

Thèse de Doctorat

Antoine RIMBERT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Sciences de la vie et de la santé*

Spécialité : *Génétique moléculaire*

Unité de recherche : *Institut du Thorax – INSERM UMR_U1087*

Soutenue le *16 Octobre 2015*

Thèse N° :

Génétique et physiopathologie des dystrophies valvulaires mitrales non-syndromiques

JURY

Rapporteurs :	M. Stéphane ZAFFRAN , Directeur de Recherche, UMR_S910 Marseille M. Erwan DONAL , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Rennes.
Examineurs :	Mme Catherine BOILEAU , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université Diderot-Paris 7 M. Thierry LE TOURNEAU , Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	M. Jean-Jacques SCHOTT Directeur de Recherche, Institut du thorax-UMR_U1087, Nantes
Co-directeur de Thèse :	M. Hervé LE MAREC Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Nantes

À notre futur petit loup...



Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Thierry Le Tourneau de présider mon jury de thèse ainsi qu'au Docteur Stéphane Zaffran et au Professeur Erwan Donal d'avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux. Merci également au Professeur Catherine Boileau de me faire l'honneur d'être membre de ce jury.

Je tiens à remercier mes deux co-directeurs de thèse, Jean-Jacques Schott et Hervé Le Marec, passionnés de génétique et de cardiologie, à qui l'institut du thorax doit beaucoup. Ce fut un privilège et un honneur d'être votre étudiant.

Merci Monsieur Le Marec de m'avoir accueilli au sein de l'institut du thorax auquel vous êtes intimement attaché et dévoué et pour votre souci de transmettre votre savoir et votre passion pour la recherche médicale.

Merci Jean-Jacques, je te suis extrêmement reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de ton équipe. J'ai bénéficié de toute ton expérience, de tes conseils, j'ai vraiment beaucoup appris à tes côtés. Merci pour les discussions que nous avons eu, sur et en dehors des projets, merci pour ta confiance et pour toute l'énergie et les moyens que tu as mis en œuvre pour que je puisse mener au mieux possible ces projets. J'admire ta vision intégrée de la génétique qui n'est « qu'un outil » comme tu aimes le dire et j'espère avoir le plaisir de continuer à travailler avec toi dans les années à venir.

Je tiens à remercier Richard Redon pour ses conseils avisés, ses connaissances et son expérience des nouvelles technologies de séquençage et sur les méthodes d'analyses. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tes nouveaux projets et suis certains que l'institut a de très beaux jours devant lui sous ta direction.

Je tiens aussi à remercier le « groupe » clinique de l'équipe sans laquelle nos projets de recherche ne pourraient exister. Merci aux professeurs Thierry Le Tourneau et Vincent Probst pour le recrutement des familles de patients et leur analyse avisée des échocardiographies. Merci à toutes les infirmières de recherche clinique, Monique Dupas, Emmanuelle Bourcereau et Marie Marrec, que j'ai beaucoup sollicité et qui fournissent un travail remarquable de recrutement et de suivi des patients. Merci beaucoup à Antoine Jobbe-Duval, merci pour toutes ces mesures que je t'ai demandé jusqu'au dernier moment... Je te souhaite beaucoup de réussite dans ta carrière médicale.

Merci à Jean Mérot, Damien Duval et Pauline Labbé qui sont d'excellents biochimistes sans qui ces projets n'auraient pas pu être achevés. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer la vision des processus biochimiques du côté protéique et cellulaire. C'était un vrai challenge pour moi d'acquérir les techniques de culture et de manipulations cellulaires, de biochimie, de bactériologie et je vous en remercie.

J'aimerais témoigner toute ma reconnaissance et mon affection à cette petite « **famille/équipe** » de **génétique**.

Tout d'abord merci à Julien Barc et Solena Le Scouarnec, les bras droits infailibles de nos chefs... Merci pour toutes nos discussions et vos conseils, vous êtes pour nous (petits étudiants) des exemples à suivre. Solena, merci beaucoup pour ta patience ta bienveillance et tout le travail que tu fais pour l'équipe ainsi que pour ton aide pour la rédaction de ce manuscrit. Julien merci beaucoup pour le dynamisme que tu apportes au laboratoire, pour tes conseils avisés et bien sûr pour toutes les sorties footing « avec le sourire !!! » ☺.

Merci à mes grands frères et grandes sœurs de thèse Jean-Baptiste Gourreau, Vincent Portero, Marta Sanchez et Xavier Daumy. Vincent merci pour les discussions que nous avons eu sur les bases de la « génétique » à confronter nos hypothèses farfelues et pour tous les bons moments passés au labo

et en dehors. Xav' merci pour ta zenitude et pour toutes ces parties de ball' avec Marta, notre espagnole préférée qui n'était pas si « mouvaie » que ça. Merci aux nouveaux thésards Pauline Labbé, Elodie Persyn et Joanna Giezman, je vous souhaite beaucoup de courage et de réussite. Merci à Romain Bourcier avec qui je passe de très agréables moments le mardi, entre deux IRM. Je te souhaite beaucoup de réussite outre-Atlantique ainsi qu'à ton retour mais je ne me fait pas trop de soucis...

Je tiens à remercier tout particulièrement Simon Lecointe. Tu m'as tout appris dès mon arrivée, alors que je ne savais pas faire grand-chose. Merci pour toutes tes compétences et ton implication dans les projets, je te dois une grande partie du travail qui a été réalisé sur la mitrale et je t'en remercie, ça valait bien quelques derniers verres au délirium☺.

Merci à nos nounous dévouées du labo, Stéphanie Bonnaud, Estelle Baron, Hadja Eldjouzi et Stéphanie Chatel-Hervé pour leur aide, leurs compétences et leurs encouragements toujours réconfortants. Hadja merci pour ton aide sur pour les validations capillaire dans les moments où j'étais dépassé et comment oublier tes gâteaux dont tu as le secret. Estelle notre nounou à la voie qui porte, je te souhaite beaucoup de bonnes choses avec toute cette équipe de jolies petites blondes aux yeux bleus. Mini Steph' merci beaucoup pour tous ces conseils, garde cette énergie et cette motivation dont nous avons vraiment besoin au labo. Merci Stéph' pour tout le boulot que tu fais de coordination et pour toutes ces discussions et rigolades à midi.

Merci à toute l'équipe de bio-informatique et bio-statistique. Merci Christian, tu es un peu notre Cédric Villani à nous, merci de rester humble malgré ta parution récente dans les journaux people avec le prince Albert. Merci aussi à Floriane Simonet notre bio-informaticienne jaune et verte, désolé de t'avoir si souvent demandé de faire et refaire les analyses d'IBD et tannée pour les résultats de la GWAS RAC. Merci à Matilde Karakachoff pour les analyses d'enrichissement et ta bonne humeur perpétuelle. Bien évidemment merci à Pierre Lindenbaum notre bio-informaticien et chanteur lyrique préféré, merci pour toutes les analyses que tu fais et ta capacité à nous les rendre compréhensibles. Merci à Pierre-François Busson pour les bons moments passé au labo et en dehors et ... oui je mange là ce midi☺. Merci beaucoup à Florence Kyndt pour l'initiation de tout ce projet PVM et pour ton aide dans le choix des gènes du design de recapture. Vous avez avec Simon fait un gros travail en amont de cette thèse et je vous en remercie beaucoup.

Merci à toute l'équipe de la plateforme de génomique qui fait partie de cette petite famille. Merci à Françoise Gros, Laetitia Laetitia Duboscq-Bidot, Edouard Hirchaud, Audrey Donnart, Audrey Bihouée, Marine Cornec et Béatrice Leray. Merci à Éric Charpentier pour ses goûts sportifs et cinématographiques si particuliers. Merci à Jade Violleau, notre coach sportif préféré, on est arrivé en même temps au labo et je suis vraiment content d'avoir travaillé et appris à courir avec toi et te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Merci aux supers sisters (Martine et Marie-France Lecunff) pour leur travail de constitution des bio-collections ainsi qu'aux personnes du Centre de Ressources Biologiques.

Je tiens spécialement à remercier Marja Steenman sans qui je n'aurais pas pu continuer à faire ce travail que j'aime. C'est promis Marja je vais essayer de changer mon accent français si drôle et de prononcer les mots Hollandais comme il faut, « heel hartelijk bedankt » !

Je tiens à remercier Bertrand Cariou et toute son équipe avec qui j'espère avoir le plaisir de collaborer pendant longtemps. Bertrand merci beaucoup pour votre investissement dans le projet Hypochol, pour la confiance que vous m'avez accordé pour la réalisation des investigations génétiques et pour votre aide dans la recherche d'un post-doctorat. Merci beaucoup à Jocelyne Magré avec qui j'ai aimé travailler et faire le lien entre les nouvelles approches génétiques et son expérience des pathologies métaboliques. Merci beaucoup à Matthieu Pichelin qui fait un travail

considérable de coordination et de lien entre le service d'endocrinologie, le CIC et l'équipe de recherche. J'espère pouvoir continuer à travailler avec votre équipe dans les années à venir que j'espère riches en découvertes scientifiques...

Merci à mes conscrits de thèse Mariam Jouni, Sophie Burel et Lucile Dollet avec qui j'ai partagé ce fameux bureau 124 pendant de longues heures de rédaction... Sophie bon courage et je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Merci aux professeurs universitaires de l'institut qui ont su dès les bancs de la faculté nous faire aimer la recherche dans le domaine cardiovasculaire. Je pense en particulier à Gilles et Christelle Toumaniantz, Chantal Gauthier et Xavier Prieur.

Je tiens à témoigner toute mon affection à cette institution de l'institut du thorax auquel je suis intimement attaché et à toutes ces personnes qui rendent la vie agréable au laboratoire et donnent envie d'aller travailler avec le sourire et de se dépasser. Ainsi, Merci à Nathalie Vaillant, Christophe Guilluy, Marc RIO, Vincent Sauzeau, Amandine Caillaud, Benoite Champon, Audrey Ayer, Zeineb Lamoureux, Françoise Le Bouffant, Vimla Mayoura, Karim Si Tayeb, Séverine Abramatic, Damien Rebouleau, Cedric Lemay, Olfat Malak, Valentine Prat. Merci à toute l'équipe administrative de l'institut, Ophélie Tindilière, Corine Mandin, Aurélie Combalot, Marie-Pierre Fuchs et Isabelle Rivaud, qui fait un travail nécessaire à notre activité.

Merci à tous les copains Basketteurs 🏀 ou non ! Sylvain, Quentin, JP, Alexis, Nils, Benjamin, 'Tof, Thib', Clem' avec qui je passe d'ENORMES moments depuis notre plus jeune âge. Merci à Carine et Steeven nos jeunes mariés avec qui nous avons partagé de belles aventures ensoleillées et à toute l'équipe de Geneston avec qui nous passons de très bons moments. Merci à nos amies trop loin Jessy et Matthou, merci pour votre bonne humeur qui nous est très chère.

Un merci tout particulier à ma famille et ma belle-famille sur lesquelles j'ai pu compter pour me soutenir et pour me redonner la motivation dans les moments plus difficiles.

Je tiens sincèrement à remercier mes parents d'avoir toujours cru en moi, pour votre soutien dont vous avez toujours su faire preuve (y compris lors de cette rédaction de thèse), de votre confiance et pour l'amour que vous nous offrez à Laurine et moi chaque jour. Merci à ma petite sœur Laurine pour qui les cellules restent un mystère mais avec qui j'ai une complicité à toute épreuve. Je vous souhaite beaucoup de réussite à Nico et toi dans les années à venir. Je ne saurai pas vous le dire alors je vous l'écris, je vous aime.

Enfin Corentine, je tiens à te remercier d'avoir fait preuve de compréhension ces derniers mois partagés entre le laboratoire et l'appartement. Merci pour ton écoute, tes encouragements inlassables tout au long de la thèse. Je te suis très reconnaissant de me laisser vivre mes passions à fond et ai une grande confiance dans nos projets d'ailleurs et magnifiques responsabilités à venir. Merci de partager ma vie et de la rendre plus belle.

« Tout homme est tiraillé entre deux besoins : le besoin de la Pirogue, c'est-à-dire du voyage, de l'arrachement à soi-même, et le besoin de l'Arbre, c'est-à-dire de l'enracinement, de l'identité. Et les hommes errent constamment entre ces deux besoins en cédant tantôt à l'un, tantôt à l'autre ; jusqu'au jour où ils comprennent que c'est avec l'Arbre qu'on fabrique la Pirogue. »

Mythe mélanésien (Ile de Vanuatu)

Table des matières

Avant-propos	- 1 -
I - INTRODUCTION	- 4 -
I.1 Cardiopathies valvulaires du cœur gauche	- 5 -
I.2 Anatomie de l'appareil valvulaire mitral.....	- 7 -
I.3 Le Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM)	- 9 -
I.3.1 Aspects cliniques	- 10 -
I.3.1.1 Symptômes	- 10 -
I.3.1.2 Signes auscultatoires	- 10 -
I.3.1.3 Signes écho-cardiographiques.....	- 11 -
I.3.1.4 Pronostic et complications	- 13 -
I.3.1.5 Aspects anatomiques et histologiques.....	- 13 -
I.3.1.6 Traitements.....	- 16 -
I.4 Génétique du PVM.....	- 17 -
I.4.1 Génétique des formes syndromiques	- 18 -
I.4.2 Génétique des formes non syndromiques de PVM.....	- 21 -
I.4.2.1 Génétique des formes familiales non syndromiques.....	- 21 -
I.4.2.2 Identification de loci de susceptibilité.....	- 23 -
I.4.3 Génétique du PVM dans les modèles de chiens	- 24 -
I.4.4 Génétique du PVM et modèles murins	- 25 -
I.4.5 Le zebrafish, un modèle d'intérêt pour l'étude du PVM	- 27 -
I.5 Hypothèses physiopathologiques	- 28 -
I.5.1 Altérations de la matrice extra cellulaire et remodelages structurels	- 28 -
I.5.2 Développement valvulaire et PVM.....	- 32 -
I.5.2.1 La transition épithélio-mésenchymateuse essentielle au développement valvulaire..	
.....	- 33 -
Implication des "Bone Morphogenetic proteins" (BMP) et "Transforming Growth Factor" (TGFβ)	- 34 -

Implication des voies de signalisation Notch	- 35 -
Implication de la voie canonique Wnt/ β -Caténines	- 35 -
Implication de la voie de signalisation du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)	- 35 -
I.5.2.2 Remodelage, maturation et maintenance	- 37 -
I.4.3 Voies des récepteurs sérotoninergiques	- 39 -
I.4.4 Implications moléculaires des gènes identifiés dans les formes syndromiques et non-syndromiques	- 39 -
I.4.4.1 Mécanismes impliqués dans les formes syndromiques « Marfan like » de PVM	- 39 -
I.5.4.2 Mécanismes impliqués dans les formes non-syndromiques de PVM liées aux mutations de la filamine A.....	- 41 -
I.5.4.3 Mécanismes impliqués dans les formes de PVM liées aux mutations du gène <i>DCHS1</i>	- 43 -
I.5.4.4 Mécanismes impliqués à partir de l'identification des gènes de susceptibilité <i>TNSI</i> et <i>LMCD1</i>	- 44 -
I.6 Génétique : de Gregor Mendel aux études génome entier.....	- 47 -
I.6.1 Évolution des approches et concepts génétiques	- 47 -
I.6.2 Les apports du Projet Génome Humain	- 49 -
I.6.3 Développement de nouvelles technologies de séquençage haut débit et leurs applications.....	- 50 -
I.6.4 Développement de grandes bases de données publiques et leur rôle dans l'identification de nouveaux gènes	- 51 -
I.6.5 Variants fréquents et pathologies fréquentes	- 52 -
I.6.6 Limites et perspectives.....	- 53 -
I.6.7 De nouvelles stratégies d'analyses par des approches haut-débit.....	- 55 -
II - RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	- 58 -
Projet #1	- 59 -
Des mutations « perte de fonction » du gène <i>ARHGAP24</i> prédisposent à une forme de Dégénérescence Fibro-Élastique (FED) de Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM)	- 59 -

Projet #2.....	- 62 -
Recherche de nouveaux gènes responsables de formes familiales de PVM.....	- 62 -
II.2.1 Famille B.....	- 63 -
II.2.1.1 Résultats des investigations cliniques de la famille B.....	- 63 -
II.2.1.2 Résultats et discussion des investigations génétiques et fonctionnelles de la famille B.....	- 65 -
II.2.2 Famille L.....	- 76 -
II.2.2.1 Résultats des investigations cliniques de la famille L.....	- 76 -
II.2.2.2 Résultats et discussion des investigations génétiques de la famille L.....	- 77 -
II.2.3 Famille R.....	- 86 -
II.2.3.1 Résultats des investigations cliniques de la famille R.....	- 86 -
II.2.3.2 Résultats et discussion des investigations génétiques de la famille L.....	- 87 -
II.2.4 Famille P.....	- 94 -
II.2.4.1 Résultats des investigations cliniques de la famille P.....	- 94 -
II.2.4.2 Résultats et discussion des investigations génétiques de la famille P.....	- 96 -
II.2.5 Famille S.....	- 101 -
II.2.5.1 Résultats des investigations cliniques de la famille S.....	- 101 -
II.2.5.2 Résultats et discussions des investigations génétiques de la famille S.....	- 104 -
II.2.6 Étude des autres cas familiaux atteints de PVM.....	- 110 -
II.2.6.1 Résultats et discussion des investigations cliniques et génétiques de 13 familles atteintes de PVM.....	- 110 -
II.2.7 Conclusions et perspectives (projet #2).....	- 113 -
II.2.7.1 Implication du remodelage du cytosquelette d'actine et de la mécano-transduction.....	- 113 -
II.2.7.2 Implication des voies de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	- 113 -
Implication potentielle du gène <i>ANK2</i> dans un « syndrome Ankyrine-B ».....	- 116 -
Limites des approches de séquençage haut débit utilisées.....	- 116 -
Projet #3.....	- 117 -

Recherche de variants rares dans les gènes candidats et test d'enrichissement en variants rares	- 117 -
III.1 Caractéristiques cliniques des patients «isolés ».....	- 118 -
III.2 Conception du kit de re-séquençage (HaloPlex, Agilent technologies) et résultats	- 119 -
III.3 Identification de nouveaux variants rares dans les gènes de susceptibilité.....	- 121 -
III.3.1 Identification de variants dans le gène <i>ARHGAP24</i>	- 121 -
III.3.2 Identification de nouveaux variants rares dans les gènes issus des analyses familiales	- 121 -
III.3.3 Identification de variants dans le gène <i>PTPRF</i>	- 122 -
III.3.3 Identification de variants dans le gène <i>APC</i>	- 122 -
III.3.4 Identification de variants dans le gène <i>DOCK1</i>	- 123 -
III.3.5 Identification de variants dans le gène <i>ANK2</i>	- 124 -
III.3.6 Identification de variants dans le gène <i>FLNA</i>	- 125 -
III.3.7 Identification de variants dans le gène <i>DCHS1</i>	- 126 -
III.4 Test d'enrichissement en variants rares	- 128 -
Conclusion projet#3	- 130 -
III - PERSPECTIVES.....	- 133 -
IV - MATÉRIEL ET MÉTHODES	- 136 -
IV.1 Investigations cliniques	- 137 -
IV.2 Investigations génétiques.....	- 138 -
IV.2.1 Bio-collections	- 138 -
IV.2.2 Séquençage NGS et méthodes d'analyses	- 138 -
IV.2.2.1 Préparation de la librairie	- 138 -
Séquençage d'exome complet	- 138 -
Préparation de la librairie pour du séquençage ciblé	- 140 -
IV.2.2.2 Séquençage haut-débit – Illumina HiSeq 2500	- 142 -
IV.2.2.3 Alignement et annotations des séquences	- 146 -
Alignement.....	- 146 -

Déttection de variants (« calling »)	- 147 -
Annotation des variants	- 147 -
IV.2.2.4 Filtrage des variants identifiés à partir de l’outil Knime4Bio	- 148 -
Filtre des variants fonctionnels	- 148 -
Conservation des variants rares	- 149 -
Variants identifiés par deux algorithmes chez les patients atteints de la famille.....	- 150 -
.....	- 150 -
Filtrage des données de séquençage ciblé.....	- 150 -
Contrôle <i>in silico</i> par visualisation des alignements avec l’outil IGV.....	- 152 -
IV.2.3 Séquençage capillaire.....	- 152 -
IV.2.4 Génotypage Haut Débit.....	- 152 -
IV.2.5 Identité par descendance (IBD pour Identity By Descent)	- 153 -
IV.2.6 Génotypage par HRM	- 154 -
IV.2.7 Séquençage massif d’ARN	- 155 -
IV.2.8 Test d’enrichissement en variants rares	- 155 -
IV.3 Investigations cellulaires et fonctionnelles.....	- 157 -
IV.3.1 Lignées cellulaires.....	- 157 -
IV.3.1.1 Lignée HT-1080 (Fibrosarcome)	- 157 -
IV.3.1.2 Lignée de cellules HEK-293	- 157 -
IV.3.2 Plasmides	- 157 -
IV.3.3 Mutagénèse dirigée	- 158 -
IV.3.4 Conditions de transfection	- 158 -
IV.3.5 Mesure d’adhésion et d’étalement cellulaire	- 158 -
IV.3.6 Quantification de la migration cellulaire unidirectionnelle	- 159 -
IV.3.7 Analyses statistiques	- 160 -
V - ANNEXES	- 161 -
V.1 Physiologie cardiaque générale.....	- 162 -
V.2 Analyse des données de séquençage d’exome pour la famille S	- 164 -

V.3 Liste des gènes inclus dans le « design » de re-séquençage ciblé	- 166 -
V.4 Données de couverture moyenne des échantillons séquencés avec le kit de re-séquençage ciblé.....	- 168 -
V.5 Variants identifiés par re-séquençage ciblé	- 170 -
VI - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 172 -

Table des figures

Figure 1: Prévalence des valvulopathies cardiaques en fonction de l'âge	- 6 -
Figure 2: Représentation schématique du cœur humain en coupe frontale et transversale Visualisation des valves atrio-ventriculaires et sigmoïdes cardiaques.....	- 7 -
Figure 3: Anatomie descriptive de la valve mitrale.....	- 9 -
Figure 4: Classification des insuffisances mitrales en fonction de la position des valves lors de la systole ventriculaire (proposée par Carpentier).....	- 10 -
Figure 5: Échocardiographie trans-thoracique bidimensionnelle d'un patient atteint de PVM bivalvulaire	- 11 -
Figure 6: Échocardiographie trans-thoracique bi-dimensionnelle. Définition des formes prodromales de PVM.....	- 12 -
Figure 7: Aspects anatomiques et histologiques des dystrophies valvulaires mitrales (FED vs. Barlow).....	- 14 -
Figure 8: Continuum des affections dystrophiques valvulaires mitrales.....	- 16 -
Figure 9: Représentation schématique de l'histologie de la valve mitrale (Matrice extra cellulaire tri lamellaire et cellules valvulaires mitrales).....	- 29 -
Figure 10: Représentation schématique des différentes populations de cellules interstitielles de valves (CIVs) et leurs fonctions	- 31 -
Figure 11: Représentation schématique du développement valvulaire (coupe frontale).....	- 33 -
Figure 12: Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse lors de la valvulogénèse	- 36 -
Figure 13: Représentation schématique des étapes du développement valvulaire (Transition Épithélio-Mésenchymateuse, Elongation, Remodelage, Maturation)	- 38 -
Figure 14: Représentation des mécanismes de modulation de la réponse cellulaire aux contraintes mécaniques	- 43 -
Figure 15: Représentation des mécanismes connus dans le développement du PVM au cours de la vie	- 46 -
Figure 16: Représentation schématique de l'effet pathogène de variants génétiques (odds ration) en fonction de la fréquence de l'allèle à risqué.	- 48 -
Figure 17: Associations identifiées pour les pathologies cardiovasculaires avec des p valeurs significatives ($p \leq 5.10^{-8}$).....	- 53 -
Figure 18: Arbres généalogiques des cinq familles étudiées.....	- 61 -
Figure 19: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille B	- 63 -
Figure 20 : Examen écho-cardiographique du patient III:7 de la famille B	- 64 -

Figure 21: Représentation des régions IBD partagées par les individus atteints de la famille B.....	- 65 -
Figure 22: Analyse de co-ségrégation du variant DOCK1 (p.Arg1549Gln) avec le PVM au sein de la famille B	- 68 -
Figure 23: Représentation schématique de l'activité GEF pour les protéines de la famille des RhoGTPases	- 69 -
Figure 24: Défaut développementaux du modèle murin déplété pour le gène Dock1 et représentation schématique de la protéine Dock180 humaine	- 71 -
Figure 25: Cinétique d'adhésion cellulaire en fonction du temps de cellules Hek293 transfectées avec des constructions plasmidiques (pCAGGS-EGFP-DOCK1-WT ; pCAGGS-EGFP-DOCK1-R1549Q et pEGFP).....	- 73 -
Figure 26: Visualisation de la migration et quantification de la vitesse de migration cellulaire unidimensionnelle grâce à la technologie cytoo de cellules HT1080 surexprimant les formes WT ou muté de Dock180.....	- 74 -
Figure 27: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille L -	76 -
Figure 28: Examen écho-cardiographique du patient IV:16 de la famille L.....	- 77 -
Figure 29: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la branche familiale de la famille L étudiée	- 79 -
Figure 30: Représentation des zones identifiées par analyse d'IBD au sein de la « branche droite » de la famille L	- 80 -
Figure 31: Analyse de co-ségrégation du variant PTPRF (p.Ile328Met)	- 82 -
Figure 32: Évaluation de l'expression de l'isoforme « courte » de PTPRF par RT-PCR.....	- 83 -
Figure 33: Représentation schématique de deux isoformes de la protéine « Leukocyte Antigen Related ».....	- 84 -
Figure 34: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille R -	86 -
Figure 35: Examen écho-cardiographique représentatif d'un patient de la famille R.....	- 87 -
Figure 36: Représentation de la co-ségrégation du variant APC (p.Gly1412Ala) dans la famille R	- 89 -
Figure 37: Représentation schématique de la protéine Apc (Adenoma Polyposis Coli).....	- 90 -
Figure 38: Voie de signalisation Wnt/ β -caténines canonique	- 91 -
Figure 39: Morphologie des embryons zebrafish présentant des mutations invalidantes pour le gène orthologue d'Apc	- 92 -
Figure 40: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille P. -	94 -
Figure 41: Examen écho-cardiographique du patient IV:16 de la famille P	- 95 -

