Z-P003	Echelon Biosciences Inc
Secondaire	Anti-souris (Alexa Fluor™ 488)	Chèvre	1/1000	A11001	Invitrogen
	Anti-lapin (Alexa Fluor™ 594)	Ane	1/1000	A21207	Invitrogen
Projet 2 portant sur *CDK10*					
IF					
Primaire	Anti-Myc	Souris	1/4000	9B11	Cell Signaling 2276
	Anti-βTubuline	Souris	1/4000	2021 #22	Robert
	Anti-ARL13B	Souris	1/500	Sc-515784	Santa cruz biotechnology
	Anti-γ-Tubuline	Lapin	1/500	PA5-34815	Invitrogen
Secondaire	Anti-souris (Alexa Fluor™ 488)	Ane	1/2000	A432766	Invitrogen
	Anti-souris (Alexa Fluor™ 488)	Ane	1/1000	Ab150105	Abcam
	Anti-lapin (Alexa Fluor™ 594)	Ane	1/1000	A21207	Abcam

Projet 3 portant sur *BBS1*, *BBS10* et *IFT172*					
IF					
Primaire	Anti-ARL13B	Souris	1/500	Sc-515784	Santa cruz biotechnology
	Anti-γ-Tubuline	Lapin	1/500	PA5-34815	Invitrogen
Secondaire	Anti-souris (Alexa Fluor™ 488)	Chèvre	1/1000	A11001	Invitrogen
	Anti-lapin (Alexa Fluor™ 594)	Ane	1/1000	A21207	Invitrogen

C. Tableau 6 : Liste des bases de données et des logiciels

Nom	**Application**	**Source**
Ensembl-Browser	Rechercher les séquences ADN, ARN	https://www.ensembl.org/index.html
Primer3	Déterminer les séquences optimales pour les amorces	https://github.com/primer3-org
UCSC browser « in silico PCR »	Vérifier les amorces	https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr
ApE A plasmid Editor	Visualiser les séquences sanger	
CFX maestro software	Analyser des qRT-PCR	https://www.bio-rad.com/fr-fr/sku/12004110-cfx-maestro-software?ID=12004110
Image Lab	Visualiser les membranes WB et les gel PCR	https://www.bio-rad.com/fr-fr/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z
ImageJ/Fiji	Traiter les images de la microscopie, analyser les IF de la ciliogénèse, quantifier les WB	https://imagej.nih.gov/ij
Incucyte 2020B	Analyser les IF des tests ciliaires, les tests de prolifération cellulaire et les transfections	https://www.essenbioscience.com/updates/Incucyte/Incucyte-2020B-GuiSetup/
CIRCOS	Représenter les données sous forme d'un circos	www.circos.ca
Graphpad Prism6/8	Faire les tests statistiques et générer des graphes	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/

École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

Centre de Recherche
en Biomédecine de Strasbourg | CRBS
Université de Strasbourg

Adella KARAM

Caractérisation des phénotypes ciliaires cellulaires et contribution à la validation fonctionnelle de variants pathogènes de gènes de ciliopathies

Laboratoire de Génétique médicale, INSERM UMR-S 1112, Strasbourg

Le résumé de thèse

Les ciliopathies primaires sont causées par des variations altérant la fonction de gènes impliqués dans la formation et la fonction du cil primaire. A ce jour ~20% des patients restent encore sans diagnostic moléculaire et ceci pour des raisons différentes. L'une des raisons principales est l'identification de variants de signification incertaines (VSI, classe 3) dans un gène connu. Mes travaux de thèse ont permis le développement de tests fonctionnels (« boite à outils ciliopathies ») permettant d'étudier l'effet de défaut des gènes sur les phénotypes cellulaires ciliaires. Son application nous a permis, d'une part, de reclasser 10 VSI et de confirmer le diagnostic moléculaire de 8 familles (1 *BBS5*, 1 *BBS20/IFT172,* 1 *PIK3C2A* et 5 *CDK10*). Ces gènes sont impliqués respectivement dans les syndromes de Bardet-Biedl (BBS), Oculo-squeletto-dentaire (OCSKD) et d'AI Kaissi. D'autre part, son application sur 10 patients BBS (4 *BBS1*, 4 *BBS10*, 2 *IFT172*) nous a permis de mieux comprendre comment ces 3 gènes impliqués dans trois complexes ciliaires majeurs (le BBSome, les chaperonine-like et le transport intraflagellaire (IFT)) affectent différemment le phénotype du cil. Pour conclure la « boite à outils ciliopathie » permettra d'améliorer la prise en charge de patients atteints de ciliopathie et de facilité la caractérisation des phénotypes cellulaires/ciliaires.

Mots clés : Ciliopathies, VSI, phénotype ciliaire, *BBS5, BBS1, BBS10*, *IFT172/BBS20*, *PIK3C2A*, *CDK10*

The thesis summary

Primary ciliopathies are caused by variations in the genes involved in primary cilium formation and function. To date, ~20% of patients remain without a molecular diagnosis, for a variety of reasons. One of the main reasons is the identification of variants of uncertain significance (VUS, class 3) in a known gene. My thesis work led to the development of functional tests ("ciliopathy toolbox") to study the effect of gene defects on ciliary cell phenotypes. Its application has enabled us to reclassify 10 VUSs and confirm the molecular diagnosis of 8 families (1 *BBS5*, 1 *BBS20/IFT172*, 1 *PIK3C2A* and 5 *CDK10*). These genes are involved in Bardet-Biedl (BBS), Oculo-skeletal-dental (OCSKD) and AI Kaissi syndromes respectively. Furthermore, its application to 10 BBS patients (4 *BBS1*, 4 *BBS10*, 2 *IFT172*) has enabled us to better understand how these 3 genes involved in three major ciliary complexes (the BBSome, chaperonin-like and intraflagellar transport (IFT)) differentially affect cilium phenotype. In conclusion, the "ciliopathy toolbox" will improve the management of ciliopathy patients and facilitate the characterization of cellular/ciliary phenotypes.

Key words: Ciliopathies, VUS, ciliary phenotype, *BBS5*, *BBS1*, *BBS10*, *IFT172/BBS20*, *PIK3C2A*, *CDK10*