Figure 42: Représentation des régions IBD partagées par les individus atteints de la famille P.....	- 96 -
Figure 43: Analyse de co-ségrégation des variants PRDM8: p.Ala230Gly et USP15: c.770+8C>T au sein de la famille P	- 98 -
Figure 44: Représentation de l'activité de dé-ubiquitinylation d'Usp15 sur la voie de signalisation médiée par le TGFβ.....	- 100 -
Figure 45: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille S-	102
-	
Figure 46: Examen écho-cardiographique de la patiente III:23 de la famille S et ECG d'un membre de la famille S porteur de la mutation ANK2 p.Glu1449Gly.....	- 103 -
Figure 47: Arbre généalogique et phénotype PVM et Mort subite de la famille F.....	- 106 -
Figure 48: Représentation schématique de la protéine Ankyrine-B.....	- 108 -
Figure 49: Arbres généalogiques et représentation du phénotype PVM pour les treize autres familles étudiées	- 111 -
Figure 50: Représentation schématique de l'implication des voies de signalisations impliquées dans les mécanismes de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et dans les voies de la mécano-transduction.....	- 115 -
Figure 51: Représentation schématique de la protéine LAR codée par le gène PTPRF et variants rares détectés.....	- 122 -
Figure 52: Représentation schématique de la protéine Apc et variants rares retrouvés.....	- 123 -
Figure 53: Représentation schématique de la protéine Dock180 et variants rares retrouvés .	- 124 -
Figure 54: Représentation schématique de la protéine Ankyrine-B et variants rares retrouvés.....	- 125 -
Figure 55: Représentation schématique de la protéine Dock180 et variants rares retrouvés .	- 126 -
Figure 56: Représentation schématique de la protéine Dachsous et variants rares retrouvés	- 127 -
Figure 57: Diagramme du nombre de patients identifiés avec des variants rares fonctionnels dans les gènes candidats issus des analyses familiales.	- 130 -
Figure 58: Schéma de la préparation de la librairie pour un séquençage d'exome.....	- 139 -
Figure 59: Représentation du principe de capture des régions codantes avant séquençage haut-débit.	- 140 -
Figure 60: Représentation des étapes du système de capture et d'enrichissement HaloPlex (Agilent technologies Santa Clara, CA)	- 142 -
Figure 61: Matériel utilisé pour le séquençage haut-débit	- 143 -
Figure 62: Génération des clusters lors du séquençage Illumina	- 144 -
Figure 63: Réaction de séquençage de la technologie Illumina.	- 145 -

Figure 64: Étape de « flip-flap » qui permet le séquençage des brins anti-sens par la technologie Illumina.....	- 146 -
Figure 65: Visualisation du « workflow » d'analyse réalisé avec l'outil Knime4bio afin de filtrer les fichiers VCF.....	- 151 -
Figure 66: Exemple de visualisation de l'alignement des reads de séquençage haut-débit grâce à l'outil IGV.	- 152 -
Figure 67: Représentation schématique des étapes d'analyses pour les tests d'enrichissement en variant rares	- 156 -
Figure 68: Représentation schématique des mesures d'adhésion cellulaire en fonction du temps par la technologie xCELLigence (Roche ®)	- 159 -
Figure 69: CytooPlates Motility, CYTOO et visualisation de la migration de cellules transfectées avec le plasmide pCAGGS-EGFP-DOCK1	- 160 -
Figure 70: Schéma du cœur humain en coupe transversale.....	- 162 -
Figure 71: Représentation schématique de l'appareil circulatoire sanguin.....	- 163 -

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques cliniques de la maladie de Barlow et de la dégénérescence fibro-élastique	- 15 -
Tableau 2: Génétique des formes syndromiques de prolapsus valvulaire mitral	- 21 -
Tableau 3: Modèles murins présentant des affections de la valve mitrale	- 27 -
Tableau 4: Données cliniques des 5 patients atteints de la famille B.....	- 64 -
Tableau 5: Analyses combinées des données de séquençage d'exome et des régions IBD identifiées.	- 66 -
Tableau 6: Variants rares partagés par les 4 individus atteints séquencés de la famille B et retrouvés dans les régions IBD.....	- 67 -
Tableau 7 : Mesures écho-cardiographiques et données cliniques des 12 patients atteints de la famille L	- 77 -
Tableau 8: Analyses combinées des données de séquençage d'exome et des régions IBD identifiées.	- 81 -
Tableau 9: Données cliniques des 7 patients atteints de la famille R.....	- 87 -
Tableau 10: Analyses des données de séquençage d'exome de la famille R	- 88 -
Tableau 11: Données cliniques des six patients atteints de la famille P.....	- 95 -
Tableau 12: Analyses combinées des données de séquençage d'exome et des régions IBD identifiées pour la famille P.....	- 97 -
Tableau 13: Variants fonctionnels rares retrouvés chez tous les patients atteints de la famille P au sein des régions IBD.....	- 97 -
Tableau 14: Données phénotypiques des patients atteints de PVM de la famille S.....	- 103 -
Tableau 15: Phénotypes cardiaques des cas index présentant le variant ANK2 p.Glu1449Gly.....	- 107 -
Tableau 16: Caractéristiques des treize autres familles composées d'au moins deux patients atteints ayant bénéficié d'un séquençage d'exome.....	- 110 -
Tableau 17: Résultats des analyses de séquençage d'exome	- 112 -
Tableau 18: Données cliniques de la série de patients PVM ayant bénéficié d'un séquençage ciblé.	- 118 -
Tableau 19: Critères de choix et nombre de gènes inclus dans le design du kit de re-séquençage.....	- 119 -
Tableau 20: Nombre de variants retrouvés dans les gènes décrits ou suspectés dans les formes familiales non syndromiques de PVM.....	- 121 -

Tableau 21: Présentation des résultats préliminaires des tests d'enrichissement pour les gènes significativement enrichis en variants rares (p-valeurs < 0.05).....	- 128 -
Tableau 22: Présentation des résultats préliminaires des tests d'enrichissement pour les gènes identifiés à partir d'analyses familiales présentées précédemment	- 128 -
Tableau 23: Analyses des données de séquençage d'exome pour la famille S	- 164 -
Tableau 24: Analyses des données de séquençage d'exome pour la famille S	- 165 -
Tableau 25: Variants fonctionnels rares retrouvés chez au moins cinq patients atteints de la de la famille S.....	- 165 -
Tableau 26: Liste des gènes inclus dans le design du kit de re-séquençage et critères de choix.....	- 167 -
Tableau 27: Données de couvertures moyennes en fonction des échantillons des 273 patients.....	- 169 -
Tableau 28: Description des variants rares fonctionnels retrouvés dans les gènes de formes non syndromiques de PVM	- 171 -

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARHGAP24	Rho GTPase Activating Protein 24
ARN	Acide ribonucléique
DCHS1	Dachsous Cadherin-Related 1
DOCK1	Dedicator of cytokinesis 1
EMT	« Epithelial-Mesenchymal Transition » (transition épithélio-mésenchymateuse)
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FED	« Fibroelastic Deficiency » (Dégénérescence Fibro-Élastique)
FilGAP	Filamin-A-associated RhoGAP
GATK	The Genome Analysis Toolkit (Broad Institute)
GWAS	« Genome Wide Association Study » (Étude d'Association Génome Entier)
IBD	Identity By Descent
IGV	Integrative Genome Viewer
IM	Insuffisance Mitrale
LAR	Leukocyte Antigen-Related
MAF	« Minor Allele Frequency » (Fréquence de l'allèle mineur)
NGS	« Next Generation Sequencing » (Séquençage Nouvelle Génération)
pb	paire(s) de bases
PCR	« Polymerase Chain Reaction » (amplification en chaîne par polymérase)
PTPRF	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type F
PVM	Prolapsus Valvulaire mitral
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme nucléotidique Simple)
TGF- β	Transforming Growth Factor β
VCF	« Variant Call Format » (Format de fichier référençant les variants identifiés)
WT	Wild type (sauvage)

Avant-propos

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. On estime à 17,5 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires, soit 31% de la mortalité mondiale totale, près de la moitié de tous les décès en Europe (avec 51% de femmes et 42% d'hommes) (Nichols et al. 2014). L'OMS prédit que les maladies cardiovasculaires seront responsables de 23,3 millions de décès en 2030.

Face à ces problèmes de santé publique majeurs, l'institut du thorax (créé en 2004) rassemble dans une structure commune, les soins, l'enseignement et la recherche dans les disciplines cardiovasculaires, respiratoires et métaboliques. L'institut a pour buts, grâce à des approches multiples, d'identifier les bases moléculaires et physiopathologiques de ces maladies à des fins diagnostiques, préventives et thérapeutiques.

Le développement des connaissances et des outils de la génétique moderne, réalisés au cours des trente dernières années, a révolutionné la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les pathologies cardiovasculaires. Dans le domaine des troubles du rythme cardiaque notamment, l'identification de gènes responsables de formes monogéniques a permis d'établir des relations génotype/phénotype précises. Ainsi, de nouvelles stratégies de prise en charge prédictives et adaptées ont été développées. L'état des connaissances actuelles sur les bases génétiques des valvulopathies ne permet pas une telle évolution de la prise en charge des patients.

Les valvulopathies cardiaques sont des pathologies relativement fréquentes et touchent près de 2.5% de la population générale dans les pays industrialisés avec une forte prévalence pour les affections valvulaires dégénératives. Les seuls traitements indiqués dans l'apparition de valvulopathies sont les traitements chirurgicaux.

Le caractère héréditaire des valvulopathies a été identifié depuis une cinquantaine d'années, cependant, seulement deux gènes sont pour le moment identifiés dans le cadre des valvulopathies mitrales non syndromiques. L'identification d'un de ces gènes (*FLNA*) au sein de l'institut en 2007, a permis d'ouvrir de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes physiopathologiques impliqués dans les valvulopathies. Le recrutement de familles atteintes de valvulopathies par l'équipe clinique ainsi que le développement des méthodes et des technologies d'investigations génétiques, nous ont permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans ces valvulopathies et d'initier la compréhension des mécanismes physiopathologiques concernés. Cependant l'histoire récente de ces découvertes nécessite l'apport de nouveaux « indices » moléculaires et mécanistiques qui conduiront à une meilleure

compréhension de ces pathologies afin d'améliorer la caractérisation phénotypique et évolutive des valvulopathies, d'évaluer l'intérêt de marqueurs génétiques, biologiques et cliniques afin de proposer des prises en charges cliniques et thérapeutiques adaptées.

I - INTRODUCTION

« We wish to discuss a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biologic interest. »

Rosalind Franklin - Nature (WATSON and CRICK 1953)

« Faut-il qu'un si grand cœur montre tant de faiblesse ? »

Jean Racine, Andromaque (1667)

I.1 Cardiopathies valvulaires du cœur gauche

Les cardiopathies valvulaires cardiaques sont des affections **fréquentes et hétérogènes**. On retrouve des affections mono-valvulaires ou pluri-valvulaires non syndromiques (Prolapsus valvulaire mitral, rétrécissement aortique etc.) et des formes syndromiques avec des désordres du tissu conjonctif généralisés comme le syndrome de Marfan.

La prévalence de ces pathologies valvulaires est difficile à évaluer au sein de la population générale. L'auscultation seule ne suffit pas à poser le diagnostic, il convient donc de réaliser des examens écho-cardiographiques sur un échantillon représentatif de la population générale. Une étude réalisée en ce sens aux États-Unis sur 11 911 individus a permis d'identifier que **2,5% de la population** générale étaient porteurs d'une valvulopathie cardiaque (Nkomo et al. 2006) (Figure 1). Des observations similaires ont été faites dans de plus petites cohortes en Europe (Iung et al. 2003) (Lindroos et al. 1993).

Les auteurs décrivent une augmentation de la prévalence des affections valvulaires avec l'âge (jusqu'à 13,3% au-delà de 75 ans). Les **étiologies dégénératives** apparaissent comme largement majoritaires du fait du vieillissement de la population et de l'amélioration des conditions sanitaires dans les pays occidentaux. En effet, il apparaît que la survenue de valvulopathies d'origines rhumatismales soit plus fréquente dans les pays en voie de développement (Kumar and Tandon 2013) (Sliwa et al. 2010).

Ces cardiopathies valvulaires sont associées à une forte **augmentation de la morbi-mortalité** (Iung et al. 2003) (Avierinos et al. 2002) et à une augmentation importante des coûts de santé publique. Parmi les cardiopathies valvulaires du cœur gauche étudiées dans des populations caucasiennes, la **régurgitation mitrale** était l'étiologie la plus fréquente (1,7%), suivi de la **régurgitation aortique** (0,5%), de la **sténose aortique** (0,4%) et de la **sténose mitrale** (0,1%) (Nkomo et al. 2006).

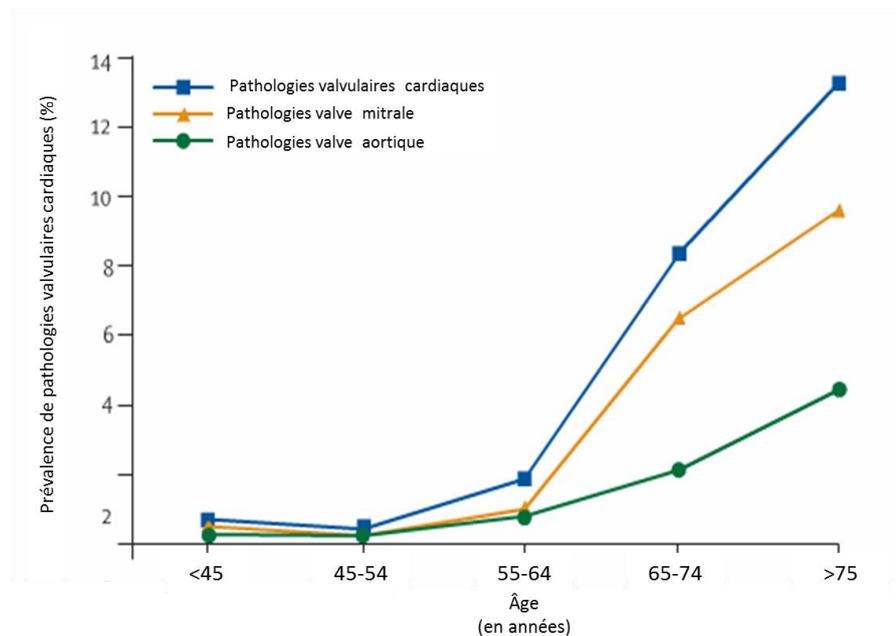


Figure 1: Prévalence des valvulopathies cardiaques en fonction de l'âge

(Nkomo et al. 2006)

La majorité des patients présente des formes bénignes de valvulopathies avec de faibles répercussions sur les fonctions cardiaques. Cependant, certains patients présentent des formes sévères qui peuvent être à **l'origine de complications** allant de l'insuffisance valvulaire, au développement d'endocardites, à des insuffisances cardiaques, à des accidents thromboemboliques, à des troubles du rythme cardiaque, voire même des morts subites (Düren, Becker, and Dunning 1988) (Freed et al. 1999).

Pendant de nombreuses années, les valvulopathies ont été attribuées à des processus dégénératifs passifs dus à l'âge et aux contraintes hémodynamiques répétées (« wear and tear »). Il est maintenant largement accepté et décrit que les valvulopathies résultent de **processus actifs biologiquement régulés**.

De plus, précédemment considérées comme des pathologies **idiopathiques, ou isolées** les pathologies valvulaires, comme le prolapsus valvulaire mitral (PVM) ou le rétrécissement aortique calcifié (pour les plus fréquentes), présentent un **caractère familial** suggérant que des facteurs génétiques sont impliqués dans leur apparition.

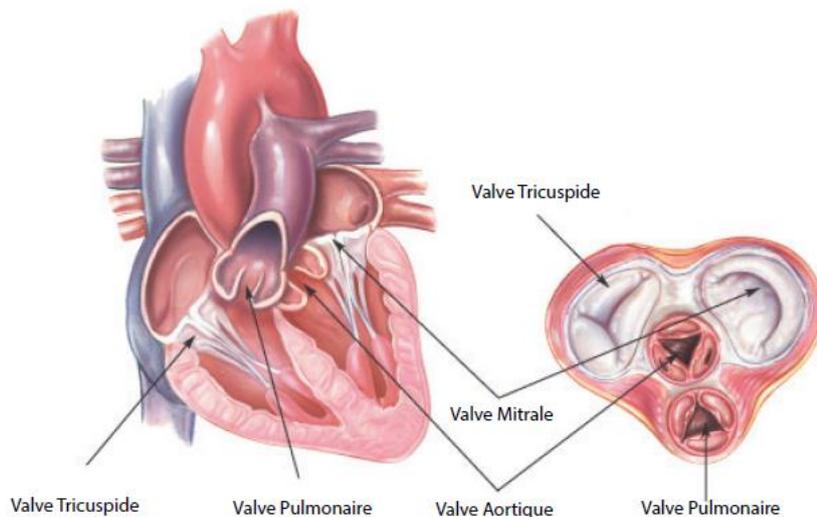
Le caractère héréditaire du PVM a été proposé depuis 1983 et semble être majoritairement transmis de manière **autosomique dominante** (Devereux et al. 1983) avec une **pénétrance incomplète** et une **expressivité dépendante de l'âge et du sexe**. Il est plus

fréquent chez les femmes que chez les hommes mais serait plus sévère chez ces derniers. Les patients d'une même famille présentent une hétérogénéité clinique importante (Zuppiroli et al. 1998). Des formes de transmission **liées à l'X** ont aussi été décrites (Monteleone and Fagan 1969) (Kyndt et al. 2007; Kyndt et al. 1998).

Les dystrophies valvulaires cardiaques sont aussi retrouvées dans des contextes syndromiques avec en particulier des affections du tissu conjonctif.

I.2 Anatomie de l'appareil valvulaire mitral

La valve mitrale est située entre l'oreillette gauche et le ventricule gauche et est constituée de deux valvules. Elle est ouverte durant le remplissage du ventricule gauche (durant la contraction de l'oreillette gauche) puis se ferme lors de la contraction du ventricule gauche (Figure 2). De par sa localisation, la fonction de la valve mitrale est de résister aux pressions d'éjection systoliques ventriculaires (Annexes V.1).



*Figure 2: Représentation schématique du cœur humain en coupe frontale et transversale
Visualisation des valves atrio-ventriculaires et sigmoïdes cardiaques*

Issu et modifié à partir du site <http://www.yourheartvalve.com>

L'appareil valvulaire mitral est un ensemble anatomique complexe composé d'un anneau mitral, de feuillets mitraux et d'un appareil sous valvulaire composé de cordages et de muscles papillaires (ou piliers ventriculaires) (Figure 3).

L'anneau mitral est situé à la jonction entre l'oreillette et le ventricule gauche. Il est composé de fibres de tissu conjonctif fibro-élastiques résistantes. L'insertion des feuillets mitraux sur cet anneau leur confèrent leur robustesse.

La valve mitrale est composée de **deux feuillets valvulaires : antérieur** (septal ou grande valve) et un **postérieur** (mural ou petite valve). Les parties proximales (proches de l'anneau mitral) des feuillets des valves sont lisses et ne comportent pas d'insertion de cordages tendineux. Les zones distales comportent les sites d'insertion des cordages tendineux du côté ventriculaire. Ces extrémités « rugueuses » correspondent au point de rencontre des deux feuillets mitraux lors de la systole ventriculaire, on parle de **point de coaptation de la valve**. L'adéquation des deux feuillets au point de coaptation confère à la valve sa fonction première d'« anti-reflux ». La surface du feuillet antérieur recouvre les deux tiers de l'orifice atrio-ventriculaire et le feuillet postérieur recouvre l'autre tiers. Afin de faciliter les repaires échographiques et chirurgicaux, les feuillets valvulaires, antérieurs et postérieurs, sont cartographiés en trois zones (respectivement A1, A2, A3 et P1, P2, P3 (dans un axe antéro-postérieur) (Figure 3). Les feuillets mitraux sont reliés aux muscles papillaires par des **cordages tendineux**. En moyenne, on compte 25 cordages par valve mitrale. Les muscles papillaires sont des structures musculaires ventriculaires sur lesquelles sont insérés les cordages des valves atrio-ventriculaires. Lors de la systole ventriculaire, les cordages sont relâchés par le rapprochement de la paroi ventriculaire. En revanche lors de la diastole ventriculaire, les cordages se tendent et permettent l'ouverture des valves atrio-ventriculaires.

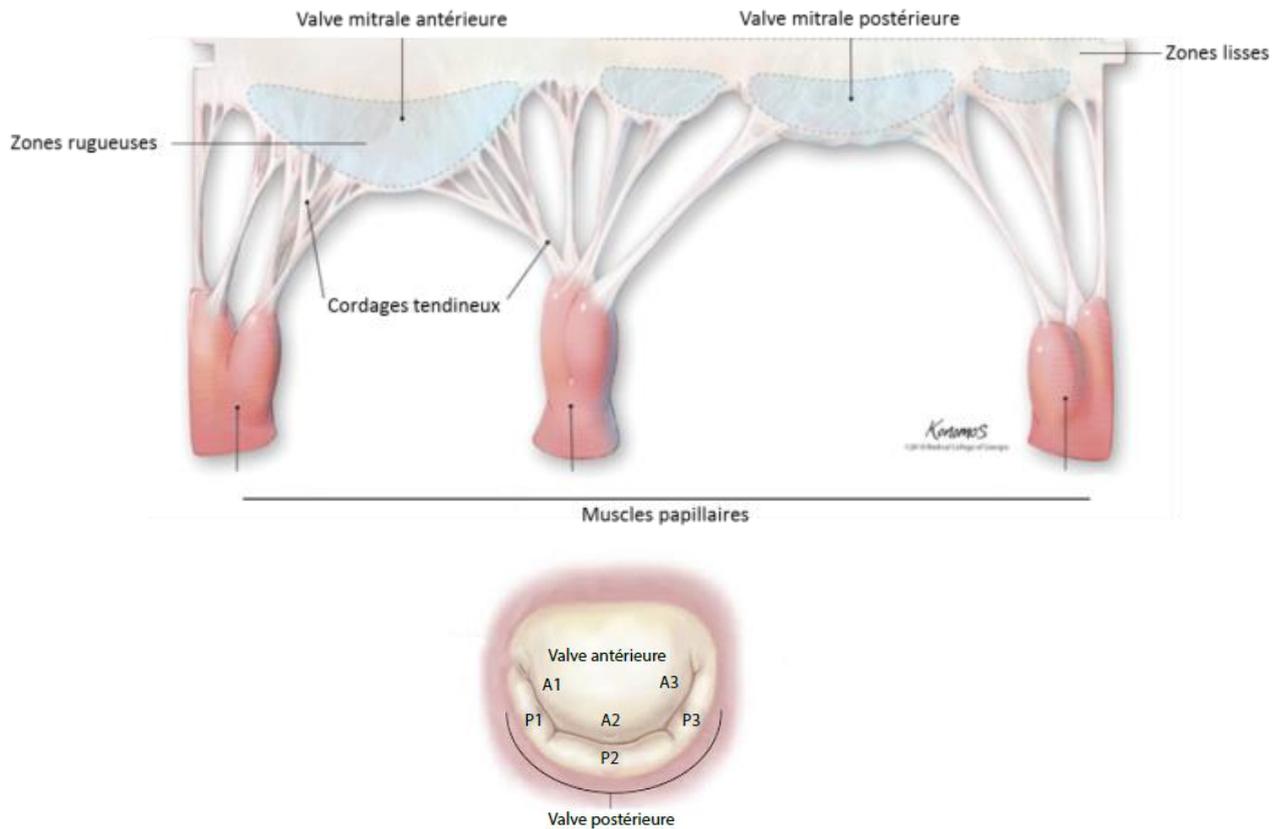


Figure 3: Anatomie descriptive de la valve mitrale

Image issue et modifiée à partir des sites :

<http://emedicine.medscape.com/>

<http://www.mitralvalverepair.org/>

I.3 Le Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM)

L'**insuffisance mitrale** (IM) est la valvulopathie la plus fréquente (1,7%) et sa prévalence augmente en fonction de l'âge sans influence du sexe (Nkomo et al. 2006) dans les pays occidentaux. L'IM peut être due à plusieurs étiologies. On retrouve les IMs : rhumatismales, dues à des endocardites, ischémiques, fonctionnelles dues à des cardiopathies sous-jacentes, d'origines médicamenteuses (sérotoninergiques) et des insuffisances mitrales dystrophiques.

Le **prolapsus valvulaire mitral (PVM)** correspond à une **insuffisance mitrale dystrophique** (Type II – prolapsus d'au moins une des valvules mitrales dans l'oreillette, au-delà de l'anneau mitral, lors de la systole ventriculaire).

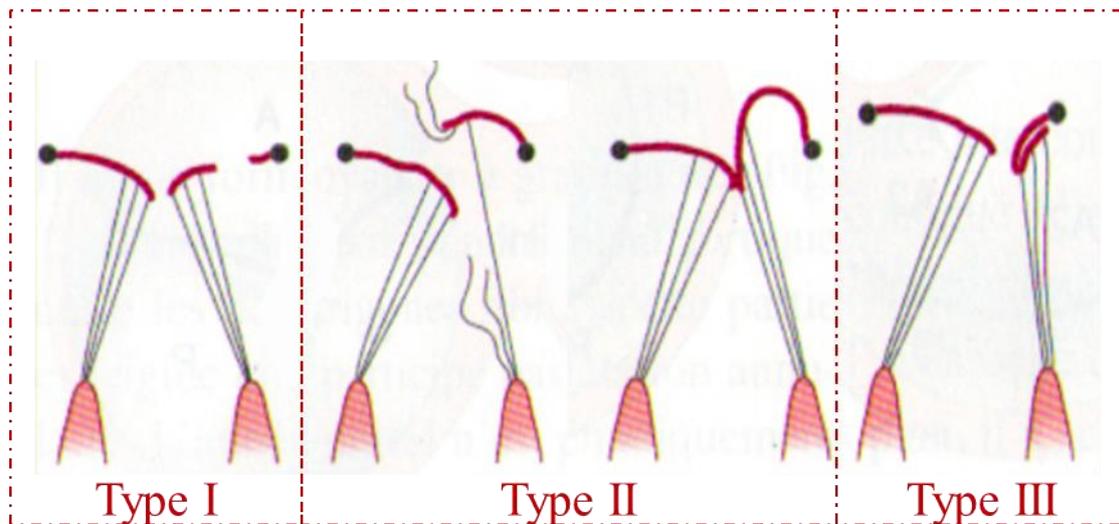


Figure 4: Classification des insuffisances mitrales en fonction de la position des valvules lors de la systole ventriculaire (proposée par Carpentier)

Type I: Valvules dans le plan de l'anneau, le tissu valvulaire lésé (dilatation ou perforation valvulaire) (exemple : IM par endocardites). Type II : Bord libre d'au moins une valvule en arrière du plan de l'anneau. (Exemple : IM par prolapsus ou rupture de cordage). Type III : Au moins une valvule sous le plan de l'anneau - jeu valvulaire restrictif. (Exemple : IM post-rhumatismales ou ischémiques)

(D'après http://irmcardiaque.com/index.php?title=Mecansime_im)

I.3.1 Aspects cliniques

I.3.1.1 Symptômes

Bien que la **symptomatologie** du PVM puisse être inexistante (Avierinos et al. 2002), dans la majorité des cas, elle se caractérise par des **signes ressentis** par le patient : douleurs thoraciques, dyspnées d'effort, puis de repos, orthopnée, palpitations, enflures des extrémités des membres, œdème pulmonaire.

I.3.1.2 Signes auscultatoires

A l'auscultation, le PVM est caractérisé par un **click méso systolique** associé ou non à un **souffle holo/télé systolique**. On parle de souffle en jet de vapeur dans le cas d'insuffisance mitrale. L'intensité du souffle est variable en fonction du débit cardiaque et de l'importance de la fuite. Seul l'examen écho-cardiographique permet de poser le diagnostic de PVM.

I.3.1.3 Signes échocardiographiques

L'échocardiographie bidimensionnelle (Trans-thoracique ou trans-œsophagienne) est l'examen de référence pour l'évaluation des valvulopathies. La valve mitrale est étudiée à partir de coupes parasternales gauches (grand axe et petit axe). Cet examen permet de mesurer la taille des valvules, de l'anneau mitral, l'épaisseur des valves etc. De plus les échocardiographies **doppler** peuvent **mesurer les flux** et reflux mitraux.

Le PVM est caractérisé par une **protrusion des feuillets valvulaires dans l'oreillette gauche** de plus de **deux millimètres** en arrière du plan de l'anneau (Levine et al. 1988) (Devereux et al. 1987) (Figure 5).

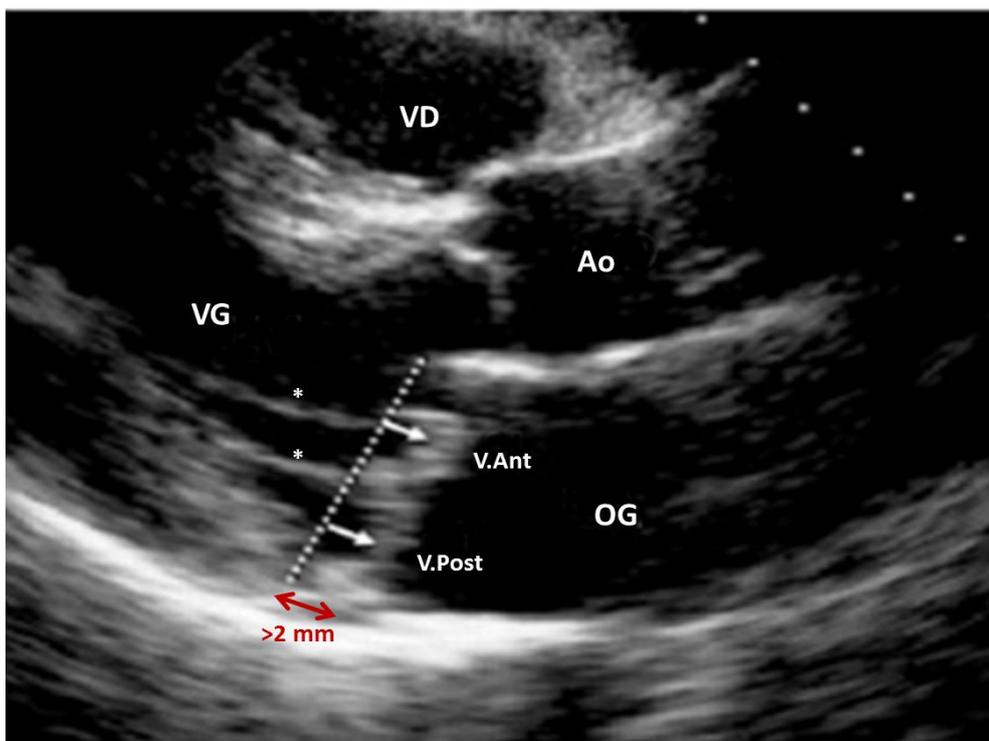


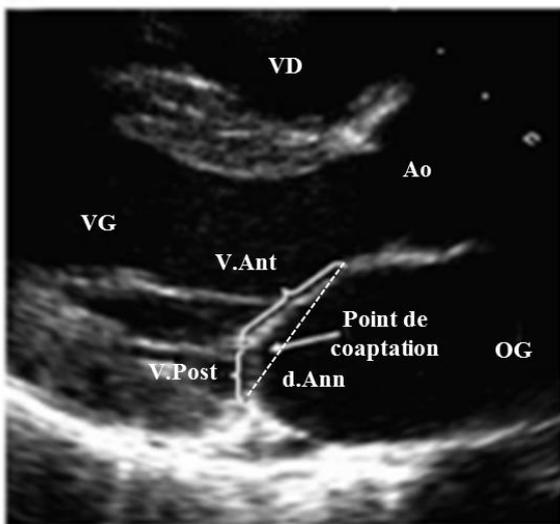
Figure 5: Échocardiographie trans-thoracique bidimensionnelle d'un patient atteint de PVM bivalvulaire

VD et VG représentent respectivement les ventricules droit et gauche, Ao correspond à l'aorte, OG correspond à l'oreillette gauche, V.Ant et V.Post représentent respectivement la valvule antérieure et postérieure de la valve atrio-ventriculaire gauche (Mitrale) et les astérisques () les cordages tendineux. La ligne pointillée correspond au plan de l'anneau mitral. Le prolapsus des valvules antérieure et postérieure est représenté par les flèches blanches. Une mesure supérieure à deux millimètres de ce prolapsus, est le critère diagnostique de PVM.*

D'après (Delling and Vasan 2014)

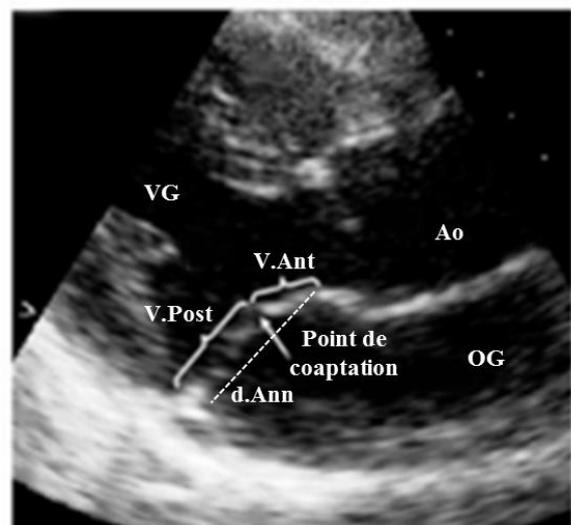
L'étude d'une grande famille atteinte de PVM (Nesta et al. 2005) a permis d'identifier des formes non-diagnostiques de PVM, précoces ou « prodromales ». Ces formes non diagnostiques (Prolapsus des valvules inférieur à 2 mm) sont caractérisées par une asymétrie de la valve postérieure qui va déplacer le point de coaptation des valvules vers l'avant. La mesure du point de coaptation valvulaire est calculée grâce à la mesures de la valve antérieure divisée par la taille de l'anneau mitral en systole ventriculaire. Physiologiquement le point de coaptation est situé à une distance qui correspond à 60% du diamètre de l'anneau (à partir de l'insertion de la valvule antérieure). On parle de déplacement antérieur du point de coaptation si ce rapport est supérieur à 60% (Figure 6).

A. Patient sain



$$\mathbf{V.Ant / d. Ann \geq 60\%}$$

B. Patient forme prodromale



$$\mathbf{V.Ant / d. Ann < 60\%}$$

Figure 6: Échocardiographie trans-thoracique bi-dimensionnelle. Définition des formes prodromales de PVM

A correspond à l'échocardiographie d'un patient sain et B. correspond à l'échocardiographie d'un patient présentant une forme prodromale de PVM. VD et VG représentent respectivement les ventricules droit et gauche, Ao correspond à l'aorte, OG correspond à l'oreillette gauche, V.Ant et V.Post représentent respectivement la valvule antérieure et postérieure de la valve atrio-ventriculaire gauche (Mitrale). La ligne pointillée correspond au plan de l'anneau mitral, et d.Ann, sa mesure.

Ces formes sont décrites comme des **formes précurseurs de progression** de la pathologie au sein de familles (Delling et al. 2015). Ces formes non diagnostiques ont aussi été évaluées sur des séries d'individus au sein de noyaux familiaux. Il apparaît que la présence de formes non diagnostiques chez les parents augmente statistiquement la prévalence de PVM chez les descendants (Delling et al. 2015). Le PVM résulte donc d'un **substrat génétique** et les répercussions sur les fonctions de la valve mitrale sont similaires entre les formes diagnostiques et non diagnostiques.

1.3.1.4 Pronostic et complications

La majorité des patients présente des formes bénignes de valvulopathies qui ont de faibles répercussions sur la fonction cardiaque. Cependant, certains patients présentent des formes sévères qui peuvent être à l'origine de complications allant de l'insuffisance valvulaire, au développement d'endocardites, à des insuffisances cardiaques, à des accidents thromboemboliques, à des troubles du rythme cardiaque, voir même des morts subites (Düren, Becker, and Dunning 1988) (Freed et al. 1999).

1.3.1.5 Aspects anatomiques et histologiques

Les cardiopathies valvulaires mitrales dégénératives sont les causes majoritaires d'IM sévères dans les pays industrialisés (Iung et al. 2003)(Enriquez-Sarano et al. 2005). De manière générale, les **valvulopathies dégénératives** correspondent à un spectre d'affections qui vont conduire à des **changements structuraux du tissu valvulaire**. Ces lésions dégénératives vont provoquer des **expansions**, des épaissements anormaux du **tissu conjonctif** des valves, des ruptures des cordages tendineux, des dilatations annulaires, ce qui va influencer sur les mécanismes valvulaires.

On distingue deux types de prolapsus valvulaires mitraux dégénératifs, la maladie de **Barlow** (ou dégénérescence myxoïde) et la **dégénérescence fibro-élastique (FED)**. Ces deux phénotypes distincts sont décrits par des études opératoires (Adams, Rosenhek, and Falk 2010) et échocardiographiques (Chandra et al. 2011). Une étude récente, utilisant l'échocardiographie 3D, décrit que le PVM de type Barlow présente une taille plus importante des valves, de l'anneau mitral (qui présente des dynamiques différentes) (Chandra et al. 2011) et un prolapsus plus marqué. En revanche, la **régurgitation mitrale** retrouvée dans les deux phénotypes (**FED ou Barlow**) est comparable (Clavel et al. 2015).

La **dégénérescence myxoïde** est caractérisée par un **excès diffus de tissu myxomateux** qui conduit à une forte augmentation de l'épaisseur valvulaire (souvent

supérieur à 3 mm). Les cordages tendineux peuvent être minces, mais sont **le plus souvent épaissis** voir calcifiés. Malgré des cordages **distendus**, les ruptures de cordages sont rares. Le processus pathologique se traduit par des infiltrations myxomateuses qui désorganisent la composition tri lamellaire de la valve (Anyanwu and Adams 2007), et produisent des altérations des fibres de collagènes (Fornes et al. 1999) qui conduisent à des valves redondantes (Figure 7). Ces altérations concernent **l'ensemble des segments de la valve** la plupart du temps (Anyanwu and Adams 2007). Les patients atteints de dégénérescences myxoïdes sont relativement jeunes (**âge < 60 ans**), sont plus volontiers des femmes et l'indication a été déterminée par l'existence d'un **souffle téléstolique et d'un « click » mésosystolique** à l'auscultation. L'histoire de la pathologie est **ancienne** et l'évolution est suivie avant l'indication cardiologique. Les patients atteints de la maladie de Barlow ont souvent une histoire familiale, un anneau mitral élargi et des symptômes d'insuffisance cardiaque.

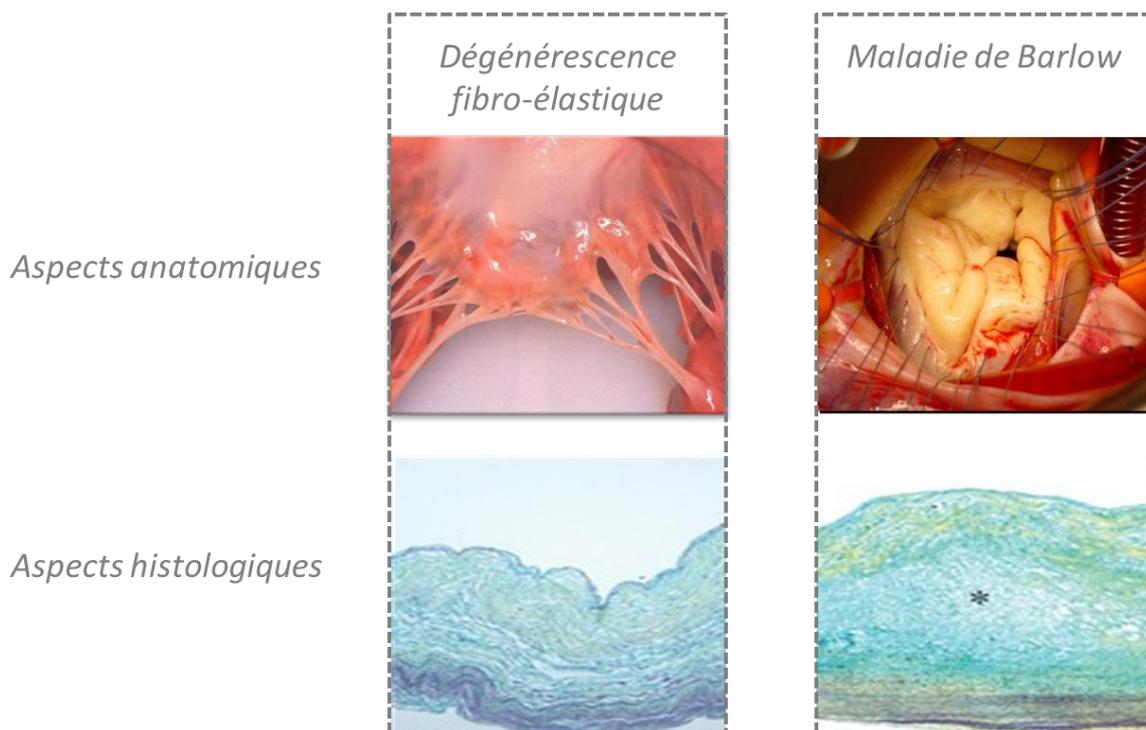


Figure 7: Aspects anatomiques et histologiques des dystrophies valvulaires mitrales (FED vs. Barlow)

<http://www.cram.com/>

Le PVM par **dégénérescence fibro-élastique** (FED) a été identifié dans les années 1960 par Barlow puis caractérisé par Carpentier en 1982. Contrairement à la maladie de Barlow, les **feuilletts valvulaires** ont une **épaisseur normale** (voir amincie) et sont par

ailleurs translucides (Fornes et al. 1999). Ces caractéristiques sont liées à une plus **faible production de tissu conjonctif** (collagènes, élastine, protéoglycans) (Figure 7). La structure tri lamellaire de la matrice extra cellulaire valvulaire est conservée, cependant, des infiltrations myxoïdes sont fréquemment retrouvées mais ne concernent que le segment prolabant de la valve (le plus souvent P2). Les **cordages valvulaires** sont aussi **amincis** et allongés conduisant fréquemment à des **ruptures de ces cordages**. L'étiologie de la déficience en tissu conjonctif valvulaire dans le cadre du FED n'est pas connue, mais est actuellement imputée à l'âge. Les patients atteints de FED sont le plus souvent asymptomatiques jusqu'à l'apparition d'une rupture de cordages. Contrairement à la maladie de Barlow, le FED affecte des **personnes plus âgées** et l'**histoire** de la pathologie (identification d'un souffle holo-systolique à l'auscultation) est **récente** (Tableau 1).

	Maladie de Barlow	Dégénérescence fibro-élastique
Age moyen de survenue	< 60 ans	> 60 ans
Souffle à l'auscultation	"Click" méso-systolique et souffle télé-systolique	Souffle holo-systolique
Valvulopathie mitrale connue depuis:	Plusieurs années	Quelques mois
Épaisseur de feuillets valvulaires	Excès diffus de tissu	Épaisseur normale voire amincie
Segments valvulaires prolabants	Plusieurs segments prolabants	Un seul segment prolabant
Diamètre de l'anneau mitral	Dilaté	Normal
Cordages	Souvent épaissis et distendus	Fins
Ruptures de cordages	Rares	Fréquentes
Historique familial	Fréquent	Non

Tableau 1: Caractéristiques cliniques de la maladie de Barlow et de la dégénérescence fibro-élastique

Il n'existe pas de recommandations chirurgicales spécifiques du Barlow et du FED alors que les mécanismes impliqués apparaissent clairement différents (Nishimura et al. 2014).

Malgré ces entités pathologiques dégénératives différentes, un spectre continu des lésions est décrit dans la pratique clinique (Figure 8). On retrouve des formes intermédiaires

(frustes) avec un ou plusieurs segments prolabants avec plus ou moins d'épaississement des valvules et des cordages tendineux (Adams, Rosenhek, and Falk 2010).

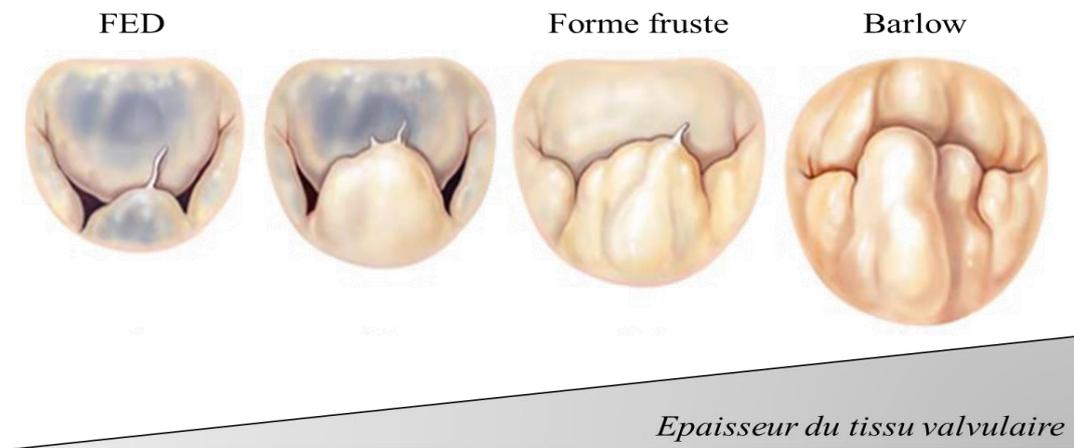


Figure 8: Continuum des affections dystrophiques valvulaires mitrales

D'après (Adams, Rosenhek, and Falk 2010)

De manière intéressante, le FED ne provoque pas d'altération de la taille ni de la dynamique de l'anneau mitral. C'est probablement pour cela que les traitements par plastie mitrale percutanée par MitralClip®, chez des patients indiqués pour ce type d'interventions, donnent des résultats encourageants pour les patients atteints de PVM de type FED (Glower et al. 2014)(Clavel et al. 2015).

I.3.1.6 Traitements

Le seul traitement spécifique qui influe sur la valve en elle-même, est la réalisation d'un acte chirurgical. La chirurgie est indiquée en cas d'insuffisance mitrale chronique symptomatique et en l'absence de contre-indications chirurgicales.

Deux types d'interventions chirurgicales sont disponibles pour corriger une insuffisance mitrale : la plastie mitrale et le remplacement valvulaire. Le choix de chirurgie dépend principalement de l'**anatomie valvulaire**, de l'expertise chirurgicale du centre de soins et de l'**état de santé général** du patient.

Dans le premier cas, **si la valve est « réparable »**, les chirurgiens effectuent une réparation de la valve (plastie mitrale) qui est associée, de manière presque systématique, à l'ajout d'un anneau mitral. La plastie est l'intervention de référence pour les prolapsus valvulaires mitraux.

Si la valve n'est pas réparable, elle est remplacée par une prothèse. On distingue deux grandes familles de prothèses : -les prothèses mécaniques et les valves biologiques (ou bio prothèse). De façon simplifiée, les prothèses mécaniques ont une longue durée de vie mais les patients doivent prendre un traitement anticoagulant à vie, alors que les bio-prothèses ne nécessitent pas d'anticoagulants mais se détériorent avec le temps.

De nouvelles techniques de « **plasties mitrales percutanées** », qui consistent à joindre « bord à bord » les deux feuillets valvulaires mitraux, peuvent être indiquées chez des patients symptomatiques avec une insuffisance mitrale sévère, jugés non opérables (ou à haut risque opératoire) et ayant une espérance de vie supérieure à un an. Ces méthodes endovasculaires sont à l'étude sur des cohortes de patients afin d'évaluer la sécurité et les bénéfices de cette pratique (Glower et al. 2014)(Wan et al. 2013).

Des **traitements médicamenteux** existent pour traiter les pathologies valvulaires cardiaques mais restent du domaine palliatif (traitement des complications et prévention). Les diurétiques permettent de diminuer les œdèmes pulmonaires aigus. La présence de fibrillations auriculaires conduit à la prescription d'anti-arythmiques et d'anticoagulants, pour prévenir la formation de thrombus. Des vasodilatateurs (IEC) et des β -bloquants sont aussi prescrits afin de diminuer les répercussions sur la valve de contraintes hémodynamiques. Enfin les patients souffrants d'une pathologie valvulaire mitrale ont de forts risques de développer des endocardites infectieuses et reçoivent une antibioprophylaxie avant toute intervention chirurgicale.

I.4 Génétique du PVM

Bien que les valvulopathies aient été longtemps décrites comme des **processus passifs acquis et dégénératifs**, il existe des formes familiales démontrant une **forte implication de facteurs génétiques** sous-jacents (Devereux et al. 1983) (Monteleone and Fagan 1969) (Delling and Vasan 2014). Ces anomalies peuvent être présentes dès la naissance ou plus tardivement au cours de la vie (Freed et al. 1999) (R. A. Levine et al. 1988). Les progrès des connaissances des bases génétiques des valvulopathies héréditaires syndromiques et non-syndromiques, couplés à la **découverte de réseaux de gènes et de mécanismes moléculaires** qui régulent le développement des valves, permettent une meilleure compréhension des bases physiopathologiques de ces maladies qui seront potentiellement la clef vers l'élaboration de nouvelles stratégies de prise en charge et de dépistage.

1.4.1 Génétique des formes syndromiques

Il existe de nombreux **syndromes** pour lesquels la présence de **PVM représente un des symptômes associés**. L'étude génétique de ces formes apporte des informations sur les mécanismes, gènes et voies de signalisation impliqués dans les affections valvulaires mitrales.

Parmi les affections syndromiques, les plus courantes sont associées à des dysfonctionnements de la **voie de signalisation du TGFβ** qui sera décrite ultérieurement, ces syndromes sont « apparentés » au syndrome de Marfan qui est le plus fréquent et le mieux décrit.

Le syndrome de Marfan est une maladie de transmission autosomique dominante dont la prévalence est de 1/5 000 naissances. Ce syndrome est dû, dans la majorité des cas, à des mutations du gène ***FBNI*** (chr15q21) (Dietz et al. 1991) qui code pour la fibrilline de type 1, mais aussi du gène ***TGFBR2*** (chr3p24) (Collod et al. 1994) (Mizuguchi et al. 2004) (Pannu et al. 2005) (Loeys et al. 2005).

La fibrilline est un composant structural des micro-fibrilles de la matrice extracellulaire où elle permet l'organisation des fibres élastiques et possède un rôle important dans la mécano-transduction. De plus, elle permet un stockage de TGFβ au sein de cette matrice. La fibrilline 1 est une protéine du tissu conjonctif ubiquitaire, ce qui en cas de dysfonctionnements entraîne des affections systémiques de types : cardiovasculaires, musculo-squelettiques, ophtalmiques et pulmonaires. Les affections cardiaques retrouvées dans ce syndrome sont diverses et touchent en particulier l'aorte et la valve mitrale. Les affections de l'aorte (ascendante essentiellement), correspondent à une paroi fragile, dilatée qui peut conduire à des dissections aortiques. Une étude récente, comparant les patients avec des mutations ***FBNI*** ou ***TGFBR2***, démontre que le PVM et les régurgitations mitrales sont plus fréquentes chez les patients présentant des mutations dans le gène ***FBNI*** (Attias et al. 2010). En effet, 45% à 56% des patients présentent un PVM et 21% à 35% présentent des régurgitations mitrales (respectivement mutés ***TGFBR2*** et ***FBNI***).

Des syndromes présentant des symptômes proches du syndrome de Marfan ont été décrits (atteintes de l'aorte, du tissu conjonctif et valvulaire). Ainsi, de nouveaux gènes, et des syndromes spécifiques ont été identifiés et liés à des affections du tissu conjonctif. Ces syndromes impliquent des gènes codants pour des protéines de la voie du TGFβ. On retrouve le **syndrome de Loeys-Dietz**, récemment décrit. Ce syndrome est une pathologie de transmission autosomique dominante. Elle est présente pour une naissance sur 1 000 000 et

est causée par des mutations des gènes **TGFBR1 et 2** (Loeys et al. 2005) avec des expressivités variables. Les patients atteints de ce syndrome présentent une occurrence plus faible de PVM, en comparaison au syndrome de Marfan (Attias et al. 2010). Les patients atteints de **Dysplasie Géléophysique**, présentent aussi des affections de la valve mitrale. C'est une maladie extrêmement rare (moins de 30 cas décrits au monde). De transmission autosomique dominante ou récessive, cette pathologie est provoquée par des mutations des gènes **FBNI ou ADAMTSL2** (Goff et al. 2008). On retrouve aussi le syndrome dit de **Polypose Juvénile** qui est une pathologie de transmission autosomique dominante rare (1 pour 100 000 naissances). Elle est due dans la majorité des cas à des mutations du gène **SMAD4** et plus rarement à des mutations du gène **BMPRI** (Andrabi et al. 2011). Enfin, les patients atteints d'**Anévrismes thoraciques et ostéoarthrites** présentent des anomalies mitrales dans 51% des cas (Van der Linde et al. 2012). Cette pathologie très rare (<1/1000000), de transmission autosomique dominante, a été associée à des mutations du gène **SMAD3**.

D'autres affections syndromiques, impliquant des PVM, ont été associées à des défauts de synthèse, de composition et de régulation de la **matrice extra cellulaire**.

Parmi ces syndromes, on retrouve l'**ostéogénèse imparfaite (dite maladie de Lobstein)**, décrite en 1965 (Criscitiello et al. 1965) et qui a une prévalence de 1/20000 à 1/10000. Dans 95% des cas elle est due à des mutations de transmission autosomique dominante des gènes **COL1A1 et COL1A2** (17q21.33 et 7q21.3) et a été associée au PVM (Wong et al. 1995). De la même manière, le **Syndrome d'Ehlers-Danlos** a été associé à des mutations des gènes des collagènes de type I, III, V, IX et des ténascines. Le sous type IV de ce syndrome (**COL3A1**) est la forme qui présente le plus de répercussions cardiovasculaires. Il est transmis de manière autosomique dominante et une incidence de 6% de PVM est estimée chez ces patients (Atzinger et al. 2011). Le **Pseudo xanthome élastique** est une pathologie du tissu conjonctif caractérisée par une calcification et une fragmentation progressives des fibres élastiques. Elle est associée à des mutations du gène **ABCC6**. Les auteurs décrivent 4,5% des patients atteints de PVM (Prunier et al. 2013). Enfin, les patients atteints du syndrome « **Larsen-like** », causé par des mutations du gène **B3GAT3**, présentent des anomalies cardiovasculaires (y compris un PVM) dues à un défaut de synthèse de protéoglycans (Baasanjav et al. 2011).

Des anomalies du **développement cardiaque** peuvent aussi générer des affections de la valve mitrale.

En effet, la **Polykystose Rénale**, transmise de manière autosomique dominante et qui représente plus d'une naissance sur 1000, est due à des mutations des gènes **PKD1** et moins fréquemment **PKD2**. 26% des patients atteints par ce syndrome présentent un PVM (Lumiahio et al. 2002). La protéine Pkd1 est un inhibiteur de la voie Snail impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse lors du développement cardiaque (Du et al. 2010). **Le syndrome de Holt-Oram**, de transmission autosomique dominante, est caractérisé par des mutations des gènes **TBX3 et TBX5** et donne lieu à de nombreux phénotypes cardiovasculaires, dont du PVM (Miller, Salcedo, and Bahler 1975).

Grâce à l'étude des pathologies liées à des mutations des gènes de la famille des Ras/MAP kinases, il apparaît que la voie de **régulation du cytosquelette d'actine** soit impliquée dans la pathogénèse du PVM.

En effet, les « **RASopathies** » correspondent à un groupe de pathologies caractérisées par des mutations dans les gènes codant pour les protéines de la voie de signalisation Ras/MAPK (Rauen 2012) impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Ces syndromes conduisent à des malformations artérioveineuses, cardiaques (dans 60 à 85% des cas) (Digilio et al. 2012) et à des défauts du canal atrio-ventriculaire et de la valve mitrale. Les protéines Ras, sont des petites GTPases qui font partie de la famille des protéines G monomériques. Elles sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires comme l'organisation du cytosquelette d'actine, la polarité, la motilité et la survie cellulaire (Loirand, Sauzeau, and Pacaud 2013).

Syndromes	Gène(s) impliqué(s)	Voies de signalisation impliquées (suspectées)
Syndrome de Marfan	<i>FBNI ; TGFBR2</i>	Voie du TGFβ
Syndrome de Loeys-Dietz	<i>TGFBR1 ; TGFBR2</i>	Voie du TGFβ
Dysplasie Géléophysique	<i>FBNI ; ADAMTSL2</i>	Voie du TGFβ
Polypose Juvénile	<i>SMAD4</i>	Voie du TGFβ
Anévrismes Thoraciques et Ostéoarthrites	<i>SMAD3</i>	Voie du TGFβ
Ostéogénèse imparfaite (Lobstein)	<i>COL1A1 ; COL1A2</i>	Composition/Régulation de la Matrice extra-cellulaire
Ehlers-Danlos (type IV)	<i>COL3A1</i>	Composition/Régulation de la Matrice extra-cellulaire
PseudoXanthome Élastique	<i>ABCC6</i>	Composition/Régulation de la Matrice extra-cellulaire
Syndrome Larsen-Like	<i>B3GAT3</i>	Composition/Régulation de la Matrice extra-cellulaire
Holt-Oram	<i>TBX3 ; TBX5</i>	Développement cardiaque Régulation transcriptionnelle
Polykystose rénale	<i>PKD1</i>	Inhibition transition épithélio-mésenchymateuse
RASopathies	<i>PTPN11 ; RAF1 ; HRAS ; BRAF ; MAP2K1-2 ; KRAS</i>	Voie de signalisation des Ras-GTPases/MAPK

Tableau 2: Génétique des formes syndromiques de prolapsus valvulaire mitral

La découverte puis l'analyse de ces syndromes apportent des éclaircissements sur les bases génétiques et moléculaires du PVM. On retrouve des voies de signalisation communes impliquées qui sont par ailleurs très différentes (Tableau 2).

I.4.2 Génétique des formes non syndromiques de PVM

I.4.2.1 Génétique des formes familiales non syndromiques

Le caractère héréditaire du PVM d'origine non-syndromique a été proposé depuis de nombreuses années (Devereux et al. 1983). Le PVM présente des pénétrances variables en fonction de l'âge, du sexe et des manifestations cliniques différentes entre les individus atteints d'une même famille (Devereux et al. 1983) (Zuppiroli et al. 1998) (Freed et al. 1999) (Nesta et al. 2005). Le PVM est majoritairement transmis de manière autosomique dominante

(Devereux et al. 1983), cependant, des formes de transmission liées à l’X ont été décrites (Monteleone and Fagan 1969) (Kyndt et al. 1998). Dans ce contexte, grâce au développement des technologies de diagnostic et aux progrès majeurs de la génétique « moderne », des études de liaisons génétiques sur de grandes familles atteintes de PVM ont identifié **quatre loci** respectivement sur les chromosomes X, 16, 11 et 13 (Kyndt et al. 1998) (Disse et al. 1999) (Freed et al. 1999) (Nesta et al. 2005).

Le premier locus a été identifié dans une grande famille atteinte d’une forme de dégénérescence myxoïde valvulaire **liée à l’X**. Cette forme spécifique présente des atteintes multi valvulaires et une forme modérée d’hémophilie A. Le gène du facteur VIII de coagulation responsable de l’hémophilie A est localisé sur le chromosome X (Xq10) et fondait un point de départ intéressant de l’existence d’une liaison sur le chromosome X. La famille initiale est constituée de 9 patients atteints sur quatre générations. Le locus responsable de la dystrophie valvulaire a été identifié en **Xq28** avec un **LOD score de 6,57** et correspond à une région chromosomique de 8 cM (2.5Mb) (Kyndt et al. 1998).

Le second locus (**MMVP1** premier locus décrit pour les formes autosomiques) a été identifié en 1999 sur le chromosome 16. Grâce à une étude échocardiographique systématique des apparentés au premier degré de patients ayant bénéficié de plasties mitrales, les auteurs ont identifié 4 familles présentant une transmission autosomique dominante de PVM. Au sein de ces quatre familles, les auteurs ont réalisé une étude de liaison pangénomique et ont identifié un locus en **16p11.2-p12.1** qui représente un haplotype de 5 cM, avec des **LOD scores de 5,45 et 5,68** (Disse et al. 1999). Cependant, la variation génétique et le gène en cause restent pour le moment inconnus.

Le **troisième locus (MMVP2)** a été identifié en 2003 chez une grande famille atteinte de PVM composée de 12 individus atteints (sur quatre générations) avec une transmission autosomique dominante du PVM. Ce locus de 4,3 cM est localisé en **11p15.4** et présente un **LOD score de 3.12** (L. A. Freed et al. 2003).

En 2005, un nouveau **locus (MMVP3)** de 8,61 cM a été identifié en **13q31.3-q32** dans une famille comprenant 8 patients atteints. L’haplotype identifié est présent chez tous les patients atteints. Cependant, cet haplotype est retrouvé chez des apparentés initialement considérés sains. Au regard de cette observation, il apparaît que le **même substrat génétique** peut générer un **spectre d’expressions variables** de la pathologie. Deux formes prodromales

et trois formes mineures ont ainsi pu être identifiées. Cette étude a permis la **redéfinition des formes non-diagnostiques (dites prodromales)** décrites dans le paragraphe (I.3.1.3).

Ce n'est qu'en 2007 que le **premier gène** responsable d'une forme non-syndromique de PVM a été identifié. A partir de l'identification du locus en **Xq28** (Kyndt et al. 1998), le séquençage des gènes de l'intervalle a permis d'identifier la mutation **p.Pro637Gln dans le gène *FLNA*** qui co-ségrège avec la dystrophie valvulaire au sein de la famille initiale de plus de **300 individus**. Les patients atteints de la famille présentent des **valves dysmorphiques épaissies, des cordages tendineux épaissis et une dilatation de l'anneau mitral**. Le séquençage du gène *FLNA* sur une plus large cohorte de patients atteints de PVM a permis d'identifier de **nouvelles mutations** (p.Gly288Arg, p.Val711Asp) et une **délétion** des exons 16 à 19 (Kyndt et al. 2007).

Très récemment, l'équipe de Susan Slaugenhaupt à Boston, a identifié grâce au séquençage des régions codantes du locus initialement identifié en 11p15.4 (MMVP2), la mutation responsable du PVM au sein de la famille étudiée. En effet la mutation **p.Arg2513His retrouvée** dans le gène *DCHS1* co-ségrège avec la présence de PVM avec une expressivité variable en fonction de l'âge et des critères diagnostiques spécifiques (Freed et al. 2003) (Durst et al. 2015). De plus, la mutation (p.Arg2330Cys) a été retrouvée au sein de deux familles nucléaires et co-ségrège avec la présence de PVM.

I.4.2.2 Identification de loci de susceptibilité

Une étude d'association génome entier (GWAS) très récente, a permis d'identifier des *loci* de susceptibilité associés au PVM dans sa forme non syndromique à partir de série de cas de PVM isolés (Dina et al. 2015).

Initialement les études étaient issues de deux études réalisées séparément sur deux populations de patients atteints de PVM françaises. La première méta-analyse, comprenait 1412 patients et 2439 contrôles. Cette première étape a permis d'identifier trois *loci* statistiquement significatifs à l'échelle du génome (p valeurs < 5.10^{-8}). Ces trois associations sont situées sur les chromosomes 2q35 (à proximité des gènes *TPN1*, *IGFBP5*, *IGFBP2*, *DIRC3* et *TNS1*), 17p13 (dans une région intronique du gène *SMG6*), 22q12 (à proximité des gènes *MNI* et *PITPNB*). Des étapes de répliation ont été réalisées sur des cohortes américaines et espagnoles comparées à des individus contrôles de la population européenne ancestrale. En définitive, l'étude comprend le génotypage de 2864 patients atteints de PVM et 9218 contrôles. L'étude dans son ensemble a permis d'identifier **six loci significativement**

associés à la présence de PVM. Dans l'ordre des p valeurs, les signaux d'association sont retrouvés sur : -le chromosome 3p13 dans une région intronique du gène *LMCD1* (p valeurs=1,29x10-11), - le chromosome 2q35 (à proximité des gènes *TPN1*, *IGFBP5*, *IGFBP2*, *DIRC3* et *TNS1*) (p valeurs=3,1x10-11), -le chromosome 21q22 (à proximité des gènes *CBRI* et *SETD4*) (p valeurs = 1,18 × 10⁻⁸), -le chromosome 22q12 (à proximité des gènes *MNI* et *PITPNB*) (p valeurs = 1,39 × 10⁻⁸), -le chromosome 17p13 (dans une région intronique du gène *SMG6*) (p valeurs = 1,46 × 10⁻⁸) et sur le chromosome 14q24 (à proximité des gènes *SIPA1L1* et *PCNX*) (p valeurs = 1,46 × 10⁻⁸).

Ces résultats appuient l'importance de déterminants génétiques dans le développement du PVM et démontrent une implication de *loci* de susceptibilité avec des odds ratio compris entre 1,22 et 1,33.

Afin d'identifier les gènes de susceptibilité au sein de ces *loci*, les auteurs, se sont basés : -sur la proximité des gènes vis-à-vis des signaux d'association, -sur l'expression de ces gènes dans le tissu cardiaque (dans des bases de données publiques et sur des cœurs de souris en développement) et sur la relevance de ces gènes vis-à-vis des processus développementaux cardiaques. En définitive, huit gènes retrouvés au sein de six *loci* ont été investigués par des approches fonctionnelles (*IGFBP2A*, *IGFBP2B*, *IGFBP5A*, *IGFBP5B* et *TNS1* (*locus* 2q35) ; *LMCD1* (*locus* 3p13) et *SMG6*, *SMSM2* (*locus* 17p13)).

1.4.3 Génétique du PVM dans les modèles de chiens

La dégénérescence valvulaire mitrale myxoïde est la maladie cardiaque la plus fréquente chez le chien (10 fois plus fréquente que chez l'Homme) (Detweiler and Patterson 1965) (Pedersen and Häggström 2000). Les troubles à l'auscultation apparaissent chez des chiens d'âge moyen à avancer. Bien que de nombreuses races de chiens (souvent de petite taille) soient touchées par cette dégénérescence mitrale (Yorkshire terriers, chihuahuas, Cockers etc.), l'espèce la plus assujetti au développement de PVM est l'Épagneul Cavaliers King Charles (Pedersen, Lorentzen, and Kristensen 1999) (Serfass et al. 2006). On observe les mêmes caractéristiques phénotypiques que chez l'Homme avec une augmentation des cas en fonction de l'âge (Pedersen and Häggström 2000). La moitié des Épagneuls Cavaliers King Charles présentent un PVM à l'âge de 5-6 ans et près de 100% à 10 ans.

Une origine héréditaire du PVM est fortement suspectée. En 1996, une étude a démontré que les parents Cavaliers King Charles présentant un souffle mitral de haut grade engendraient plus souvent des chiots avec un souffle mitral, vis-à-vis de parents avec de

faibles souffles (Swenson et al. 1996). En effet, le statut phénotypique mitral d'un individu est directement corrélé au degré de sévérité du PVM chez les parents (Olsen, Fredholm, and Pedersen 1999) (Swenson et al. 1996) (Lewis et al. 2011).

Une étude d'association sur génome entier (GWAS) réalisée sur 139 cas et 102 contrôles (chiens d'au moins 8 ans sans souffle mitral ou modéré) Cavaliers King Charles, a permis d'identifier 2 *loci* associés à la pathologie. Ces deux *loci* CFA 13q2.2.3 et CFA14.q.1.3 correspondent à des régions de 1,68 et 1,58 Mb. Un des *loci* aurait un effet pathogène alors que l'autre aurait un effet protecteur. Ces deux *loci*, contiennent 31 gènes codants (respectivement 20 et 11) mais les gènes responsables de la pathologie au sein de ces *loci* ne sont, pour le moment, pas identifiés (Madsen et al. 2011).

1.4.4 Génétique du PVM et modèles murins

Les modèles murins sont très utilisés pour démontrer *in vivo* l'importance de voies de signalisation dans la pathologie étudiée. Ainsi, grâce à l'évolution des techniques de transgénèse, des modèles murins ont été développés pour valider: -l'implication des gènes identifiés dans les formes syndromiques de PVM (*Fbn1* (Ng et al. 2005), *Ptpn11* (Lauriol, Jaffré, and Kontaridis 2015), *Adamtsl2* (Hubmacher et al. 2015) *Tgfb β 1* et 2 (Robson et al. 2010) (Arthur and Bamforth 2011), *Smad4* (Wang et al. 2005) etc.), ainsi que dans les formes non-syndromiques (*FlnA* (Norris et al. 2010) (Sauls et al. 2012)) afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués. Ces modèles et les mécanismes physiopathologiques identifiés seront développés dans le paragraphe I.5.

Cependant, avec la génération d'un grand nombre de modèles murins, des bases de données ont vu le jour et référencent les relations phénotypes/génotypes de ces modèles. Par exemple, MouseMine est né d'une collaboration entre le « Mouse Genome Informatics », le « Jackson Laboratory » et le projet InterMine (<http://www.mousemine.org/mousemine/begin.do>). Ces projets ont pour buts de développer les connaissances scientifiques et de favoriser les collaborations entre les chercheurs. Dans cette base de données, je me suis intéressé à tous les modèles présentant des défauts morphologiques de la valve mitrale n'ayant pas été identifiés à partir de données de génétique humaine. Cette liste est présentée dans le Tableau 3.

Gène	Nom de la protéine	Phénotype murin
Adam17	ADAM metallopeptidase domain 17	Morphologie anormale de la valve mitrale
Adam19	ADAM metallopeptidase domain 19	Morphologie anormale de la valve mitrale
Arsb	Arylsulfatase B	Morphologie anormale de la valve mitrale Régurgitation de la valve mitrale
Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor type-1A	Régurgitation de la valve mitrale Morphologie anormale des valvules mitrales
Crebbp	CREB binding protein	Morphologie anormale de la valve mitrale
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Valvules mitrales épaissies
Cyr61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Morphologie anormale de la valve mitrale
Dnah11	dynein, axonemal, heavy chain 11	Morphologie anormale de la valve mitrale
Dock1	dedicator of cytokinesis 1	Valvules mitrales épaissies
Efna1	Ephrine A	Valvules mitrales épaissies
Efnb2	Ephrine-2B	Valvules mitrales épaissies
Ehmt1	Euchromatic histone-lysine N- methyltransferase 1	Morphologie anormale des valvules mitrales
Gja5	Connexine 40	Sténose de la valve mitrale
Hbegf	Heparin-binding EGF-like growth factor	Morphologie anormale de la valve mitrale
Hey2	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2	Morphologie anormale de la valve mitrale Régurgitation de la valve mitrale Valvules mitrales épaissies
Idua	Iduronidase alpha L	Morphologie anormale de la valve mitrale Régurgitation de la valve mitrale
Megf8	multiple EGF-like-domains 8	Morphologie anormale de la valve mitrale
Nf1	neurofibromin	Morphologie anormale des valvules mitrales
Nfatc1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	Morphologie anormale de la valve mitrale
Ntf3	Neurotrophine 3	Valvules mitrales épaissies
Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	Morphologie anormale de la valve mitrale
Pdlim7	PDZ and LIM domain 7	Morphologie anormale de la valve mitrale Morphologie anormale de l'anneau mitral
Rxra	retinoid X receptor, alpha	Morphologie anormale de la valve mitrale Sténose mitrale Atrésie de la valve mitrale
Sh3pxd2b	SH3 and PX domains 2B (SH3PXD2B)	Morphologie anormale de la valve mitrale Prolapsus valvulaire mitrale
Smad6	SMAD family member 6	Valve mitrale épaissie

Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9	Morphologie anormale de la valve mitrale Valve mitrale calcifiée
Tll1	tolloid-like 1	Morphologie anormale de la valve mitrale

Tableau 3: Modèles murins présentant des affections de la valve mitrale

*Le tableau a été généré à partir des informations de la base de données MouseMine (<http://www.mousemine.org/mousemine/begin.do>) grâce à la recherche du motif « *mitral* » dans la recherche de phénotypes de mammifères.*

A partir cette liste de gènes, grâce aux annotations GeneOntology (<http://geneontology.org/>), il est possible de mettre en évidence des processus biologiques enrichis (<http://www.pantherdb.org/>) (Thomas et al. 2003). Ainsi, il apparaît que les 27 gènes identifiés sont fortement représentés dans des fonctions de **différenciation**, de **morphogénèse**, dans le **développement embryonnaire** (valvulaire, cardiaque et neuronal) ainsi que dans des fonctions de **locomotion**, de **motilité** et de **migration cellulaire**. Ces informations peuvent permettre d'identifier de nouvelles voies afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le PVM.

1.4.5 Le zebrafish, un modèle d'intérêt pour l'étude du PVM

Le zebrafish semble être un bon modèle pour étudier les aspects développementaux des valves cardiaques. En effet le canal atrio-ventriculaire se développe très rapidement et permet la formation et la visualisation des coussins valvulaires (Peal, Lynch, and Milan 2012). De plus, l'inactivation de gènes par la technologie des morpholinos permet un screening rapide et est un outil efficace de validation de l'implication de gènes suspectés (Chen et al. 2013). De nouvelles technologies d'édition génomique permettent de générer des zebrafish présentant des mutations ponctuelles réversibles (Huang et al. 2012). Il a été montré par ce modèle, que l'inactivation du **miR-21** (micro ARN 21) entraîne une anomalie du développement de la valve atrio-ventriculaire (Kolpa et al. 2013). Aussi, l'inhibition de la voie de signalisation **Wnt/β-caténine** chez le zebrafish induit la formation excessive et désorganisée de coussins valvulaires (Hurlstone et al. 2003). Enfin la surexpression d'une forme tronquée du gène **APC** (un acteur important de la voie Wnt/β-caténine), conduit à la formation de valves dysmorphiques (Hurlstone et al. 2003). Cependant, l'étude du zebrafish comporte certaines limites. En effet, il ne présente qu'une seule valve atrio-ventriculaire, l'étude de gènes spécifiques nécessite la présence de gènes orthologues et le processus dégénératif au cours du temps ne peut être évalué mais reste une méthode de screening génétique et pharmacologique rapide et efficace (Asnani and Peterson 2014).

I.5 Hypothèses physiopathologiques

De manière générale, les **valvulopathies dégénératives**, correspondent à un spectre d'affections qui vont conduire à des **changements structuraux du tissu valvulaire**. Ces lésions dégénératives peuvent provoquer des **expansions**, des épaissements anormaux du **tissu conjonctif**, des ruptures des cordages tendineux, des dilatations annulaires qui vont influencer sur les mécanismes valvulaires. Dans cette partie, je m'attacherai à décrire les hypothèses physiopathologiques impliquant différents aspects de physiopathologie de la valve mitrale. Je décrirai dans un premier temps, **les structures histologiques valvulaires** et leurs **altérations** dans le cadre de **valvulopathie mitrale dégénérative**. Je m'intéresserai ensuite aux **mécanismes de régulation** de l'équilibre **synthèse/dégradation** de la matrice extracellulaire puis terminerai par une description de la **valvulogénèse** et des étapes du développement pouvant conduire à des valvulopathies mitrales.

1.5.1 Altérations de la matrice extra cellulaire et remodelages structurels

La composition et la distribution du tissu valvulaire sont essentielles pour permettre à la valve mitrale d'effectuer sa fonction et sa longévité. La description et la dénomination des tissus valvulaires remontent à 1931 (Gross and Kugel 1931). Les auteurs décrivent les données anatomo-histologiques des feuillets valvulaires adultes et proposent une nomenclature toujours utilisée à l'heure actuelle.

La valve mitrale est composée d'une matrice extra cellulaire (MEC) tri lamellaire organisée, compartimentée, dans laquelle sont enchâssées des cellules interstitielles de valves (CIVs) et est entourée d'une monocouche de cellules endothéliales valvulaires (CEVs) (Figure 9). **La lame inférieure** (bord ventriculaire de la valve), appelée **fibrosa**, est composée de fibres de collagènes (type I et III) très denses disposées de manière circonférentielle (Hinton and Yutzey 2011). Cette lame fournit une **résistance** nécessaire à la pression exercée lors de la fermeture de la valve en systole ventriculaire. La lame **intermédiaire**, appelée **spongiosa**, est majoritairement composée de protéoglycans et de glycosaminoglycans (Acide hyaluronique, polysaccharides, chondroïtine sulfate 4 et 6 et décorine) (Latif et al. 2005). C'est en quelque sorte, une zone tampon, qui, grâce à ses composés, confère à la valve ses capacités de compliance et de flexibilité. La lame **supérieure** (bord atrial de la valve), **appelée atrialis**, est composée de fibres élastiques (positionnées de manière radiale (Vesely 1998)) qui facilitent les mouvements de la valve et permettent l'extension et la rétractation des valvules au cours du cycle cardiaque ainsi que la congruence des feuillets mitraux.

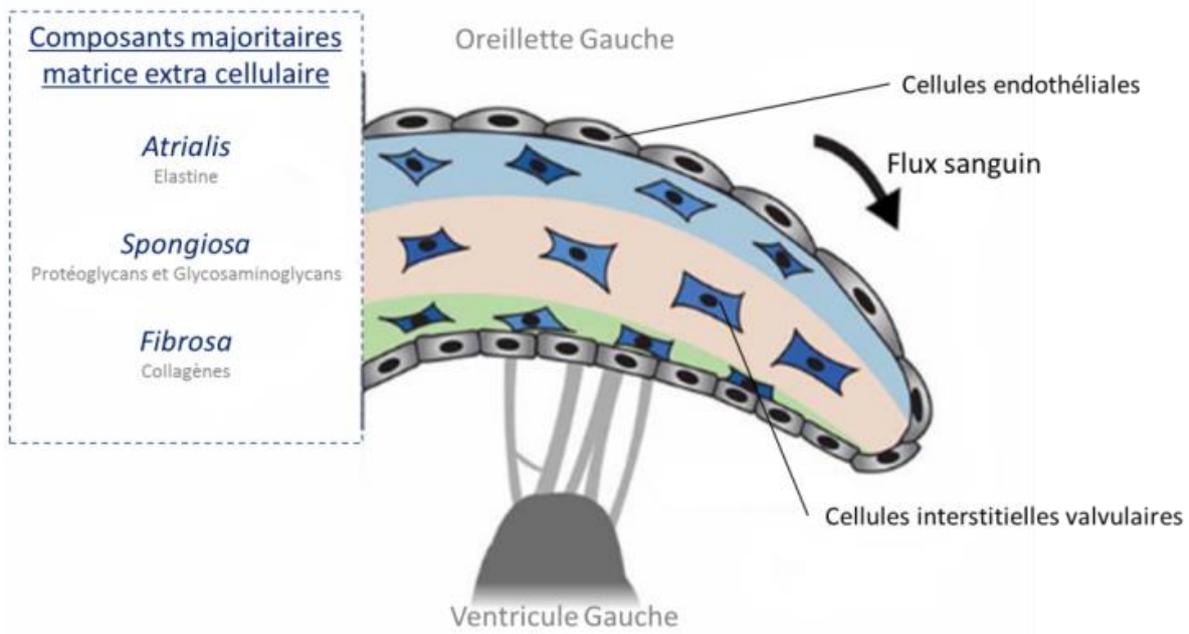


Figure 9: Représentation schématique de l'histologie de la valve mitrale (Matrice extra cellulaire tri lamellaire et cellules valvulaires mitrales).

Issu et modifié à partir de (Bischoff and Aikawa 2011)

Dans le cas de valvulopathies myxomateuses, on observe des anomalies des différents composants du tissu conjonctif avec une forte augmentation du volume de la lame intermédiaire (*spongiosa*) et une forte production ou infiltration de protéoglycans (dans le cas de la maladie de Barlow). L'accumulation de ces protéoglycans conduit à une faiblesse de ces valves en réponse aux contraintes mécaniques. De plus, cette augmentation de protéoglycans pourrait être due à la présence d'un réseau « lâche » de collagène et d'élastine. En effet, la teneur en collagène de type III apparaît augmentée dans les valves dystrophiques (Cole et al. 1984) et ces fibres apparaissent fragmentées sur l'ensemble de la valve, y compris au sein des cordages. Enfin, les fibres élastiques, essentiellement retrouvées dans la couche *atrialis*, semblent impactées lors du processus fibro-myxomateux valvulaire. Il apparaît, de la même manière, que la teneur en fibres élastiques augmente dans les valves dystrophiques et pourrait jouer un rôle dans l'élongation valvulaire retrouvée dans ces valvulopathies dystrophiques.

Ces dérégulations des composants de la matrice extra-cellulaire pourraient donc être à **l'origine** des valvulopathies dégénératives ou **des réponses adaptatives secondaires** à un processus pathologique.

L'équilibre entre synthèse et dégradation de la MEC est conféré par les cellules valvulaires. On distingue les cellules valvulaires **endothéliales et interstitielles (CEVs et CIVs)**. Ces cellules interagissent avec la MEC *via* : -des points focaux d'adhésion impliquant les intégrines, le cytosquelette d'actine et la tensine (Latif et al. 2005), -des complexes matriciels composés de glycosaminoglycans, de laminines et de fibronectine. En effet, lors de lésions valvulaires, les CIVs sécrètent de la fibronectine, ce qui facilite leur migration et leur attachement à la MEC (Fayet, Bendeck, and Gotlieb 2007). Elles sont soumises à un environnement hémodynamique unique (cisaillement, pression et de tension) et la réponse aux contraintes de ces cellules leur est conférée grâce à un réseau d'actine adaptable. Ainsi, les CIVs sont capables d'adapter leurs comportements en fonction de leur environnement (Najma Latif et al. 2005).

La monocouche de **cellules endothéliales valvulaires (CEV)** est continue avec celle qui tapisse les cavités cardiaques (Figure 9). Contrairement aux cellules endothéliales vasculaires, les CEVs s'orientent perpendiculairement aux contraintes mécaniques imposées par le flux sanguin (Butcher et al. 2004) et leur profil transcriptionnel apparaît différent (Butcher et al. 2006). Elles régulent de nombreux processus comme l'**agrégation plaquettaire, l'inflammation et les réponses au stress mécanique** (Butcher and Markwald 2007) (Sacks and Yoganathan 2007). En réponse à des lésions valvulaires, les CEVs ont la particularité de pouvoir se **différencier en cellules mésenchymateuses** et la capacité de « remplacer » les cellules interstitielles de valves *via* un processus de transition épithelio-mésenchymateuse (**EMT**) (Bischoff and Aikawa 2011).

Les **cellules interstitielles valvulaires (CIVs)** sont enchâssées dans les trois couches de matrice extra cellulaire et permettent le maintien de l'intégrité de la valve. Ces cellules comportent des capacités importantes de trans-différenciation et ont été classées en 5 sous phénotypes (Liu and Gotlieb 2007) (Schoen 2008) (Figure 10). On distingue les **CIVs progénitrices endothéliales/mésenchymateuses** qui sont à l'origine du remodelage des coussins valvulaires lors des stades précoces de l'embryogénèse. **Les CIVs progénitrices** qui apparaissent lors de lésions valvulaires sont originaires de la moelle osseuse, de cellules circulantes ou résidentes de la valve (Yoder et al. 2007). **Les CIVs quiescentes** qui ont pour rôle de maintenir la structure fonctionnelle et structurelle de la valve. Ces cellules peuvent devenir des **CIVs activées** en cas de lésions ou de pathologies valvulaires. **Les CIVs ostéoblastiques** subissent une différenciation ostéoblastique et sont capables de synthétiser

des protéines chondrogéniques et ostéogéniques dans un milieu enrichi en phosphate organique (Mohler et al. 2001).

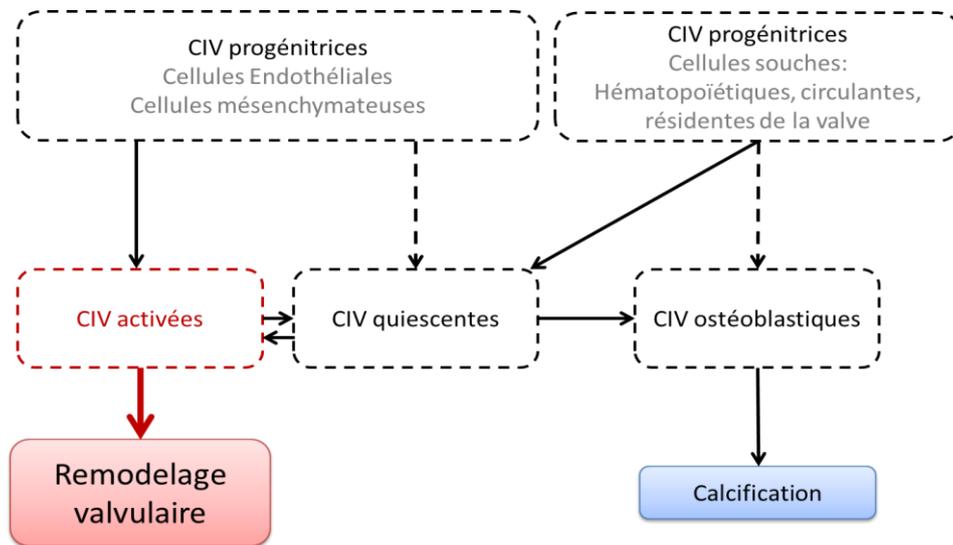


Figure 10: Représentation schématique des différentes populations de cellules interstitielles de valves (CIVs) et leurs fonctions

D'après (Liu and Gotlieb 2007)

Dans le cadre du PVM, les CIVs s'activent et acquièrent des **propriétés myofibroblastiques** caractérisées par l'expression de vimentine et d'actine musculaire lisse α (α -SMA) (Rabkin et al. 2001) (Bischoff and Aikawa 2011). Ces cellules activées génèrent un remodelage de la MEC (Dreger et al. 2002) (Durbin and Gotlieb 2002) (Flanagan et al. 2006). Elles sont capables de sécréter des protéases matricielles (MMPs (1 et 2) et leurs inhibiteurs (TIMP 1 et 2) qui vont influencer sur la **synthèse et la dégradation** des fibres d'**élastine** et de **collagènes** (Rabkin et al. 2001) (Fondard et al. 2005).

De plus, le TGF β a un fort impact sur la différenciation des CIVs. Grâce à l'expression à leurs surfaces de TGF β récepteurs (I et II), une cascade d'activations implique les protéines Smad et ainsi influe sur l'activité transcriptionnelle de facteurs de transcription (FoxH1, c-Fos, Gli-3) et sur la production de matrice extra cellulaire. De plus, ces cascades de signalisation impliquent la voie des MAP Kinases. Ces activations conduisent à une modulation de l'activité proliférative, migratoire et sécrétrice des CIVs (ten Dijke and Hill 2004).

Enfin, il est établi que le phénotype des cellules valvulaires est corrélé aux contraintes mécaniques qu'elles subissent (Merryman et al. 2006). La réponse des CIVs vis-à-vis de ces

contraintes est médiée par les cellules endothéliales. Ces dernières s'organisent de façon perpendiculaire au flux pour limiter son impact et libérer des facteurs tels que le NO ou l'endothéline-1 qui vont limiter l'activation des CIVs (Mebazaa et al. 1993). D'autres travaux ont montré que les CIVs en culture soumises à un stress mécanique expriment l' α -SMA et la vimentine (marqueurs d'activation des CIVs) alors que la co-culture avec des cellules endothéliales diminue l'expression de ces protéines suggérant un rôle régulateur des cellules endothéliales sur l'activation des CIVs (Butcher and Nerem 2006) (Lindsey, Butcher, and Yalcin 2014).

1.5.2 Développement valvulaire et PVM

L'identification et la découverte de nouveaux processus physiopathologiques impliqués dans le PVM passent aussi par une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le **développement valvulaire**. La **valvulogénèse** implique de nombreuses voies de signalisation **coordonnées** qui lors de dysfonctionnements peuvent conduire à des valvulopathies.

Le cœur primitif consiste en un tube cardiaque dérivé du mésoderme antérieur. On distingue deux couches cellulaires concentriques (le myocarde et l'endocarde) séparées par la gelée cardiaque. Ce tube cardiaque va ensuite subir une courbure vers la droite (en S). Suite à cette étape, la gelée cardiaque disparaît, hormis au niveau des segments de jonction (canal atrio-ventriculaire et voie d'éjection) ou des cellules endocardiques vont sécréter une matrice extracellulaire riche en acide hyaluronique. Ces structures, appelées coussins valvulaires, sont à l'origine des valves cardiaques et du septum (Figure 11).

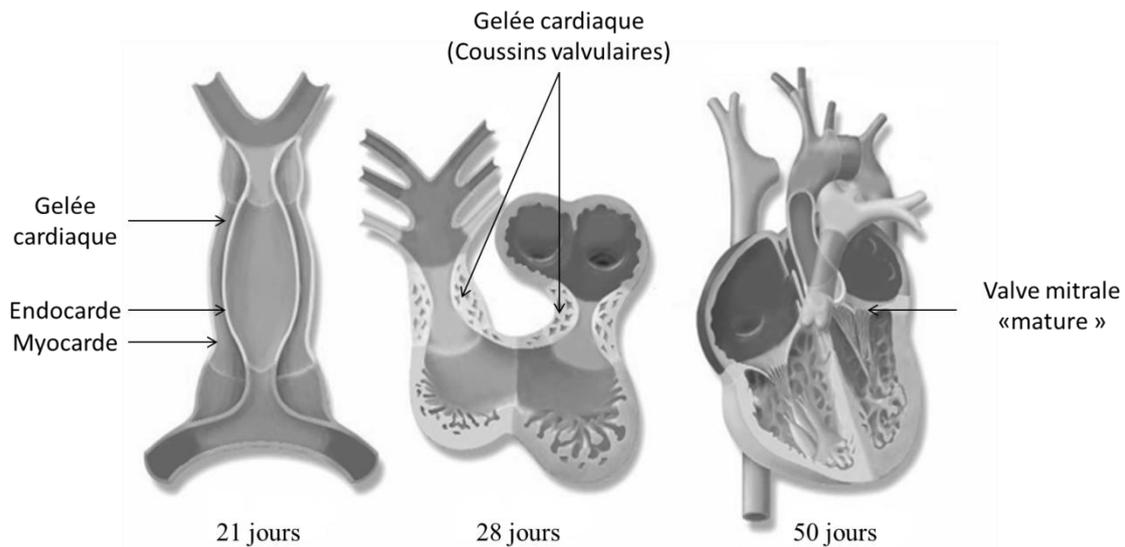


Figure 11: Représentation schématique du développement valvulaire (coupe frontale)

Stade du tube cardiaque 21 jours de développement embryonnaire

Stade durant le cloisonnement cardiaque (présence de bourgeons endocardiques) 28^e jour de développement embryonnaire cardiaque

Stade 50 jours de développement embryonnaire le cloisonnement cardiaque est terminé

Modifié d'après (Lindsey, Butcher, and Yalcin 2014)

Ainsi, une sous population de cellules endocardiques, en regard de cette zone, va perdre sa polarité apico-basale, générer des prolongements (filopodes) et migrer à l'intérieur de la gelée cardiaque (de Vlaming et al. 2012) (Eisenberg and Markwald 1995) (Armstrong and Bischoff 2004). Cette transformation de ces **cellules adhérentes en cellules mésenchymateuses**, capables « d'envahir » les coussins valvulaires, est appelée **transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)** (von Gise and Pu 2012) (Gonzalez and Medici 2014). Ces cellules mésenchymateuses qui expriment la vimentine, la fibronectine et l'actine de muscle lisse α (Kalluri and Weinberg 2009) constitueront les CIVs.

1.5.2.1 La transition épithélio-mésenchymateuse essentielle au développement valvulaire

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules endocardiques est une étape cruciale lors du développement valvulaire et est régulée par un nombre important de voies de signalisation. Je décrirai dans cette partie les voies de signalisation majeures impliquées dans l'EMT. Je détaillerai successivement les mécanismes des **voies du TGF β , la voie de signalisation Notch, du VEGF et la voie Wnt/ β caténines** (Figure 12).

➤ **Implication des “Bone Morphogenetic proteins” (BMP) et des “Transforming Growth Factors” (TGFβs)**

La voie de signalisation « TGFβ » est un régulateurs clef de la transition épithélio-mésenchymateuse. Il existe deux groupes majeurs de la famille du TGFβ impliqués dans cet évènement, les **TGFβ** et les **BMPs**, qui permettent l'EMT grâce à des activations de types **autocrines** (Mercado-Pimentel and Runyan 2007).

Les **Bmps** (2, 4, 5, 6, et 7) ont été montrés comme nécessaires au processus d'EMT du canal atrio-ventriculaire et des voies d'éjections cardiaques. De plus, il a été démontré une forte **redondance** des mécanismes induits par ces acteurs. **Bmp2** est le premier acteur impliqué dans les mécanismes d'EMT. En effet, il permet une spécification géographique de l'EMT au niveau du canal atrio-ventriculaire *via* l'activation du facteur de transcription **Tbx2** (Yamada et al. 2000) (Ma et al. 2005) qui inhibe le programme transcriptionnel myocardique et active le programme d'EMT par l'activation des acteurs nécessaires à l'EMT comme **TGFβ2** (Shirai et al. 2009) (Figure 12).

Ensuite, la voie des **Bmps**, est initiée grâce à la fixation de ces dernières sur des récepteurs spécifiques (**ALK2/3 et BMP2R**), ce qui active la cascade de signalisation des protéines **smads**, spécifique de l'EMT et commune à celle du TGFβ (Figure 12).

La voie du **TGFβ** permet aussi le processus d'EMT. Les **TGFβ1 et 2** ont, comme pour les **Bmps**, des activités redondantes. Les TGFβ induisent l'EMT grâce à des récepteurs **ALK1/5 et TGFBR2** qui vont activer la voie des protéines **Smads**.

La voie de signalisation des protéines **smads**, activée par les récepteurs de la voie du TGFβ, va engendrer l'activation de programmes transcriptionnels spécifiques de l'EMT. En effet, on retrouve les protéines **smads 2/3 et R-smad** couplées à la voie du TGFβ et les protéines **smad 1/5/8** couplées à la voie des **Bmp**. L'activation de ces **smads** va induire une dimérisation avec la protéine **smad4** qui génère l'activité transcriptionnelle de l'EMT. Il a été montré que l'activité transcriptionnelle de **smad4** nécessitait son interaction avec le facteur de transcription cardiaque **GATA4** (Moskowitz et al. 2011). La voie de signalisation **smad** possède des membres inhibiteurs (**smad6/7**) qui permettent un contrôle fin de ce processus d'EMT par un rétrocontrôle négatif naturel.

L'ensemble des mécanismes décrits ci-dessus ont été mis en évidence grâce à de nombreux **modèles murins** et à des expériences **d'explants de canaux atrio-ventriculaires** (décrites

dans la revue de Lencinas et al. 2011, référencées dans la revue de Kruithof et al. 2012. Les modèles d'études murins invalidés, de manière totale ou spécifique, pour les acteurs de la voie TGF β -Bmps-Smads présentent une létalité embryonnaire importante, des dysfonctionnements de formation des coussins valvulaires et des expériences de doubles invalidations permettent de valider l'activité redondante de ces acteurs (Kruithof et al. 2012).

➤ **Implication des voies de signalisation Notch**

La voie Notch, contrairement à la voie du TGF β , nécessite une stimulation par **interaction cellule/cellule**. Les récepteurs transmembranaires Notch (1 à 4) comportent un long segment extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire nécessaire à l'activation des voies de signalisation cibles. Les récepteurs Notch interagissent avec différents ligands **Jagged 1/2 et Delta 1/3/4** qui comportent des motifs DSL (Delta/Serrate/Lag2) exprimés à la surface de cellules adjacentes. L'interaction de Notch avec ses ligands, va induire plusieurs clivages (par les protéases ADAM et par la γ secrétase) du récepteur dont le dernier, par la γ secrétase, va permettre la translocation de la partie intracellulaire du récepteur vers le noyau. Cette partie va interagir avec le facteur de transcription RBPJ κ . Ce complexe recrute le facteur MAML (Master-mind-like) et permet l'activation transcriptionnelle d'un large spectre de gènes cibles impliqués dans l'EMT, comme les gènes TGF β 2 (Timmerman et al. 2004) et snail1 (Luna-Zurita et al. 2010).

➤ **Implication de la voie canonique Wnt/ β -Caténines**

La formation des coussins valvulaires est aussi régulée grâce à la voie **Wnt/ β -Caténine canonique**. Les protéines Wnts, sont des glycoprotéines sécrétées qui se fixent sur les récepteurs Frizzled (Figure 12). Cette fixation induit une cascade de signalisation qui *via* un complexe multi-protéique, active les β -caténines et favorise leur activité transcriptionnelle. L'inhibition de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine induit la formation excessive et désorganisée de coussins valvulaires (Hurlstone et al. 2003). Cette voie a été montrée comme géographiquement restreinte au niveau des régions valvulaires chez des modèles murins et zebrafish (Gitler et al. 2003).

➤ **Implication de la voie de signalisation du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)**

La voie du **VEGF de type A** (en particulier) est un régulateur important dans la régulation de l'activité des cellules endothéliales lors du processus d'EMT et lors de la prolifération cellulaire post-EMT. Les cellules endothéliales sont capables de sécréter du

VEGF-A au niveau des coussins valvulaires. Il a été montré qu'un défaut de VEGF-A au niveau des coussins valvulaires avait des fonctions inhibitrices sur l'EMT endocardique (Dor et al. 2001). D'un autre côté, l'ajout de VEGF-A sur les coussins valvulaires, inhibe aussi le processus d'EMT (Stankunas et al. 2010). La régulation de l'expression de VEGF-A (qui influe sur la voie de transcription Calcineurine-NFATc1 qui régule l'expression de VEGF à son tour) semble être un processus finement régulé lors de l'EMT et permet de le confiner aux seules régions des coussins valvulaires (Chang et al. 2004) (Figure 12).

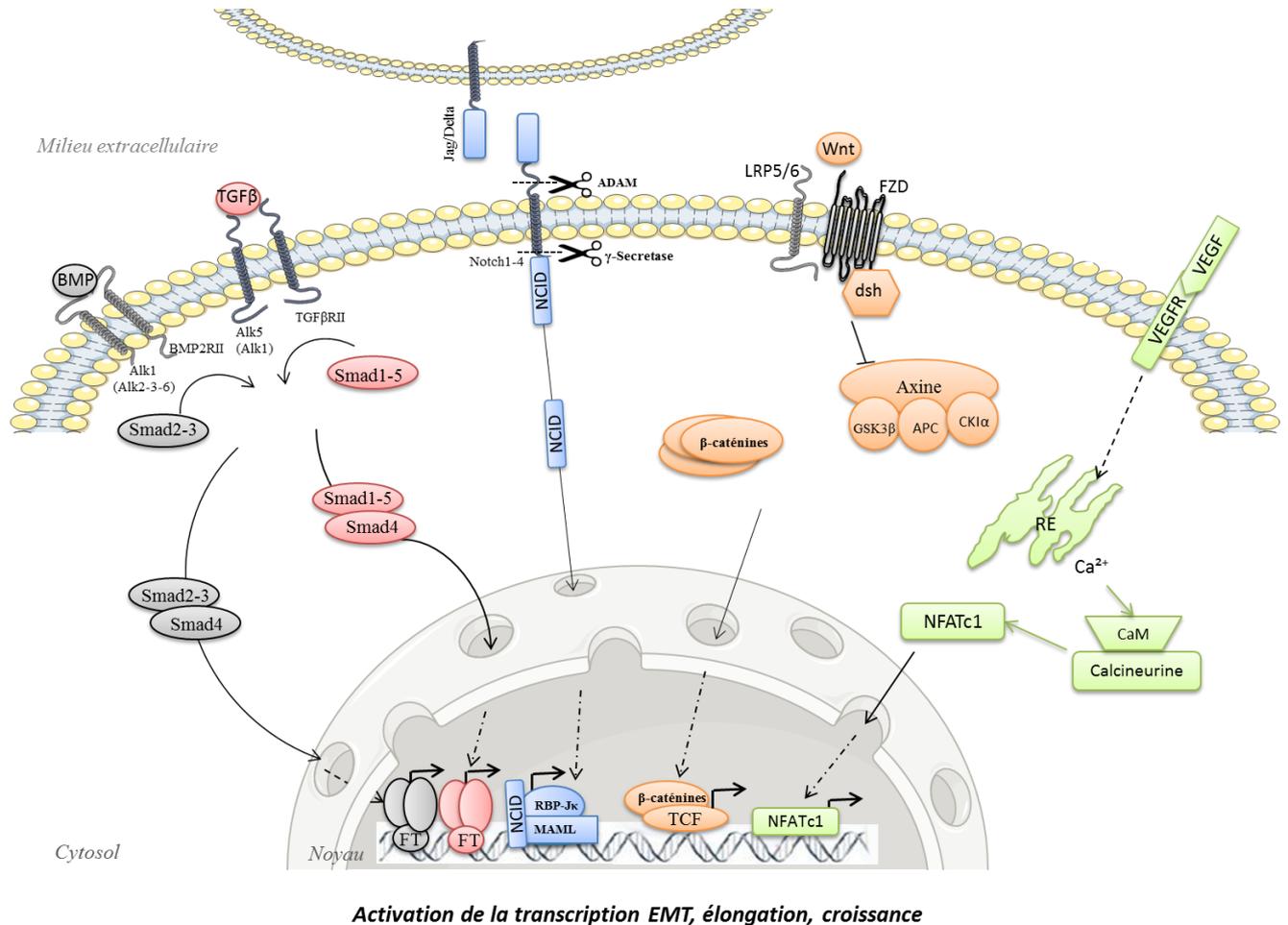


Figure 12: Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse lors de la valvulogénèse

La régulation transcriptionnelle impliquée dans les processus de transition épithélio-mésenchymateuse, d'élongation et de croissance valvulaire est médiée par les voies de signalisation BMPs/TGFβ/smads, Notch, Wnt/βcaténines, VEGF.

D'après (Armstrong and Bischoff 2004) (Malhotra et al. 2011)

En définitive la **transition épithélio-mésenchymateuse des cellules endocardiques** est primordiale dans la formation des coussins valvulaires. Ce processus est médié par de nombreuses voies de signalisation très régulées géographiquement et temporellement afin de confiner ce processus à des localisations spécifiques du cœur (voies d'éjection, canal atrio-ventriculaire, septum) qui formeront les futures valves cardiaques. Il apparaît que l'ensemble de **ces voies régulent l'activité transcriptionnelle** de cellules subissant l'EMT suggérant un réel **changement de phénotypes et de propriétés cellulaires**.

1.5.2.2 Remodelage, maturation et maintenance

Suite à l'étape cruciale de l'EMT dans la valvulogénèse, la voie VEGF/NFATc1 (Figure 13) provoque une forte prolifération polarisée des cellules endocardiques impliquées dans la formation valvulaire : c'est l'étape d'**élongation ou croissance valvulaire** (Chang et al. 2004) (Wu et al. 2011). En plus de leur activité proliférative importante, les cellules mésenchymateuses vont synthétiser de la matrice extra cellulaire sous l'influence du VEGF et de Bmp2. Le **remodelage valvulaire** correspond à l'initiation de la délamination des feuillets valvulaires à partir du myocarde sous-jacent et la transformation du tissu mésenchymateux en tissu fibreux (Figure 13). Cette étape est médiée par les voies de signalisation impliquant le FGF, ptpn11, Wnt/ β caténine et la périostine (Markwald et al. 2010). La transition entre croissance et remodelage est induite par le facteur de transcription NFATc1.

L'étape finale de **délamination**, consiste en un amincissement des feuillets valvulaires et est générée par des phénomènes d'apoptose (de Lange et al. 2004). La valve va ainsi se détacher du myocarde et les structures restant attachées formeront les cordages tendineux.

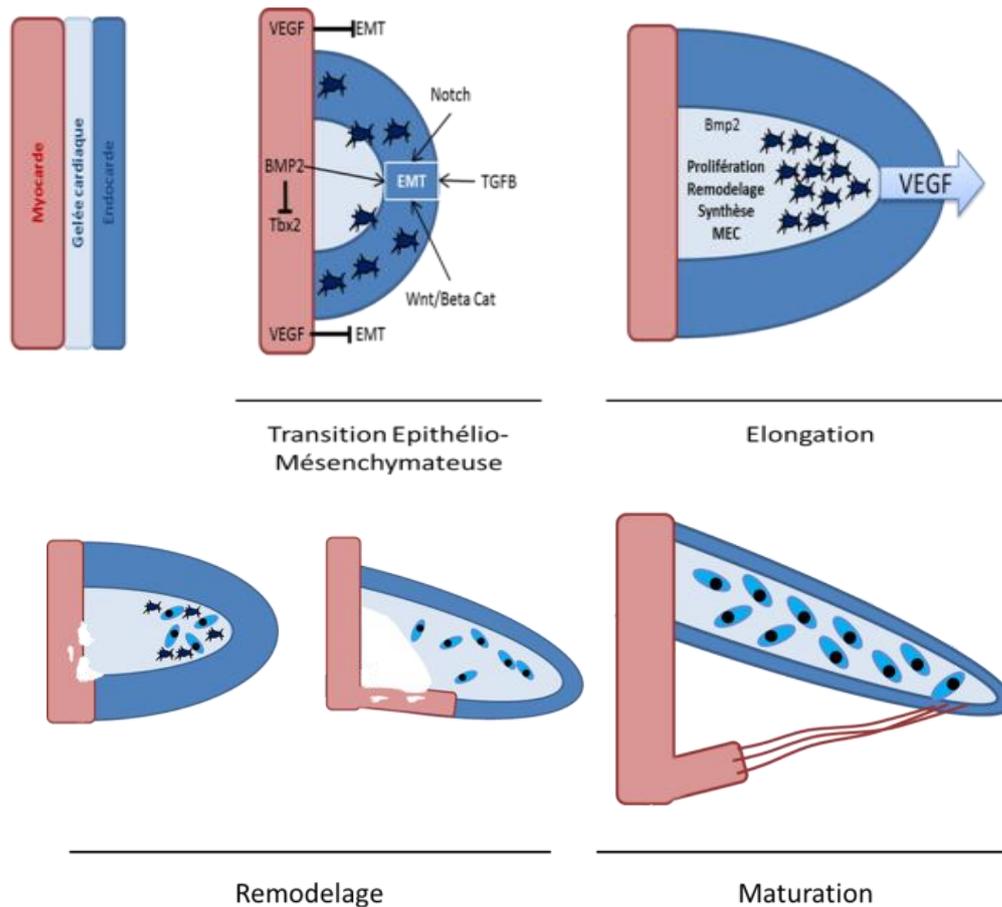


Figure 13: Représentation schématique des étapes du développement valvulaire (Transition Épithélio-Mésenchymateuse, Elongation, Remodelage, Maturation)

D'après (Combs and Yutzey 2009) (Butcher and Markwald 2007) et (MacGrogan et al. 2014)

Il est donc intéressant et **primordial de comprendre tous ces aspects développementaux** des étapes de l'établissement des coussins valvulaires grâce au **processus d'EMT jusqu'à la délamination** qui permet la formation des cordages tendineux valvulaires pour comprendre la physiopathologie des cardiopathies valvulaires congénitales chez l'adulte (R. Levine and Slaughaupt 2007). De plus dans une étude récente, réalisée par une équipe de la Mayo Clinic (SW, Rochester), les auteurs comparent les profils d'expression des cellules valvulaires humaines (11 valves mitrales saines et 11 valves mitrales avec dégénérescence myxoïde). Ils démontrent successivement la surexpression des voies du **TGFβ**, **des Bmps** et **de la voie Wnt/βcaténines** ce qui suggère un **rôle important de ces voies de signalisation lors de processus pathologiques plus tard au cours de la vie de l'individu** (Thalji et al. 2015).

I.4.3 Voies des récepteurs sérotoninergiques

Depuis les années 1960, plusieurs traitements médicamenteux ont été retirés du marché car les patients traités développaient des valvulopathies. Ces traitements sont de différentes natures, on retrouve des antimigraineux (méthysergide et ergotamine), des anorexigènes (fenfluramine, dexfenfluramine), des agonistes dopaminergiques (pergolide, cabergoline) puis plus récemment des antidiabétiques (benfluorex). Ces molécules se sont avérées être à l'origine de valvulopathies par la **stimulation d'un type particulier de récepteurs sérotoninergiques, les récepteurs 5HT_{2B}**. Ces récepteurs sont fortement exprimés au niveau des valves cardiaques et leur activation provoque une prolifération des cellules myo-fibroblastiques valvulaires et une augmentation de la synthèse de collagène et de glycosaminoglycanes *via* l'activation de la voie de signalisation Erk, Src et la voie activée par le TGFβ (Andrejak and Tribouilloy 2013). Ces observations ont été validées grâce à des modèles de rats traités avec des agonistes sérotoninergiques. De plus ces phénotypes induits seraient réversibles grâce à l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs (Droogmans et al. 2009).

I.4.4 Implications moléculaires des gènes identifiés dans les formes syndromiques et non-syndromiques

I.4.4.1 Mécanismes impliqués dans les formes syndromiques « Marfan like » de PVM

A l'origine, le **syndrome de Marfan** a été identifié grâce à la découverte de mutations dans le gène *FBNI* qui code pour la **fibrilline 1** (Dietz et al. 1991). Cette protéine est un composant de la matrice extra cellulaire qui s'organise en microfibrilles et permet une **organisation de la matrice extracellulaire d'élastine**. Les mutations du gène *FBNI* conduisent à des anomalies de structures de la matrice extracellulaire. Ainsi, les premières hypothèses physiopathologiques en rapport avec le PVM retrouvé chez les patients atteints de syndrome de Marfan, se sont concentrées sur les répercussions de ces mutations sur la distribution et l'organisation de la matrice d'élastine. En 1997, il a été montré que les anomalies générées par ces mutations, étaient majoritairement dues à des **défauts d'homéostasie de cette matrice** et que les altérations de l'élastine étaient secondaires à ces défauts (Pereira et al. 1997). Ces observations ont permis d'identifier dans un second temps, que les défauts associés au syndrome de Marfan étaient dus à une **dérégulation de la voie du TGFβ** (Pereira et al. 1999) (Neptune et al. 2003) (Ng et al. 2005) (Kaartinen and Warburton

2003). En effet, l'utilisation d'anticorps anti-TGF β permet de reverser le phénotype des souris invalidées pour le gène *Fbn1* (Neptune et al. 2003).

De plus, l'identification de **syndromes de type « Marfan like »** avec des mutations identifiées dans les gènes impliqués dans les cascades de signalisation du TGF β (Récepteurs du **TGF β de type I et II** (Collod et al. 1994) (Mizuguchi et al. 2004) (Pannu et al. 2005) (Loeys et al. 2005) ainsi que pour les protéines **smad 3 et 4** (van der Linde et al. 2012; Andrabi et al. 2011) présentent des affections proches de celles du syndrome de Marfan.

Au sein de la matrice extra cellulaire, la fibrilline interagit avec un complexe d'interaction avec le TGF β . Lors de défauts de ces micro-fibrilles, ce complexe perd cette interaction avec la matrice et le TGF β va être disponible et interagir avec les récepteurs décrits précédemment (ALK, TGFBR) et activer les **voies de signalisation de remodelage** par l'activation de la transcription de MMPs/TIMPs (Nataatmadja, West, and West 2006) de synthèse d'acide hyaluronique et des voies de l'EMT.

Il est possible que ces mécanismes soient adaptés dans des contextes **physiologiques à des voies de « réparation » de la matrice**. En effet, dans le cas de fortes contraintes mécaniques ou de lésions valvulaires, la tension exercée sur la matrice d'élastine est importante. De par son interaction avec l'élastine et le complexe de liaison au TGF β il pourrait s'agir d'une **régulation physiologique exacerbée** dans le contexte pathologique de syndrome de Marfan. Ces mécanismes suspectés sont en parfaite adéquation avec les hypothèses soulevées par l'approche transcriptionnelle réalisée par l'étude de Thalji *et al* en 2015.

Grâce à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués, de **nouvelles stratégies thérapeutiques** apparaissent. Il a été montré que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de type 1 à l'angiotensine 2 (losartan) permet de réduire la signalisation induite par le TGF β . De plus, les auteurs montrent que les anévrismes aortiques associés à l'augmentation de TGF β (dans un modèle murin) peuvent être prévenus par un traitement au losartan (Habashi et al. 2006). De nombreuses études ont suivi jusqu'au lancement de protocoles cliniques (Groenink et al. 2013; Matt et al. 2008).

1.5.4.2 Mécanismes impliqués dans les formes non-syndromiques de PVM liées aux mutations de la filamine A

Un des gènes décrit dans les formes non-syndromiques de PVM est le gène codant pour la **Filamine A** (*FLNA*) (Kyndt et al. 1998; Kyndt et al. 2007). La filamine A est une protéine de la famille très conservée des filamines (A, B, C) qui interagit avec plus de 70 partenaires intracellulaires (canaux, récepteurs, facteurs de transcriptions etc.) (Nakamura, Stossel, and Hartwig 2011) (Zhou, Borén, and Akyürek 2007). Des mutations de la filamine A ont été associées à de nombreux désordres développementaux neuronaux, vasculaires et du tissu conjonctif (Robertson 2005).

De manière intéressante, les patients présentant des mutations de la filamine A au sein des familles étudiées ne présentent qu'une atteinte valvulaire sans autre phénotype précédemment associé à des mutations de cette dernière.

Cependant, il a été montré que la filamine A jouait un rôle important dans **les voies de signalisation des Bmps et TGF β** et coordonne directement la localisation et l'activation des protéines smads, en particulier smad2, 3 et 5 (Sasaki et al. 2001) (X. Zhou, Borén, and Akyürek 2007). Ainsi, une atteinte potentielle des mécanismes impliqués dans la **transition épithélio-mésenchymateuse** lors du développement valvulaire et des processus adaptatifs à l'âge adulte, pourrait être à l'origine des troubles retrouvés chez ces patients.

Il a été démontré que la filamine A induisait la compaction de la matrice extracellulaire et son assemblage (fibronectine) grâce à l'induction d'une tension sur les fibres de collagène (Pfaff et al. 1998). Cette régulation serait médiée par les voies de la **mécano-transduction** induites par l'intermédiaire de la participation de la filamine A aux points focaux d'adhésion (Pentikäinen and Yläne 2009).

Enfin, lors de l'induction de contraintes mécaniques, les cellules valvulaires réorganisent leur cytosquelette d'actine afin de maintenir leur intégrité et leur adhésion avec la matrice extracellulaire (Yamazaki, Furuike, and Ito 2002). La filamine A, grâce d'une part, à son interaction stabilisatrice avec le cytosquelette d'actine et avec de nombreux partenaires d'autre part, joue un rôle de senseur des contraintes mécaniques endurées par la cellule. Grâce à ce « sensing » mécanique, elle permet une **réorganisation et un remodelage actif du cytosquelette d'actine** (Stossel et al. 2001). Le signal de tension mécanique est médié grâce à l'interaction avec les intégrines, qui constituent le lien entre cytosquelette d'actine et matrice extracellulaire.

Les mutations de la filamine A identifiées dans les familles atteintes de PVM sont retrouvées à proximité de sites d'interaction avec les filaments du cytosquelette d'actine et modifient l'interaction de la filamine A avec ces derniers (Kyndt et al. 2007). En effet, ces mutations sont retrouvées dans la partie N-terminale de la filamine qui lui confère la capacité d'organiser de manière orthogonale le cytosquelette d'actine en trois dimensions (Nakamura, Stossel, and Hartwig 2011). Cette organisation joue un rôle très important dans la **structure, la migration et l'adhésion cellulaire** (Nakamura, Stossel, and Hartwig 2011; Calderwood et al. 2001).

Lors de contraintes mécaniques, on observe un recrutement de la filamine aux points focaux d'adhésion où elle joue un rôle stabilisateur des filaments d'actine. Ces fonctions sont établies grâce à l'interaction de la filamine avec un de ses partenaires, FilGAP.

FilGAP (pour Filamin associated GTPase-Activating Protein) est un membre des protéines GAP. Ces protéines ont des activités inhibitrices des protéines de la famille des Rho GTPases impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine. FilGAP, codé par le gène **ARHGAP24**, est une protéine GAP spécifique de Rac1. Lorsqu'il est activé FilGAP diminue l'activité de Rac1 et **ainsi influe négativement sur la polymérisation du cytosquelette d'actine** impliqué dans de nombreux processus migratoires, adhésifs etc.

En absence de contraintes mécaniques, FilGAP se lie à la filamine A et régule négativement l'activité de Rac1. Lors de contraintes mécaniques, le réseau d'actine est déformé et cette déformation va induire une **dissociation du complexe Filamine A-FilGAP** (Ehrlicher et al. 2011). FilGAP ainsi libéré va démasquer les sites d'interaction des intégrines avec la filamine A (MacPherson and Fagerholm 2010) (Ehrlicher et al. 2011). La cellule restructure ainsi son cytosquelette et lève l'inhibition de polymérisation d'actine (Figure 14).

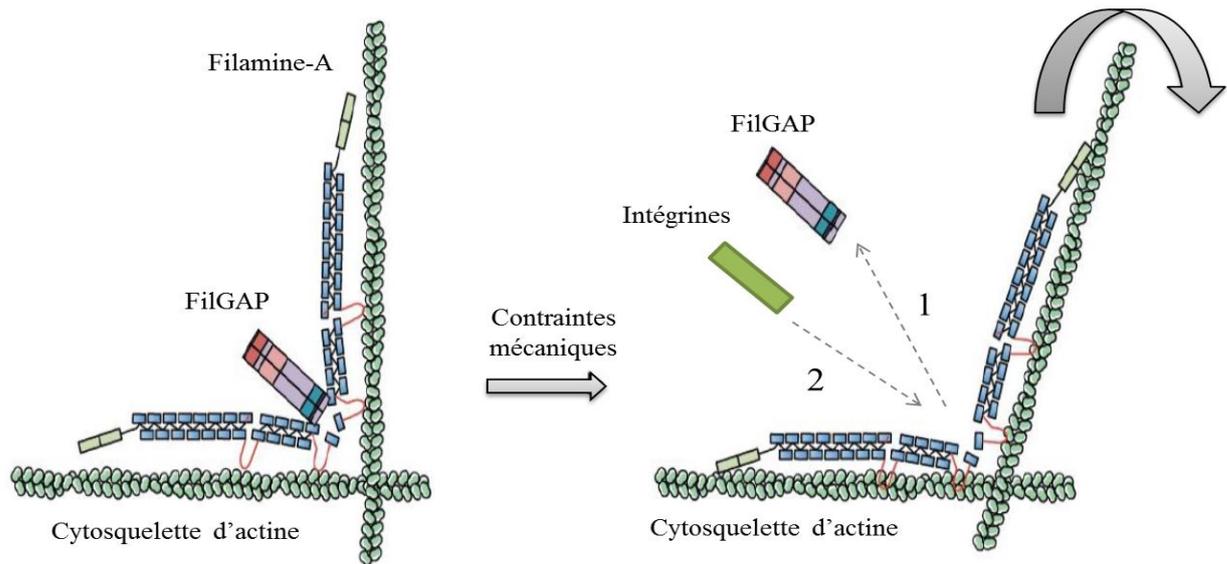


Figure 14: Représentation des mécanismes de modulation de la réponse cellulaire aux contraintes mécaniques

D'après (Ehrlicher et al. 2011)

Une étude menée au laboratoire a permis de démontrer récemment que les mutations du gène *FLNA* identifiées au sein des familles de patients atteints de PVM, altèrent la **balance de l'activité des GTPases RhoA et Rac1** et que cette dérégulation influait sur le remodelage du cytosquelette d'actine (Duval et al. 2014). De plus, cette étude avance des arguments en faveur de l'implication de FilGAP dans les mécanismes de régulation des GTPases par la filamine A dans la physiopathologie du PVM (Figure 14).

1.5.4.3 Mécanismes impliqués dans les formes de PVM liées aux mutations du gène *DCHSI*

Le gène *DCHSI* code pour la protéine Dachsous qui est une protéine transmembranaire de la famille des **protocadhérines** impliquée dans l'adhésion cellulaire. Elle comporte 27 domaines cadhérines répétés dans sa partie N-terminale et un domaine intracytoplasmique (Tanoue and Takeichi 2005; Cappello et al. 2013). Dans un premier temps la protéine Dachsous a été étudiée dans le cadre de défaut de développement cérébral. Des mutations homozygotes ont été identifiées chez 4 patients de 3 familles consanguines atteintes du syndrome de Van Maldergem (OMIM #601390). Les patients atteints présentent des anomalies de développement multi-organes (hétérotopie nodulaire périventriculaire, déficience intellectuelle, surdité, hypoplasie rénale, anomalies de la trachée, dysplasie

squelettique). Deux des patients identifiés possèdent des mutations tronquantes de la protéine dachsous (Cappello et al. 2013).

Dans l'étude récente sur l'implication du **gène *DCHS1* dans le PVM** (Durst et al. 2015), les auteurs montrent dans un premier temps que la diminution de l'expression d'un des gènes orthologues de *DCHS1* (*dachsous 1b*) chez le **zebrafish** induit des **défauts de « looping » cardiaque**, de constriction atrio-ventriculaire et des **régurgitations sanguines atrio-ventriculaires**. De plus, ils démontrent que la réexpression de formes mutées de *DCHS1* ne permet pas de restaurer le phénotype sauvage contrairement à la réexpression de la forme native de Dachsous1-WT.

Ensuite, cette étude démontre que le temps de demi-vie des protéines mutées est inférieur à celle des protéines sauvages.

Les **souris *knock-out Dchs1*** présentent une forte létalité embryonnaire et des défauts majeurs de développement dans de multiples organes (Mao et al. 2011). Cependant les souris invalidées de manière hétérozygote ne présentent pas de défauts de développement majeurs à l'exception d'un **allongement excessif de la valvule mitrale postérieure** qui change ainsi l'emplacement du point de coaptation des deux valvules comme identifié chez les patients de la famille initiale. De plus, les valvules apparaissent épaissies avec des infiltrats fibromyxomateux avec accumulation de protéoglycans. Au niveau cellulaire une augmentation des **propriétés migratoires** est observée, en particulier pour les cellules dérivées de l'épicarde.

Les mutations dans le gène *DCHS1* impliquent des défauts de développement valvulaire, cependant, l'apparition de PVM chez les patients mutés (*DCHS1*) est dépendante de l'âge. Il conviendra par la suite de comprendre les mécanismes impliqués lors du développement susceptibles d'influer sur la pathologie de l'adulte et de comprendre la réactivation potentielle de **mécanismes développementaux à l'âge adulte**.

1.5.4.4 Mécanismes impliqués à partir de l'identification des gènes de susceptibilité *TNS1* et *LMCD1*

A partir de l'identification, par une étude d'association génome entier, de *loci* de susceptibilité et par la priorisation des gènes au sein de ces *loci* (présentés précédemment chapitre I.3.2.2), les auteurs ont démontré successivement l'implication de deux gènes de susceptibilité, *TNS1* et *LMCD1*, dans le cadre du PVM. Premièrement, le gène *TNS1*, situé à 750kB en aval du signal d'association), code pour la tensine 1. **La tensine 1** est un composant

important des **points focaux d'adhésion** et interagit avec le **cytosquelette d'actine** à l'image de la filamine-A (Saintigny et al. 2008). Elle est ainsi impliquée dans les processus de migration, de polarisation, de motilité et d'invasion cellulaire (Qian et al. 2007) (Hall et al. 2009) (I.-H. H. Chen et al. 2013) (H. Chen et al. 2002). La tensine1 est exprimée dans le tissu valvulaire murin embryonnaire et adulte et est précisément localisé au sein des cellules interstitielles et endothéliales valvulaires. Les souris invalidées pour le gène de la tensine présentent des **valvules mitrales postérieures allongées**, une **désorganisation de la matrice** extracellulaire avec une augmentation des infiltrations de protéoglycans. Ces observations ont été renforcées par l'augmentation des régurgitations atrio-ventriculaires chez les zebrafish lors d'une diminution de l'expression du gène orthologue de la tensine1 (Dina et al. 2015).

Le second gène identifié est *LMCD1* qui code pour la protéine « LIM-domain family of zinc finger protein ». Ce gène est fortement exprimé dans le tissu cardiaque et est un **répresseur direct du facteur de transcription Gata6**, impliqué dans le développement cardiaque (Rath et al. 2005). La diminution d'expression de *Lmcd1* dans un modèle de zebrafish induit des régurgitations atrio-ventriculaire et des défauts de « looping » cardiaque (Dina et al. 2015).

- Les **études génétiques** ont permis d'identifier l'implication de gènes dans les formes syndromiques et non-syndromiques de PVM. Ainsi **de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes impliqués ont pu être générées puis évaluées** par l'étude de **modèles animaux pertinents**. Le PVM apparaît comme une **pathologie multifactorielle** et les études génétiques de cette pathologie seront potentiellement la clef vers l'élaboration de **nouvelles stratégies de prise en charge thérapeutiques et de dépistage** (Figure 15).

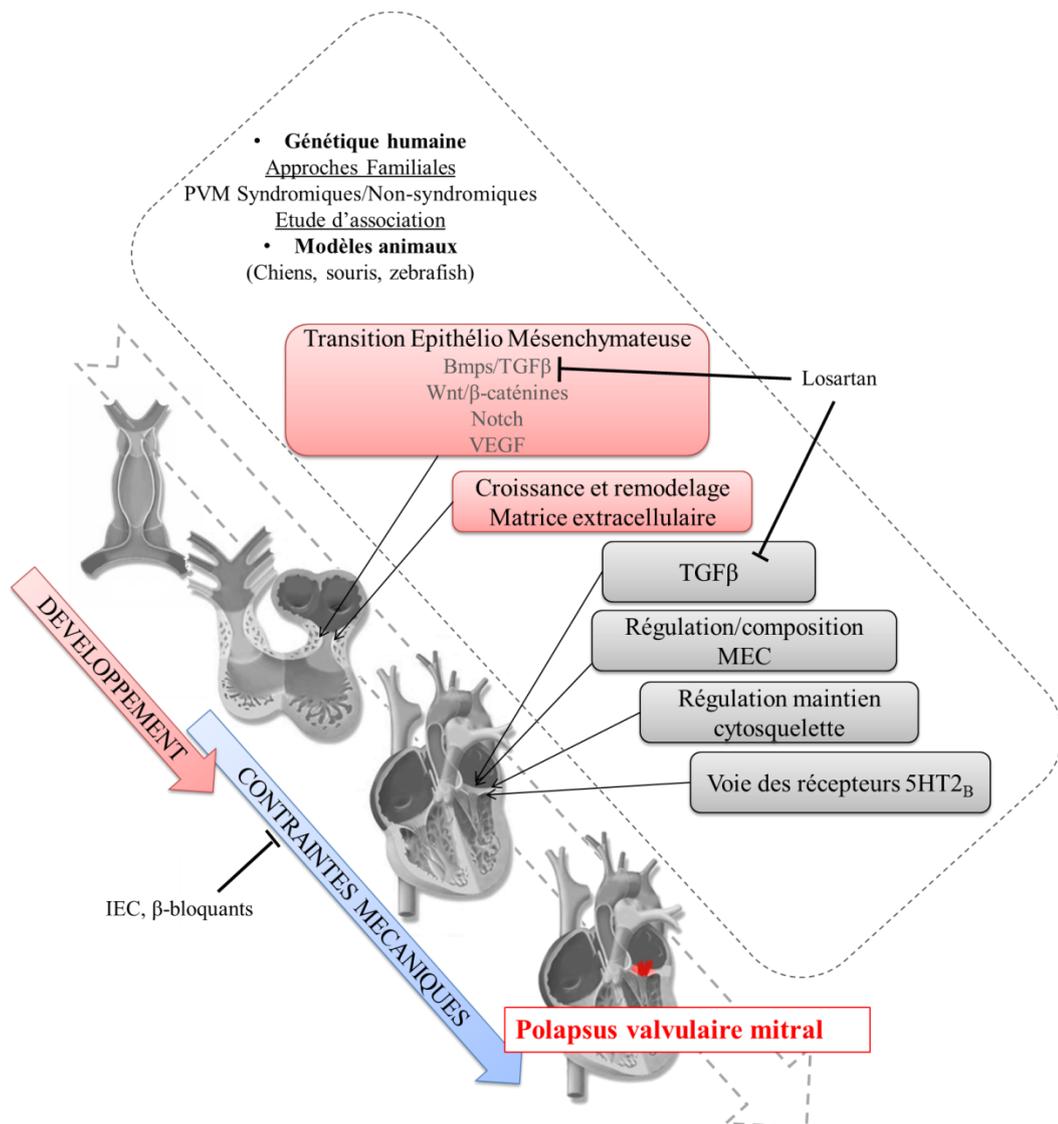


Figure 15: Représentation des mécanismes connus dans le développement du PVM au cours de la vie

Les mécanismes représentés ont été identifiés grâce aux approches génétiques du PVM et à l'étude de modèles cellulaires et animaux.

I.6 Génétique: de Gregor Mendel aux études génome entier

L'étude génétique des pathologies humaines héréditaires s'est fortement développée au cours du XX^e siècle. Cependant, la notion de transmission de caractères héréditaires est identifiée depuis de nombreuses années. Au XVIII^e siècle René Antoine de Réaumur identifie que la polydactylie se transmet de génération en génération selon un caractère dominant. En 1866, Gregor Mendel grâce à ses travaux sur les pois, pose les fondements de la génétique. Les lois qui en découlent décrivent qu'un **caractère héréditaire peut exister sous différentes versions** (allèles), certaines **dominantes et d'autres récessives**. Ces travaux contribuent encore aujourd'hui à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de nombreuses maladies. Au début du XX^e siècle, Thomas Morgan, grâce à ces travaux sur la drosophile, édifie les bases de la théorie chromosomique de l'hérédité.

À partir du développement de la biologie moléculaire et l'identification de l'**ADN** (Acide Désoxyribonucléique) comme molécule **support de l'information génétique** par Avery, Mc Carty et MacLeod en 1944, le but fondamental des études génétiques, a été d'identifier les **séquences d'ADN particulières**, qui déterminent un **trait phénotypique** (pathologique).

Ces études ont pour but de développer les connaissances des mécanismes fonctionnels impliqués dans les pathologies à des fins thérapeutiques préventives et curatives.

I.6.1 Évolution des approches et concepts génétiques

Grâce à la mise au point d'une technologie de séquençage par Frederick Sanger en 1977 puis au développement de la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR pour « polymerase chain reaction ») par Kary Mullis en 1986, le « génie génétique » va permettre un développement important de la connaissance de la structure et de la fonction des gènes.

La recherche de déterminants génétiques responsables de pathologies héréditaires familiales a débuté dans les années 80 par l'étude de la **transmission de marqueurs génétiques** polymorphes au sein de familles (études de liaison). L'identification de marqueurs **polymorphes** de différentes natures [RFLP (pour Restriction Fragment Length Polymorphisms (Botstein et al. 1980)), microsattellites (NIH/CEPH collaborative mapping group 1992), variations nucléotidiques simples (SNP pour « Single Nucleotide Polymorphism »)] a permis de générer des cartes génétiques de plus en plus précises et ont

permis l'identification de nombreuses régions génomiques impliquées dans les maladies héréditaires, cependant il a fallu des années pour arriver à identifier les gènes causaux au sein de ces régions.

Le concept « un gène responsable d'une pathologie » a rapidement été remis en cause. En effet, les **déterminants génétiques** des pathologies apparaissent **multiples** et leur **transmission complexe**. De plus, l'identification de variations génétiques fréquentes comme facteurs de prédisposition à certaines pathologies a modifié considérablement les approches génétiques des pathologies.

Ainsi, trois catégories de variants responsables de pathologies génétiques ont été identifiées. On distingue: -Les variants génétiques **rares**, qui possèdent des **effets forts** (forte pénétrance vis-à-vis de la pathologie), les variants **fréquents** à **effets faibles** (ou modérés) et les variants de fréquence intermédiaire présentant des effets modérés (Figure 16) (Manolio et al. 2009; Tsuji 2010).

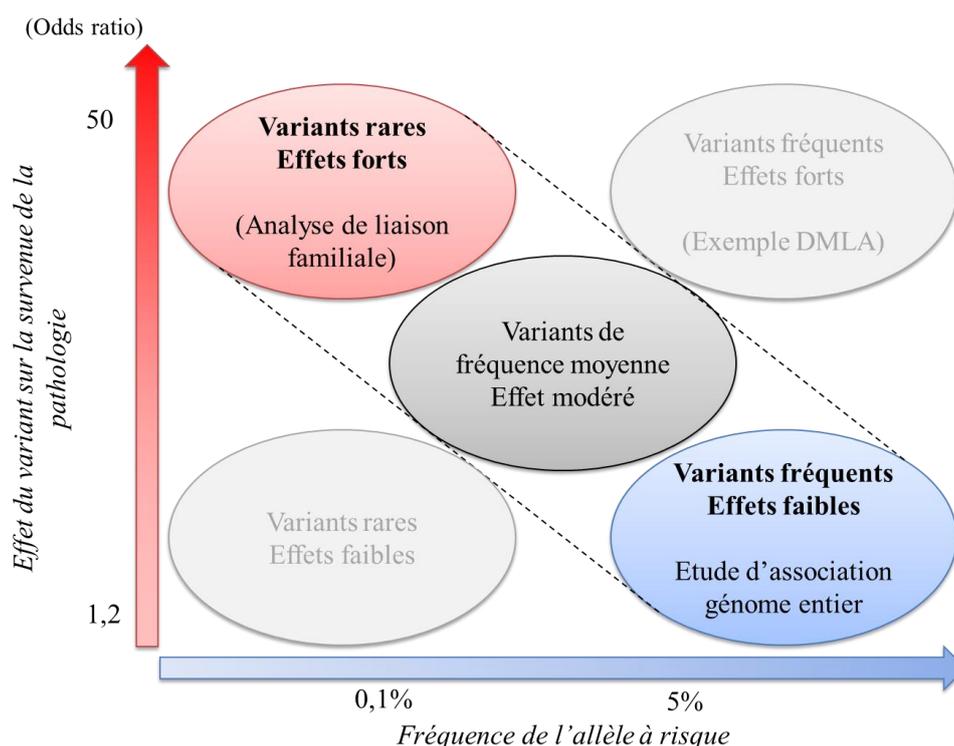


Figure 16: Représentation schématique de l'effet pathogène de variants génétiques (odds ratio) en fonction de la fréquence de l'allèle à risque.

D'après (Manolio et al. 2009)

A partir de l'identification de variations génétiques rares et fréquentes, différentes hypothèses des causes génétiques des pathologies ont vu le jour. Elles décrivent que le spectre de fréquence des allèles à risques est à mettre en rapport avec le spectre de fréquence des pathologies. Ainsi les études génétiques se sont basées sur les théories du « **common-variant/common disease** » and « **rare variant rare disease** » (Reich and Lander 2001). Les approches génétiques utilisées pour identifier ces facteurs génétiques seront différentes en fonction du type de variants recherché et en fonction de la pathologie étudiée.

1.6.2 Les apports du Projet Génome Humain

A partir de l'identification de régions génomiques impliquées dans les pathologies héréditaires par analyse de liaison et clonage positionnel, les méthodes de séquençage développées par Sanger ne permettaient pas un débit suffisant et il fallait des années pour identifier les variants causaux responsables de la pathologie étudiée.

C'est dans ce cadre, que le **Projet Génome Humain (PGH) débute en 1989**. Ce projet, piloté par le National Institute of Health a eu pour but de **séquencer, dans sa totalité** (3 milliards de paires de bases), le **génome humain afin de faciliter le clonage de gènes impliqués dans les pathologies héréditaires et d'évaluer les associations génotypes/phénotypes**. Les ébauches de ce séquençage ont été publiées en 2001 (Lander et al. 2001), puis complétées en 2004 (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). En parallèle, l'américain Craig Venter, de la compagnie privée Celera Genomics, grâce à une approche hautement automatisée et à la méthode dite du « shotgun » obtient, dans le même temps, la séquence brute du génome humain (Venter et al. 2001) (Istrail et al. 2004).

La publication de la **séquence du génome Humain** (par l'Université de Santa Cruz <http://genome.ucsc.edu/>) (Kent et al. 2002; Karolchik et al. 2003) a permis des avancées considérables dans la compréhension des fondements du génome humain mais aussi dans la conception des mécanismes de l'hérédité.

Le PGH a permis d'identifier dans un premier temps que le génome humain n'était constitué « que » d'environ **25 000 gènes** et a permis le **développement de nouvelles technologies de séquençage**. De plus, ce projet a été le point de départ d'autres grands projets de caractérisation des variabilités du génome humain ainsi que le séquençage de génomes d'autres espèces animales (12981 génomes d'espèces différentes séquencées à ce jour (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>)).

Enfin, le PGH a considérablement contribué à l'identification de gènes responsables de pathologies. Actuellement, plus **8000 gènes** sont associés à des traits pathologiques dans la base de données OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man <http://www.omim.org/>), de l'université John Hopkins (Baltimore, Maryland, US).

1.6.3 Développement de nouvelles technologies de séquençage haut débit et leurs applications

Le séquençage capillaire par la méthode de Sanger, a permis d'importantes avancées génétiques dont l'achèvement du séquençage complet du Génome Humain. Cependant, le développement de projets de grande envergure reste limité par des contraintes de débit et de coûts importants. Ainsi au début des années 2000 des **outils de séquençage haut débit** ont été développés (NGS pour *next-generation sequencing*) avec en 2004 la présentation du 454 FLX Pyrosequencer de Roche (Margulies et al. 2005). Plusieurs technologies de nouvelle (2^e) génération de séquençage ont suivi (Solexa 1G Genetic Analyzer Illumina – SOLiD system d'Applied Biosystems – Heliscope d'Helicos BioSciences – PacBIO RS de Pacific BioSciences et Iron Torrent de Life Technologies) (Metzker 2010). Malgré des différences notables de technologies, (respectivement pyroséquençage - séquençage par synthèse – séquençage par ligation ou séquençage en temps réel) elles comportent des étapes communes de **fragmentation et d'amplification**. Ces technologies permettent de séquencer en parallèle des millions de fragments d'ADN en quelques jours et diminuent considérablement le rapport cout/nombre de bases séquencées. Actuellement, le séquenceur le plus utilisée pour les analyses sur le génome humain, est l'HiSeq d'Illumina.

Malgré des coûts de plus en plus faibles de séquençage, le séquençage complet du génome humain reste coûteux et génère des quantités très importantes de données difficiles à analyser et nécessite des capacités de stockage informatiques importantes.

Ainsi des approches de **capture spécifiques de régions ciblées du génome** ont été développées, en particulier la méthode de capture des **régions codantes du génome** afin d'enrichir les données de séquençage de ces régions (C. M. Ng et al. 2005). Cette méthode, appelée **séquençage d'exome**, a permis de réduire les coûts de séquençage et d'augmenter la qualité de séquençage des régions génomiques ciblées.

De plus, une **troisième génération** de séquençage est apparue et permet le séquençage d'une seule molécule d'ADN **sans amplification** préalable. Plusieurs technologies et

méthodes sont à l'œuvre: -la technologie de séquençage par détection des bases successives d'une molécule d'ADN au travers de nanopores (Oxford Nanopore Technologies) –la technologie de séquençage en temps réel impliquant la synthèse du brin d'ADN complémentaire via une ADN polymérase (Pacific Biosciences) et la technologie basée sur des techniques de microscopie (Helicos Biosciences). Ces technologies sont actuellement en cours de développement.

1.6.4 Développement de grandes bases de données publiques et leur rôle dans l'identification de nouveaux gènes

Grâce au séquençage d'un nombre croissant d'individus avec les nouveaux outils de séquençage massif, des projets collaboratifs internationaux ont vu le jour et ont généré un grand nombre d'informations relatives au génome humain afin d'en accroître sa compréhension.

Le génome humain est rapidement apparu hautement polymorphe, ainsi, le projet **international Hap-map** (Haplotype Map), débuté en 2002, a eu pour but de caractériser les variations nucléotidiques simples polymorphiques (SNP) au sein de différentes populations dans l'ensemble du génome. Il étudie, de manière systématique, toutes les variations du génome et permet de cartographier précisément la présence de blocs haplotypiques (International HapMap Consortium. 2004).

Aussi, de nouvelles bases de données ont été développées afin d'estimer de plus en plus précisément la **fréquence des variations génétiques retrouvées**. Parmi cette liste non exhaustive, on retrouve **Exome Variant Server** (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP)) qui référence les variations géniques dans les régions codantes du génome d'individus Nord-Américains (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), le projet **1000 Genomes** (<http://www.1000genomes.org>) qui contient les séquences de génomes complets d'environ 2000 individus actuellement, le projet **UK10K** (porté par le Wellcome Trust Sanger Institute de Cambridge <http://www.uk10k.org/>) comporte des séquences génomiques (4000 individus contrôles) et exoniques de (plus de 6000 patients atteints de pathologies diverses). On retrouve aussi des bases de données comme **dbSNP** (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) qui recense les variations géniques chez l'Homme mais aussi dans d'autres espèces.

Actuellement, la base de données **ExAC (Exome Aggregation Consortium)** du Broad Institute est la base de données **la plus exhaustive**, qui liste l'ensemble des variants retrouvés chez 60 706 individus non apparentés dont l'exome a été séquencé (contient plus de 10 400 000 variants retrouvés (<http://exac.broadinstitute.org/>)). ExAC englobe 17 bases de données (dont Exome Variant Server et 1000 génomes énoncés précédemment).

1.6.5 Variants fréquents et pathologies fréquentes

L'implication de la **combinaison de variants fréquents** impliqués dans la survenue de pathologies fréquentes, est étudiée depuis le milieu des années 2000 grâce au développement de puces à ADN permettant le génotypage d'un grand nombre de variant génétiques et au recrutement de cohortes importantes de patients.

Ces **études d'associations sur génome entier (GWAS)** sont basées sur l'hypothèse que des variants géniques fréquents vont être transmis de génération en génération au sein de « blocs haplotypiques ». Ces hypothèses reposent sur des modèles de génétique de population, sur l'absence de résultats clairement significatifs des analyses de liaison pour les pathologies fréquentes et sur la difficulté d'identifier des variants à effets modeste par analyse de liaison (Chakravarti 1999). Ces études se basent en particulier sur les données du projet HapMap qui confèrent d'importantes informations sur les fréquences des variations génétiques, leur répartition et sur les **groupes de SNPs en déséquilibre de liaison**.

Le génotypage de variants de fréquence connue va permettre de comparer leurs fréquences alléliques dans une **population de cas** (patients non apparentés ayant un trait phénotypique étudié) à une **population contrôle**. Ainsi, les différences de fréquences intergroupes sont comparées statistiquement à l'échelle du génome et permettent d'identifier des **régions d'association du génome avec le trait phénotypique étudié**. L'hypothèse sous-jacente est qu'il existe, au sein de ces régions d'association, des gènes ou éléments régulateurs impliqués dans le développement de la pathologie.

Ces approches sont extrêmement puissantes de par leur étude sur le génome entier et sur de grandes cohortes de patients. Un grand nombre de GWAS sont à ce jour publiées (1960 publications entre 2005 et 2013) et un grand nombre de marqueurs de prédisposition ont pu être identifiés (National Human Genome Research Institute). La Figure 17 représente les associations significatives identifiées dans le cadre de pathologies ou traits cardiovasculaires.

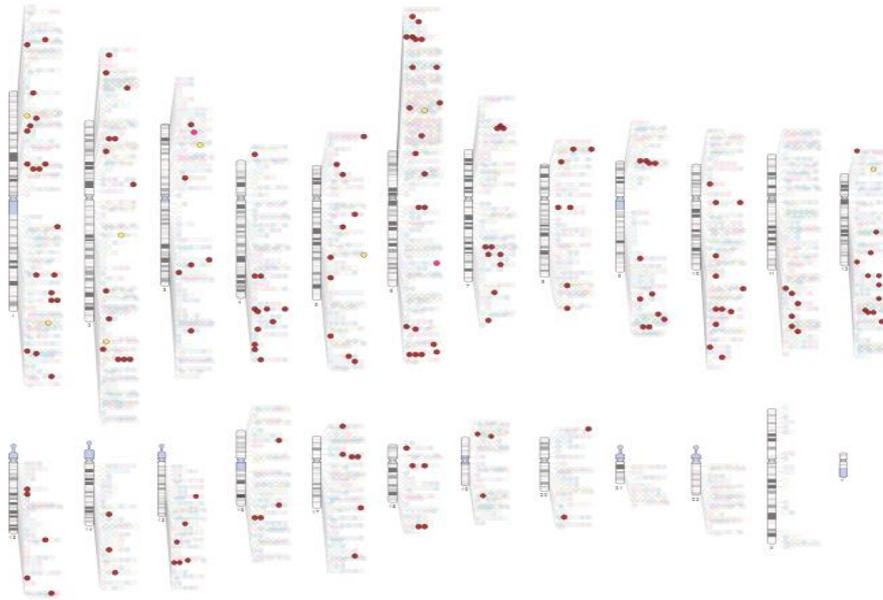


Figure 17: Associations identifiées pour les pathologies cardiovasculaires avec des *p* valeurs significatives ($p \leq 5.10^{-8}$)

D'après <https://www.genome.gov/26525384>

Les « odds ratio » calculés dans le cadre des GWAS correspondent au risque de présenter la pathologie si l'individu est porteur d'un ou plusieurs allèles à risque. Ces « **odds ratio** » sont, à l'échelle de **risques individuels**, relativement **faibles**, (1.2-1.3 par exemples) contrairement aux **variants rares** à **forte pénétrance** responsables de pathologie au sein de familles (Odds ratio très grands).

1.6.6 Limites et perspectives

Dans la majorité des cas **l'identification de variants fréquents associés à des traits phénotypiques présente de faibles effets** sur la survenue de la pathologie et nécessite donc la constitution de cohortes importantes pour déterminer des régions génomiques significativement associées à la pathologie.

Cependant, dans certains rares cas, la **présence de variants fréquents augmente considérablement le risque** de développer la pathologie comme par exemple la DMLA (Dégénérescence maculaire liée à l'âge) (Haines et al. 2005) (Klein et al. 2005) pour laquelle les auteurs identifient que la présence d'un variant fréquent à l'état homozygote augmentait de 7 fois le risque de présenter la pathologie.

Ainsi, l'identification de ces variants fréquents ne permet d'expliquer qu'une **très faible proportion de la transmission héréditaire** établie pour certaines pathologies (« **missing heritability** ») (Maher 2008). Par exemple une étude d'association sur la schizophrénie (ayant une prévalence de 0.5 à 1% dans la population générale) a identifié l'association de plusieurs variants communs en déséquilibre de liaison sur le chromosome 6 avec des odds ratio relativement faibles inférieurs à 1,3 (Shi et al. 2009). Cependant la schizophrénie présente un taux d'héritabilité supérieur à 80% et la présence de ces variants fréquents, présentant des odds ratio faibles, ne peuvent être responsables de cette transmission héréditaire. C'est dans ce contexte que **Maher a décrit le concept d'héritabilité manquante**.

Ainsi de nouveaux concepts génétiques impliquant ces variants fréquents ont été énoncés. Il a été suggéré que la survenue du trait phénotypique associé à la présence de variants fréquents était due à un effet de la présence simultanée des allèles à risque identifiés à l'état homozygote pour plusieurs variant fréquents (on parle **d'effet épistatique**) (Chakravarti 1999).

De plus, Dickson propose un modèle **d'association synthétique**. En effet, il fait l'hypothèse que les variants fréquents associés ne reflètent pas l'effet d'un autre variant fréquent, mais plutôt, celui d'un ensemble de variants rares au sein de régions d'associations (Dickson et al. 2010).

Des études récentes ont démontré l'implication forte de **variants fréquents** sur le développement de **pathologies rares** comme le syndrome de Brugada, la néphropathie membraneuse idiopathique ou l'hypertension artérielle pulmonaire (Bezzina et al. 2013) (Stanescu et al. 2011) (Germain et al. 2013). Ouvrant ainsi un nouveau champ d'investigations « **frequent variant rare disease** ».

De plus, il a été montré dans certaines pathologies que des variants à effet fort identifiés au sein de familles, peuvent présenter des **pénétrances incomplètes** (Probst et al. 2009). Ainsi, plusieurs hypothèses peuvent être avancées concernant l'explication de cette pénétrance variable. Il est possible que les pathologies étudiées soient **polygéniques ou oligogéniques**. La pathologie peut être due à la présence de plusieurs variants génétiques (fréquents et/ou rares) et que leur activité soit synergique. En effet, il est probable qu'un variant fréquent puisse expliquer des variations de l'expressivité du variant causal (rare) et que des déterminants épigénétiques potentiellement modulés par des variants fréquents, soient impliqués dans ces variations. Cependant l'identification de tels modulateurs reste difficile.

L'existence de **variants génétiques de fréquences moyennes** comprises entre 1 et 5% pourrait être à l'origine **d'effets modérés** ayant de la même manière des effets synergiques sur le développement de la pathologie.

Enfin les pathologies héréditaires (même monogéniques) peuvent présenter des modes de **transmissions complexes** au sein de familles avec l'intervention de facteurs modulateurs génétique, **épigénétiques et environnementaux**.

1.6.7 De nouvelles stratégies d'analyses par des approches haut-débit

Les nouvelles technologies de séquençage se sont considérablement développées ces dernières années et ont permis le développement de grandes bases de données publiques qui favorisent la recherche de déterminants génétiques impliqués dans les pathologies fréquentes et rares par de nouvelles approches.

Il est à présent possible de séquencer l'ensemble du génome humain ou l'ensemble des régions codantes du génome (exome) et d'en déterminer les variations vis-à-vis du génome de référence dans des échelles de temps très courtes (une dizaine de jours) (Metzker 2010).

Ces nouvelles approches permettent d'investiguer la présence de variants responsables de pathologies fréquentes héritées au sein de familles, y compris pour des pathologies à pénétrance incomplète.

Le développement de ces nouvelles technologies de séquençage a ouvert un champ plus large d'investigations et permet à présent d'étudier des données : -d'expression génique par le séquençage haut débit d'ARN (RNA-sequencing), -de régulation de la transcription par des approches d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP-seq pour « Chromatin Immuno-Precipitation sequencing ») et de méthylation de l'ADN (Methyl Seq).

Enfin, les qualités de séquençage haut débit obtenues par ces technologies de séquençage permettent actuellement leur utilisation dans le cadre diagnostique clinique et laissent entrevoir des évolutions de prise en charge de plus en plus personnalisées.

Objectifs et projets de thèse

L'approche génétique des formes syndromiques du prolapsus valvulaire mitral a démontré son efficacité dans l'identification de gènes et de mécanismes impliqués dans la physiopathologie du PVM. En particulier, les patients souffrant de syndrome de Marfan, bénéficient et bénéficieront de traitements innovants qui découlent directement de la compréhension de ce syndrome grâce aux approches génétiques.

Cependant, les causes génétiques de l'apparition de formes familiales de PVM non-syndromiques restent méconnues malgré une forte prévalence dans la population générale. En effet, des mutations des gènes *FLNA* et *DCHS1* sont retrouvées dans moins d'un pour cent des cas de PVM.

La recherche de déterminants génétiques responsables de valvulopathies mitrales par l'institut du thorax, a débuté dans les années 1990 à partir de l'identification d'une grande famille d'origine Vendéenne atteinte d'une forme spécifique de PVM liée à l'X. Ces travaux ont permis, quinze ans plus tard, l'identification du premier gène (*FLNA*) responsable de PVM non-syndromique (Kyndt et al., 2007). À partir de ces travaux, un recrutement important de cas familiaux et isolés a permis la constitution d'une grande bio-collection et le développement de collaborations internationales au sein du réseau Leducq transatlantique (« Mitral Valve Disease: From Genetic Mechanisms to Improved Repair »).

Grâce à la constitution de cette bio-collection et au développement des outils de séquençage et de génotypage de nouvelle génération au sein du laboratoire, mon travail a consisté à rechercher de nouveaux gènes morbides au sein de familles et de cas isolés atteints de PVM.

Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la survenue du PVM, nous avons utilisé plusieurs stratégies basées sur l'utilisation des nouvelles technologies de séquençage et de génotypage.

- Dans un premier temps, nous avons conçu un **kit de re-séquençage haut débit** permettant le séquençage de gènes préalablement identifiés dans des formes familiales de PVM non-syndromique (*FLNA* et *DCHS1*) ainsi que des **gènes candidats** impliqués dans les **voies du remodelage du cytosquelette d'actine** et de la **mécano-**

transduction. Ce travail a permis d'identifier des mutations dans le gène *ARHGAP24*, responsables de formes familiales de PVM de type **dégénérescence fibro-élastique** précédemment décrite comme une pathologie acquise. J'ai ainsi étudié les relations génotypes/phénotypes au sein de ces familles puis réalisé les études fonctionnelles de caractérisation des mécanismes cellulaires impliqués (**Projet#1**).

- Dans un second temps, mon travail a consisté à rechercher de **nouveaux gènes morbides à partir de l'étude de 18 familles** atteintes de PVM par une approche de séquençage et de génotypage haut débit (**Projet#2**). Les familles recrutées comportent au moins deux patients atteints.
- Enfin, le recrutement de patients isolés atteints de PVM a permis la constitution d'une **série** importante de patients. Grâce à l'identification de gènes par les approches familiales, nous avons à partir du kit **re-séquençage ciblé** pu estimer l'importance des gènes identifiés au sein d'un plus grand nombre de patients pour **78 gènes** potentiellement impliqués dans le PVM. De plus, une analyse statistique a été réalisée afin d'identifier un **enrichissement en variants rares** dans les gènes cibles au sein de notre série de cas comparée à une population **contrôle** (**Projet#3**).

L'identification de ces gènes, permettra :

- 1- dans un premier temps, une meilleure **compréhension des mécanismes moléculaires et protéiques** impliqués dans la physiopathologie des pathologies valvulaires dégénératives, qui restent méconnues à ce jour,
- 2- l'amélioration de la **caractérisation phénotypique et évolutive** et la mise en place d'un **suivi médical adapté**
- 3- à plus long terme, le **développement potentiel d'outils diagnostiques moléculaires** destinés à personnaliser la prise en charge des patients et la mise en place de **thérapeutiques ciblées** en fonction des gènes potentiels identifiés.

II - RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Projet #1

Des mutations « perte de fonction » du gène ARHGAP24 prédisposent à une forme de Dégénérescence Fibro-Élastique (FED) de Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM)

Le PVM est une pathologie qui affecte environ 2,5% de la population générale et est une cause majeure de chirurgie valvulaire mitrale. Le PVM peut être identifié chez des cas isolés ainsi que dans des cas familiaux d'origine syndromiques, comme dans le syndrome de Marfan, ou dans des formes non syndromiques. Les causes génétiques des formes non-syndromiques sont méconnues. Seuls deux gènes ont été identifiés, avec une transmission liée à l'X d'une part (gène *FLNA*), ou autosomique dominante (gène *DCHS1*) d'autre part. Cependant, ces deux gènes n'expliquent qu'une faible proportion des cas familiaux de PVM.

Les études précédentes menées au laboratoire, suite à l'identification du gène *FLNA*, ont permis d'identifier l'implication des voies du remodelage du cytosquelette d'actine et de la mécano-transduction dans le développement de PVM.

Dans ce contexte, nous avons conçu un kit de re-séquençage haut débit afin de pouvoir séquencer efficacement et à faible coût, un nombre important de patients. Ce kit a permis le séquençage de gènes préalablement identifiés dans des formes familiales de PVM non-syndromique (*FLNA* et *DCHS1*) ainsi que des gènes candidats impliqués dans les voies du remodelage du cytosquelette d'actine et de la mécano-transduction pour 273 patients atteints de PVM dans le but d'identifier de nouveaux gènes responsables de PVM non-syndromique.

Un des gènes candidats, *ARHGAP24*, code pour la protéine FilGAP (pour Filamin-A binding GTPase-Activating Protein) qui est un acteur important de la polymérisation du cytosquelette d'actine par son interaction avec la Filamine A et son activité GTPasique sur Rac1. Nous avons identifié quatre variants rares dans le gène *ARHGAP24* chez quatre cas index. Ces variants (p.Arg95Gln, p.Pro417His, p.Thr481Met et p.Gln671*) co-ségrègent au sein de familles qui présentent une homogénéité phénotypique concordante avec une forme de dégénérescence fibro-élastique (FED) de PVM.

Nous avons montré dans un premier temps, grâce à la collaboration avec le Dr. David Milan du Massachusetts General Hospital, que l'extinction du gène orthologue d'*ARHGAP24* chez le zebrafish conduisait à des régurgitations de la valve atrio-ventriculaire. Par des approches de biologie cellulaire et biochimiques, nous avons montré successivement que les mutations identifiées sont des pertes de fonctions qui influent sur les capacités d'adhésion cellulaires *via* son activité GTPasique. D'une part, la mutation p.Arg95Gln induit une perte d'interaction de FilGAP avec les phospholipides membranaires alors que les mutations p.Pro417His, p.Thr481Met et p.Gln671* induisent une perte d'interaction avec la Filamine-A.

Cette étude identifie le premier gène impliqué dans les formes familiales de Fed de PVM précédemment décrites comme des affections dégénératives liées à l'âge et renforce l'implication des voies de réponse au stress mécanique dans la pathogénèse du PVM. (*Étude en cours de publication*)

A partir de cette étude nous avons obtenu la création d'un modèle murin invalidé pour le gène *ARHGAP24*, développé grâce au projet Phenomin (<http://www.phenomin.fr/>). Le phénotype mitral de ces animaux est actuellement évalué à l'institut clinique de la souris (<http://www.ics-mci.fr/en/departments/phenotyping/cardiovascular-system/>).

Loss of function of *ARHGAP24*/FilGAP predisposes to FibroElastic Deficiency type of mitral valve prolapse.

Damien Duval^{*1,2,3}, Antoine Rimbert^{*1,2,3}, Antoine Jobbe-Duval^{*1,2,3,4}, Nathan Tucker⁵, Nadège Jamin⁶, Florence Kyndt^{1,2,3,4}, Simon Lecointe^{1,2,3,4}, Daniel Trujillano^{7,8,9,10}, Erwan Donal¹¹, Patrick Bruneval¹², Hervé Corbineau¹², Christophe Beaufreton¹⁴, Roger R. Markwald¹⁵, Russel A. Norris¹⁵, Susan Slaughaupt⁵, Robert Levine⁵, Albert Haggège¹², Caroline Cuffé⁴, Pauline Labbé^{1,2,3}, Stephan Ossowski^{7,8,9,10}, Xavier Estivill^{7,8,9,10}, Xavier Jeunemaitre^{12,16,17}, Claire Toquet⁴, Hervé Le Marec^{1,2,3,4}, Vincent Probst^{1,2,3,4}, Jean-Christian Roussel⁴, Richard Redon^{1,2,3,4}, David Milan⁵, Thierry Le Tourneau^{§,1,2,3,4}, Jean-Jacques Schott^{§,1,2,3,4} and Jean Merot^{§,1,2,3}.

1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 1087, l'institut du thorax, Nantes, France

2) Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6291, l'institut du thorax, Nantes, France

3) Université de Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France

4) Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France

5) Noninvasive Cardiac Laboratory, Department of Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114, USA.

6) CEA, iBiTecS/I2BC Unité Mixte de Recherche 9198, 91191 Gif-sur Yvette Cedex, FRANCE.

7) Genetic Causes of Disease Group, Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain

8) Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Catalonia, Spain

9) Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Catalonia, Spain

10) CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Catalonia, Spain

11) Cardiologie et CIC-IT 804 - CHU Rennes & LTSI INSERM 1099 Université Rennes-1 FRANCE.

12) AP-HP, Department Cardiology, Hopital Européen G Pompidou. Paris, FRANCE.

13) Cardiology and Cardiac Surgery Departments, Hôpital Pontchaillou, Rennes, FRANCE.

14) Cardiac Surgery Department, CHU d'Angers, Angers, FRANCE.

15) Department of Regenerative Medicine and Cell Biology, Cardiovascular Developmental Biology Center, Children's Research Institute, Medical University of South Carolina, 171 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425, USA.

16) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 970 Paris Cardiovascular Research Center, Paris, FRANCE

17) Paris Descartes University, PRES Paris Sorbonne, Paris, FRANCE

*: D. D, A. R and A.J-D equally contributed to this work.

§: Equally contributed as senior authors

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Corresponding author:

Dr Merot Jean, Institut du Thorax. INSERM UMR1087, CNRS UMR 6291 ; 8 Quai Moncousu.

44007 Nantes Cedex. France. Phone: +33 (0)2.28.08.01.64; Email: jean.merot@univ-nantes.fr

Abstract.

Rationale, objectives. Mitral valve prolapse (MVP) is a common heritable disorder characterized by systolic displacement of mitral leaflets into the left atrium. Although MVP constitutes a major source of morbidity and mortality the genetic bases remain scarce. We have developed a custom kit to capture and sequence the coding regions of key genes involved in mechano-transduction as well as in previously reported MVP-susceptibility genes to screen 272 MVP index cases and functionally investigated rare functional variants.

Findings. We identified rare *ARHGAP24* mutations in four probands. Among these, we further investigated *ARHGAP24* R95Q, P417H, T481M and Q671* variants. Familial segregation and comprehensive echographic exploration revealed an inheritable homogeneous clinical portrait featuring fibroelastic deficiency type of MVP with localized lengthening and thickening of the medial portion of the posterior leaflet associated to chordal rupture. Consistent with a role of FilGAP in valvulogenesis, *ARHGAP24* orthologue extinction in zebrafish determined atrioventricular regurgitation. Biochemical, molecular structure prediction and functional analysis revealed loss of function mutations affecting FilGAP interaction with phosphoinositide and FlnA.

Conclusions. The identification of loss of function mutations in *ARHGAP24*-FilGAP further reinforces the pivotal role of mechanotransduction pathways in the pathogenesis of MVP.

Introduction.

Mitral valve prolapse (MVP) is one of the most common life-threatening cardiovascular disorders that requires surgical treatment and affects nearly 2-2.5% of the population world-wide (1-3). MVP is frequently associated with moderate or severe regurgitation the prevalence of which increases with age and was estimated to affect 2.0–2.5 million people in the USA in 2000—a number expected to almost double by 2030 because of population ageing and growth (3). The dysfunction of the mitral valve (MV) results from an inappropriate apposition of valve leaflets which contributes to Mitral blood Regurgitation (MR) and cardiac insufficiency (4, 5). The most common form of MVP is the Barlow disease (BD) characterized by an early onset of the disease, the protruding into the atrium of both anterior and posterior leaflets which exhibit increased thickness with diffuse excess connective tissue and, an enlarged mitral annulus. In contrast to BD, fibroelastic deficiency (FED) displays late onset, focal prolapse of the posterior leaflet, limited thickening of the leaflet and normal mitral annulus. Also, in contrast with Barlow patients, FED patients are usually asymptomatic and remain undetected until they develop severe MR after chordal rupture (6-8). No matter the MVP type is, limited pharmacological treatments are available and open heart surgery (MV replacement or repair), and more recently the trans-catheter valve implantation, are the only treatments available. However, abnormal valve biology persists, the possibility of tissue failure remains and percutaneous MVP repair remains challenging. It is thus urgent to identify new potential therapeutic targets and alternatives. Despite the deleterious role of mitral valve dystrophy in MVP and the important prognostic impact of MR on survival, little is known about the molecular and cellular determinants of leaflet length and structure. This highlights the need to explore the development, the dynamic nature of valves and their plasticity, deriving clues from diseases like MVP in which leaflet size figures prominently.

MVP has long been considered as an ageing/degenerative disease until recent molecular genetics identified disease-causing mutations in developmental pathway genes. Indeed, developmental defects leading to abnormal valve structure and function occur in several syndromic

connective tissue diseases with identified genetic bases. (e.g Noonan, Ehlers-Danlos, Loeys-Dietz and Marfan syndromes) (9-12). New insight in Marfan syndrome pathophysiology, suggest that noncanonical TGF β signaling pathway dysregulation drives aortic and valvular disorders and that angiotensin-receptor blocker (Losartan), could potentially block progression of the disease by inhibiting this signaling cascade although beta-blockers treatment remains the recommended therapy (13-17). Nevertheless, genetic basis for non-syndromic MVP remain sparse (3, 6, 7, 12, 18).

In 2007, we identified the F-actin network gene *FLNA* (Filamin A, FlnA) as the first gene responsible for non-syndromic familial MVP in a large family suffering X-linked myxomatous mitral dystrophy that shares many features with Barlow disease (BD)(19-21). Very recently, a second gene (*DCSH1*, Dachshous), involved in mechanical control of morphogenesis, was associated to MVP (Durst R et al, *Nature in press*) whereas GWAS approach identified the focal adhesion associated protein Tensin (*TNSI*) as a MVP-susceptibility gene (Dina C et al, *Nature Genetics in press*). Considering the well-established link between actin cytoskeleton and cellular mechanical stress response pathway and, the intense mechanical and hemodynamic stresses the cardiac valves endure throughout lifetime we hypothesized that actin cytoskeleton remodeling and homeostasis, are key factors in MVP pathogenesis.

In this study, we have applied targeted sequencing on *FLNA* and *DCSH1* previously linked to non-syndromic MVP, major genes for syndromic MVP (Marfan Syndrome) as well as genes involved in proper cytoskeleton and mechanotransduction signaling in 272 MVP index cases in order to identify new MVP genes.

Based on familial investigation opportunity, its key role in mechanotransduction and our previous studies linking it to MVP, we focused on *ARHGAP24* encoding the Rac1 specific GTPase activating protein FilGAP (22-25). We identified in four probands 4 rare mutations encoding three amino acid substitutions in FilGAP protein (R95Q, P417H, T481M) and one nonsense mutation resulting in truncated FilGAP (Q671*). Familial recruitment of the relatives of the FilGAP-T481M

carriers unraveled a very homogeneous and specific echocardiographic and histologic phenotype consistent with FED-MVP that was also shared by FilGAP-R95Q and P417H carriers. Using biochemical, molecular structure prediction, functional approaches and in vivo zebrafish animal model we showed that these three mutations are loss of function mutations and we unraveled the different molecular mechanisms involved.

Results.

Prevalence of rare variants in MVP index cases

The 272 patients included in this study were sequenced and produced a mean of $2\,565\,522 \pm 787\,367$ reads for each sample and resulted in a mean coverage depth of 281 ± 87 with 95% of the targeted regions covered at least 10 times. Mapping, calling and filtering steps are detailed in the methods section. Variants were considered for further investigation if: 1- their minor allele frequency (MAF) was lower than 1% in European non-Finnish populations (ExAc database), 2- they resulted in altered protein sequence or splicing, 3- they localized to functional regions of FilGAP and 4- they altered a highly conserved residue between species. Seven rare heterozygous missense or nonsense variants in FilGAP isoform1 NM_001025616 were identified (Supplemental Table 1 and Supplemental Fig S1-3). *ARHGAP24*-G67E and R95Q were located in the PH domain and C374Y, P417H and T481M in the “spacer region” containing the regulatory ROCK phosphorylation sites while Q671* suppresses part of the coil-coiled domain and the FlnA interacting domain (Fig 1A). None of these patients carried *FLNA* or *DCHSI* MVP-associated mutations. Among the 272 MVP cases we also identified 2 unpublished rare *FLNA* variants (FlnA-G844C and A2235G) as well as 18 rare variants in *DCHSI* (*data not shown*). These variants were not further investigated in this current study.

***ARHGAP24* mutations are associated with heritable FED type MVP.**

Extended clinical records and/or further examination of probands and their relatives was possible for patients bearing *ARHGAP24*-R95Q, P417H, T481M and Q671* that were further investigated (Fig 1A). On the other hand, *ARHGAP24* G67E did not segregate in a 3-generation pedigree and was thus not further investigated.

The FilGAP-R95Q patient was a 71 years-old man who was referred to surgery for severe mitral regurgitation (MR) with a flail leaflet related to multiple chordal ruptures in the middle part of the

posterior leaflet (P2 according to Carpentier classification). This posterior leaflet scallop was thickened and elongated and resected during surgery. Macroscopic examination by the surgeon was compatible with FED and revealed that besides the elongation and modest thickening of P2 scallop, the rest of the valve was roughly of normal appearance, thin and translucent. The relatives of this patient could not be recruited for a familial analysis.

The patient bearing FilGAP-P417H mutation was a 31 years-old woman (Family “1”, III:2, Fig 1B). The MVP was detected upon routine medical examination. Her posterior mitral leaflet exhibited billowing and elongation with mild MR while her anterior leaflet was normal. Her father (II:2) carried the mutation and exhibited similar echocardiographic features (Fig 1C) whereas her five-year old daughter (IV:1) carried the mutation but did not exhibit any obvious mitral valve abnormality.

Familial recruitment was also performed for the FilGAP-T481M mutation (Fig 1B). In this family “2”, the proband (II:4, a 57 years-old man), was referred to surgery for severe MR secondary to a posterior flail leaflet with chordal ruptures. Here again, a prolapsing, moderately thickened and elongated P2 scallop was observed upon surgery while both P1 and P3 scallops and the overall anterior leaflet were of near normal appearance and compatible with FED. Mitral valve repair with quadrangular resection of P2 and mitral annuloplasty was performed. Histological examination showed moderate myxoid infiltration in the spongiosa and fibrosa and collagen fibers disruption was visible in both the fibrosa and the ruptured chordae tendineae of this resected, most diseased P2 segment (Supplemental Fig S3). This patient was re-operated 8 years later for symptomatic, recurrent severe MR, owing to posterior chordal rupture and underwent mechanical valve replacement. Histological examination of the resected and previously operated posterior scallop showed mild myxoid infiltration at the tip of the leaflet while the rest of the valve appeared normal (Fig 1D). His father (I:1, 84 years-old) also carried the mutation and had a typical posterior leaflet prolapse and elongation of the middle scallop with moderate MR. His two sisters (II:7, 67 years-old and II:3, 63 year-old) had a prodromal form of MVP (See Supplemental Methods) with posterior

leaflet billowing, elongation of the middle scallop, and mild central MR. Two of the first generation descendants a 32 and 42 years-old men (III:3 and III:6, respectively) carried the mutation. The mitral leaflets of the youngest (III:3) were of near normal appearance whereas the oldest (III:6) exhibited a prodromal form of the posterior leaflet MVP. Only one child of the third generation carried the mutation (IV:5) and had a normal mitral valve at 14-years old.

Interestingly, a second FilGAP-T481M family was identified. In this family “3” the proband (III:1) included in the haloplex cohort was identified as a FilGAP-T481M mutation carrier. His 39 year old brother (III:2), his aunt (II:1) and one uncle (II:3) also carried the mutation and exhibited FED. On the other hand, his 60 year old uncle (II:6) whose mitral valve was replaced in 1997 for symptomatic MR following chordal rupture did not carry the mutation. Importantly, echocardiographic and direct examination by the surgeon confirmed Barlow disease for this patient (bi-valvular prolapse with thickened anterior and posterior leaflets). Importantly, no common ancestor between the two “T481M”-families was identified by genetic association studies.

Finally, the proband who was referred to surgery and carried FilGAP-Q671* mutation exhibited the typical features of FED-MVP with: posterior leaflet elongation, flail leaflet and severe MR owing to chordal rupture. His 23 years old son also carried the mutation but had a near normal mitral valve apparatus.

The clinical characteristics of the 54 individuals examined by echocardiography (15 mutation carriers and 39 “controls”) are summarized in Table 1. There was no significant difference between the 2 groups with regard to age, gender, body surface area, sinus rhythm, heart rate and blood pressure ($p > 0.05$ for all). One patient with an *ARHGAP24* mutation was in atrial fibrillation. Mitral valve phenotype differed significantly between mutated and control adults (Table 2). Mitral annulus was only moderately enlarged in the mutated population (35.3 ± 4.8 vs $32. \pm 2.6$, $p=0.036$) whereas the middle scallop of the posterior mitral leaflet (PML) was elongated in the mutated population compared with controls (8.4 ± 2.1 versus 6.0 ± 1.2 mm/m², $p=0.0003$). By contrast the anterior leaflet (AML) was not significantly elongated in mutation carriers. Owing to PML

elongation, mutated patients exhibited an anterior displacement of the leaflets coaptation point (see Fig 1D) compared with controls (52 ± 11 versus 66 ± 7 , $P<0.0001$). Importantly, there was no significant difference in leaflet thickness between the 2 groups (PML: 2.8 ± 1.2 vs 2.2 ± 0.5 mm in Control, $p=0.12$, AML: 2.5 ± 0.8 vs 2.1 ± 0.4 mm, $p=0.19$).

At end-systole, the AML was located in the left ventricle but was closer to annulus line in mutated patients than in controls (2.4 ± 1.3 versus 3.4 ± 1.6 mm, $p=0.04$). On average, the PML was located above the mitral annulus line (in the left atrium) at end-systole in mutated patients (-2.4 ± 1.6 versus 3.2 ± 1.9 mm; mm; $p<0.0001$). Among mutated adult patients, 87% (13/15) had an abnormal mitral valve phenotype, 67% had a PML prolapse, 20% a prodromal MVP, and 87% exhibited mitral regurgitation (Table 2). Overall, the phenotype of FilGAP associated MVP is relatively uniform and exhibits all classical features of a FED-type MVP (6) with modest enlargement of mitral annulus, mild leaflet thickening and billowing or prolapse restricted to the diseased posterior scallop, and moderate to severe MR was due to chordal rupture.

Based on these clinical and molecular data, the impacts of the three MVP associated amino acid substitutions on FilGAP function were investigated. In a first step, we determined FilGAP expression profile in human mitral valves. RT-PCR experiments using isoform specific primers showed that FilGAP is indeed expressed in human mitral valves and that, compared to brain, kidney and total heart, the mitral valves expressed the highest proportion of the PH domain containing isoform: FilGAP Isoform1 (Fig 1E and Suppl S1). Immuno-histochemical analysis further revealed FilGAP protein is expressed in both endocardial and interstitial human mitral valve cells (Fig 1F).

FilGAP knock-down perturbs zebrafish valvular development.

To evaluate the role of FilGAP in cardiac valve development, we knocked down the expression of the zebrafish ortholog. The zebrafish model is a widely accepted model of cardiac development with numerous examples of conserved signaling pathways in valvular development (26). We targeted the single ortholog of FilGAP in the zebrafish (ENSDARG00000060175) with an antisense

morpholino oligonucleotide designed to disrupt primary mRNA transcript splicing which achieved significant gene knockdown (Supp Fig S4 A,B). The resulting FilGAP knockdown embryos were morphologically normal with unperturbed body plan and axis (Figure 2A) but exhibited a slight but not significant increase in mortality through the observation period (supplemental Fig S4C). To evaluate valvular development and function, we assayed the percentage of embryos displaying atrioventricular valve regurgitation at 96 hours post fertilization by high speed videography. Interestingly, FilGAP knockdown resulted in a significant increase in the proportion (41/157 26.1%, $p=0.004$) of embryos with atrioventricular valve regurgitation when compared to embryos injected with an equivalent dose of non-targeting morpholino (15/117, 12.8%,) (see Suppl video data), results that were replicated with a second, independent morpholino (30/107, 28.0%, $p=0.0004$). As gross cardiac chamber morphology and looping was unperturbed (Fig 2B, C), together, these data suggest a specific and critical role for FilGAP in the development of the valve.

FED-type MVP-associated FilGAP mutations are « loss of function » mutations.

Previous studies by Otha et al (25) demonstrated that the GTPase activating protein (GAP) property of FilGAP depends on the formation of FilGAP protein dimers thanks to its coil-coiled domain (a.a 649-725) where Q671* mutation sits (Fig 1A). We thus tested the oligomerisation properties of FilGAP-Q671* with FilGAP-WT. As shown in Fig 3A and contrary to FilGAP-WT, the FilGAP-Q671* was unable to interact and co-immunoprecipitate an EFGP-tagged-FilGAP attesting the loss of function of this truncated FilGAP mutant.

We then analyzed the effects of the previously uncharacterized mutations R95Q, P417H and T481M on the GAP activity of FilGAP. WT and mutant FilGAPs were transfected in Hek293 cells and the levels of activated GTP bound Rac1 determined in pull down experiments using GST-PAK1 fusion protein (22). As shown in figure 3B, FilGAP-WT (second lane) significantly decreased the cellular GTP bound Rac1 compared to control pcDNA3-transfected cells (first lane). Conversely, FilGAP-R95Q, P417H and T481M failed to reduce Rac1 GTPase activity and even

slightly increased, although not significantly, Rac1-GTP levels. This suggested that the three mutations are loss of function mutations of FilGAP's GAP activity. This hypothesis was directly tested in another set of pull down experiments using the GST fused to activated Rac1 as a bait (GST-Rac1-Q61L) to specifically isolate active Rac1-GAP regulators including FilGAP (27). These experiments showed the mutant FilGAPs indeed exhibited a 45 to 55% decrease in their ability to interact with active Rac1 (Fig 3C). Together these data indicate that the three mutations affect the GAP activity of FilGAP and its ability to decrease Rac1 GTPase activity.

FilGAP was shown to participate in Rac1 regulation during cellular spreading and adhesion phases (22, 24, 25). Here, we have used the impedance measurement technology of the xCELLigence system to test the effects of the FilGAP mutations on these cellular properties. As illustrated in figure 4A, after seeding the cells on the E-plate and consistent with decreased Rac1 activity and lower spreading capacities, the "cell index" (CI) of cells transfected with wild-type FilGAP rose more slowly and reached a lower steady state (CI_{st}) level than control pcdna3-transfected cells ($dCI/dt = 0.105 \pm 0.016$ vs $dCI/dt = 0.095 \pm 0.009$ and $CI_{st} = 0.230 \pm 0.008$ vs $CI_{st} = 0.186 \pm 0.005$ $n=5$, for pcdna3 and FilGAP-WT transfected cells, respectively). Conversely, siRNA mediated silencing of endogenous FilGAP significantly increased the kinetics and steady state adhesion of the cells ($dCI/dt = 0.188 \pm 0.021$ vs $dCI/dt = 0.105 \pm 0.010$ and $CI_{st} = 0.302 \pm 0.017$ vs $CI_{st} = 0.229 \pm 0.013$, $n=5$ for FilGAP and control siRNA transfected cells, respectively). Consistent with a loss of function effect of the mutations, the CIs of the cells expressing the three FilGAP mutations rose faster and to higher steady state levels than FilGAP-WT transfected cells (Fig 4B). Interestingly, the kinetics (dCI/dt) and CI_{st} of cells transfected with mutant FilGAPs were higher than that of "control" pcdna3 transfected cells, although the differences measured did not reach significance suggesting the transfected mutant FilGAPs are able to associate with and exert a negative effect on endogenous FilGAP (supplemental Table 2). In fact, co-immunoprecipitation experiments using Myc-tagged FilGAP-WT and H-tagged mutant FilGAPs showed the mutations do not affect their capacity to interact with FilGAP-WT and form dimers (Fig 4C).

Together these data show that the three MVP associated FilGAP mutations 1) are loss of function mutations, 2) lead to increased Rac1 activity 3) affect cell adhesion and spreading properties and 4) exert a dominant negative effect on wild-type FilGAP. We then analyzed the potential molecular mechanisms involved.

FilGAP mutations affect its function through different molecular mechanisms.

Based on homology sequence analysis and previous structural and functional studies, different domains have been defined in the FilGAP protein (24, 25, 28). As illustrated in figure 1A, the R95Q mutation is located in the pleckstrin homology (PH) domain of FilGAP (amino acid (aa) 19-125), whereas P417H and T481M mutations reside within the “spacer” region between the GAP activity region (aa 135-329) and the coiled-coil domain that mediates FilGAP protein dimerization (aa 649-725) . The spacer domain harbors the serine and threonine residues that are phosphorylated by activated ROCK kinase downstream of RhoA signaling. This phosphorylation most probably regulates FilGAP localization and interaction with binding partners including filamin A (FlnA) (25). Given these previously established intermolecular interactions and regulatory sites, we analyzed the potential effects of the mutations on FilGAP interaction with membrane phosphoinositides via the PH domain and with the cytoskeletal actin binding protein FlnA.

R95Q mutation suppresses FilGAP-phosphatidylinositides (PIP) interactions.

The binding affinities of PH domains for phosphatidylinositol phosphates depend on the number of specific glycine (Gly) residues they contain. Because FilGAP PH-domain contains only two of these Gly residues it is expected to bind phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (3,4,5PIP₃) with higher affinity than phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (4,5)PIP₂ (29). We used both structural and molecular dynamics predictions and *in vitro* biochemical interaction analysis to test the effect of R95Q mutation on PIP₃/FilGAP interactions.

The predicted structural model of the FilGAP PH domain (aa.19-125) exhibits the typical folding of this family protein domain including a seven-stranded β -barrel capped by a C-terminal α -helix. The four N-terminal anti-parallel β -sheets (β 1-4) stack nearly orthogonally with the three remaining anti-parallel β -sheets (β 5-7) to form a β -sandwich filled with hydrophobic residues. The C-terminal amphipathic α -helix caps the opening of the β -sandwich between β 1 and β 7 strands while the other splayed opening is closed off by loops β 1/ β 2, β 3/ β 4 and β 6/ β 7 where R95 sits (Fig 5A). Molecular dynamics simulations show that the R95Q substitution results in shortening of the β 4 and lengthening of β 5 strands by three residues which lead to a longer β 3/ β 4 and a shorter β 5/ β 6 loop for the R95Q mutant compared to WT-FilGAP, respectively (Fig 5A and supplemental Fig S5). Also, the analysis of root mean square fluctuations (RMSFs) of each amino acid, which highlight the flexibility of the protein, indicated that most of the residues of the β 1/ β 2, β 3/ β 4 and β 5/ β 6 loops are more mobile in the mutant (R95Q) PH domain compared to that of WT-FilGAP. On the contrary, the residues in the β 6/ β 7 loop of the mutant are less mobile than those of the wild-type protein (Supplementary Fig S6). We modeled the interactions between FilGAP and PIP according to the X-ray crystal structure established for the Grp1-PH/(1,3,4,5)PIP₄ complex. We docked the PIP₃ ligand close to residues K28 and R39 of the canonical PIP binding site (K-X_n-(K/R)-X-R) in FilGAP (30). Molecular dynamics simulations showed close proximities of PIP₃ to residues K28 and R39 but also to residues H37, Y50 and K52 of WT-FilGAP (Fig 5B). Importantly, the salt bridge between E86 and R95 maintained the β 6/ β 7 loop close to the 3 stranded β -sheets (β 5-7) allowing the access of PIP₃ to the binding cavity of WT-FilGAP. On the contrary, in the mutant FilGAP, R95Q substitution suppressed the salt bridge with E86 (supplemental Fig S7) and the ligand did not find a stable binding site after its initial positioning in the binding pocket. PIP₃ escaped and remained far from the initial binding pocket during the whole simulation.

This predicted loss of PIP₃/FilGAP interactions was then challenged using a PIP strip binding assay. As shown on Figure 5C, FilGAP-WT strongly binds (3,4,5)PIP₃ and, to a lesser extent, (3,4)PIP₂

but not (4,5)PIP₂ and (3,5)PIP₂. In accordance with structural predictions, when the PIPs strips were incubated with the same amounts of mutant FilGAPs (Fig 5C Western blot, left panel), FilGAP-PIPs interactions were completely abrogated by the R95Q mutation. On the other hand, P417H and T481M mutations had no significant effect (Fig 5C). Together these data show that R95Q mutation impedes FilGAP-PH domain interaction with (3,4,5)PIP₃ and are consistent with the idea that it could affect FilGAP/membrane interaction/stabilisation *in vivo*.

P417H and T481M mutations affect FilGAP/FlnA interactions.

FlnA/FilGAP interactions are critical for the GAP activity of FilGAP toward Rac1 *in vivo* and the very C-terminal region of FilGAP (aa stretch encompassing F726-V734, Fig 1A) was identified as the interface between FilGAP and FlnA immunoglobulin like repeat 23 (Ig23) (25, 28, 31, 32). However, other regions of FilGAP, including the coiled-coil domain, also determine the affinity and the avidity of FlnA/FilGAP complex (31). We have thus analyzed the impact of the mutations on FlnA/FilGAP interactions in co-immunoprecipitation experiments. As shown in figure 6A, endogenous FlnA of Hek293 cells was efficiently co-immunoprecipitated with both WT and FilGAP-R95Q. On the other hand, P417H and T481M mutations significantly reduced the amount of immunoprecipitated FlnA by more than 2-fold, indicating they affect FlnA/FilGAP interactions. Previous studies indicate that FilGAP fulfills its Rac1-GAP activity thanks to its interactions with FlnA which sequesters FilGAP to specific cellular domains (25). Loosening of their interaction could thus increase FilGAP motility. We tested this hypothesis in FRAP experiments using a functional chimeric FilGAP fused to mCherry fluorescent protein expressed in HT1080 cells as well as FlnA knockout HT1080 cells (33) (see supplemental Fig S8 and S9). A typical experiment performed using FilGAP-WT and HT1080 cells is illustrated on figure 6B (left panel). After bleaching 70-80% of mcherry-FilGAP fluorescence, the fluorescence recovered within 25-30 sec ($t_{1/2} = 11.2 \pm 1.0$ sec, n=16) and reached a new steady state level. Accordingly, the non-recovered fraction that represents the immobile fraction of FilGAP typically averaged $24.7 \pm 3.0\%$ (n=14) of

initial fluorescence. Consistent with the data described above, FRAP kinetics and the percentage of recovery of FilGAP-R95Q were indistinguishable from those of FilGAP-WT (Fig 6B right panel and, Suppl Table 3). On the other hand, FilGAP-P417H and T481M mutants recovered significantly faster and in a larger proportion than FilGAP-WT (Fig 6B right panel and histograms, Suppl Table 3). Together, these data are consistent with an increased mobility of P417H and T481M mutants resulting from diminished interaction with FlnA. This hypothesis was further supported by the following: first, FRAP data of P417H and T481M mutants were similar to those obtained when the key valine residue (V734) of FilGAP (31), involved in the FlnA/FilGAP interface and interaction, was mutated to a tyrosine (FilGAP-V734Y) to abrogate FlnA/FilGAP binding (Supplemental Table 3) (31). Second, shRNA-mediated FlnA knock-down leveled the kinetics and the steady state recoveries of FilGAP-WT and all the mutants tested (R95Q, P417H, T481M and V734Y) to values that were faster and higher than those of FlnA-expressing cells, respectively (Fig 7 and Suppl Table 3).

Together, our data indicate that R95Q mutation and P417H, T481M mutations affect FilGAP function through inappropriate membrane sequestration or targeting by two different mechanisms, improper interaction with membrane PIPs and the cytoskeleton organizer FlnA.

Discussion.

Despite a large spectrum of echocardiographic and histological lesions are reported in MVP, two main phenotypes emerge. The Barlow's disease characterized by diffuse myxomatous degeneration of both leaflets and the fibroelastic deficiency (FED) where an isolated segment (usually the posterior middle scallop, P2) of the leaflet prolapses following chordal rupture and exhibits myxoid infiltration while the rest of the leaflets appears normal (6-8). Whereas heritable genetic traits were previously associated to Barlow's disease and X-linked non-syndromic myxomatous degeneration (Durst R et al, *Nature in press*) and (19), no gene were associated to FED-MVP. In the present study, we identified four rare variants in *ARHGAP24* gene in patients exhibiting a very homogeneous and specific echocardiographic signature compatible with FED featuring isolated posterior leaflet (P2) billowing while the anterior leaflet was normal. Importantly and in line with the observed echocardiographic FED features, the normal aspect of the rest of the valve was visually confirmed during surgical valve repairs in three patients. Also consistent with FED, three patients were referred to surgery for important MR following chorda tendinea ruptures and, as expected, myxoid infiltration and disruption of collagen fibers were detected in the surgically excised valve tissues (3, 6, 7, 18). In addition and coherent with the late onset of FED, the youngest mutation carriers did not exhibit mitral valve dysfunction while the oldest presented clear MVP with eventual MR related to chordal rupture supporting the age-related degenerative features of the pathology.

The identification of mutations in FilGAP, a major Filamin-A binding partner previously associated with MVP (19) is consistent with the important hemodynamic forces the cardiac valves endure and the fact that the FlnA-FilGAP complex is a well-recognized actor of cellular mechanical stress response pathway (23, 31, 34). Together these clues point to the mechano-transduction pathway as a critical target in cardiac valvulopathies. Nevertheless, notable differences exist between FlnA and FilGAP associated MVP. FlnA MVP-patients exhibit polyvalvular defects associated with developmental and degenerative myxoid alterations of both anterior and posterior

mitral leaflets as well as the sub-valvular apparatus but no chordal rupture. Such clinical portrait is more reminiscent of Barlow's disease as opposed to FED that we have observed here (*unpublished observations* and (19). It is also worth noting that the restriction of the disorders to the mitral valve in FilGAP-associated MVP mirrors the restricted functional implication of FilGAP in mechano-transduction compared to FlnA. Indeed, FilGAP only targets Rac1 GTPase whereas FlnA stands as a signaling hub, suggesting that dysfunction of additional signaling pathways could be at work in FlnA associated MVP (28, 35-37).

Previous studies by Akilesh and colleagues associated the FilGAP loss of function mutation to focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and familial disease inheritance was established for FilGAP-Q158R mutation (38). Intriguingly, they also identified FilGAP-T481M substitution in cohorts of sporadic FSGS patients suggesting this specific mutation could also determine renal disease. However, in the present study, neither FilGAP-T481M nor R95Q, P417H and Q671* MVP-patients exhibited any sign of renal dysfunction suggesting they do not determine FSGS (not shown). To reconcile this potential discrepancy, it is worth noting that the Q158R mutation targets the catalytic site of FilGAP GAP domain suggesting it might have more drastic functional effects on FilGAP activity compared to the MVP associated mutations. The later may in addition require the mechanical stress conditions experienced by the cardiac valves to fully express their functional deficiency (see below). Unfortunately, the valvular status of the FSGS patients harboring FilGAP-Q158R mutation remained undetermined and further studies will thus be required to clarify the potential link between FilGAP associated FSGS and MVP.

Our functional, biochemical and molecular prediction studies demonstrated R95Q, P417H, T481M and Q671* mutations impede the GAP activity of FilGAP but through different molecular mechanisms. We showed that the R95Q mutation destabilizes the specific intramolecular salt bridge interaction between R95 and E86 residues which stabilizes the β_6/β_7 loop close to the 3 stranded β -sheets (β_5 -7), allowing the access of PIP₃ to the binding cavity of WT-FilGAP PH domain. This structural defect leads to increased flexibility of the PH domain, destabilizes PIP₃/FilGAP

interaction and may impact the membrane localization of FilGAP. Most probably the reduced availability of FilGAP at the plasma membrane, where active Rac1 sits, limits its ability to regulate the GTPase activity. Concerning P417H and T481M mutations, our co-immunoprecipitation experiments demonstrated that they do not hamper FilGAP dimerization (Fig 4C) but affect FlnA/FilGAP interactions. This leads to increased intracellular mobility of FilGAP suggesting its membrane targeting or local availability may also be affected (Frap data in Fig 6B, Suppl Table 3). Because the Q671* mutation is located in *ARHGAP24* last exon, the transcribed mRNA does not undergo nonsense-mediated RNA decay and generates a truncated FilGAP protein, impairing functional FilGAP dimer formation.

How oligomerization incompetence and the weakened FilGAP-PIP and FilGAP-FlnA interactions impact Rac1 regulation in a high mechanical stress context and lead to MVP remains to be elucidated. However, it is worth noting that this also holds for the regulation and the structural basis of “native” FilGAP/FlnA complex that are not completely elucidated yet. In fact, although the binding interfaces on FlnA (Igl-23) and FilGAP (residues 723-736) were unambiguously defined, other factors including the oligomerization state of each partner, phosphorylation status of FilGAP and the application of mechanical stress to the actin network determine the avidity and stability of the complex (23, 31). Consistent with the role of FlnA/FilGAP complex in the protection of cells submitted to mechanical stress, Shifrin et al showed that FilGAP localization changes as it is recruited to sites of force transfer when cells are submitted to mechanical strain (34). One can speculate that the weakened interactions of the mutant FilGAPs with FlnA affects their recruitment to these sites of force transfer and their ability to inhibit Rac1 or to make them accessible to regulatory factors including the RhoA activated kinase ROCK or Arf6 (25, 39). Future studies will be necessary to clarify these points.

Rac1 GTPase and mechanical stress have long been recognized as a key regulator in a wide range of cellular processes including proliferation, differentiation, motility, contraction and apoptosis. In cardiovascular development and homeostasis, Rac1 participates to many intracellular signaling

pathways downstream of G-coupled receptors (GPCRs) notably those involving phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) and many clues indicate that the sculpting of saddle shaped mitral annulus, posterior and anterior scallops as well as the positioning of chordae tendineae anchorage are orchestrated by hemodynamic forces (40-43). Consistent with this notion, Katsumi et al demonstrated that equibiaxial stretch inhibited lamellipodia formation through deactivation of Rac1 and suggested that regulation of GAP activity potentially including FilGAP, most likely mediates the inhibition (44). Also noteworthy, mice deficient in the endothelial Rac1 activator Dock180 exhibit cardiac abnormalities including valve malformations (45). Finally, we showed here that morpholino mediated knockdown of FilGAP in the Zebrafish determined atrio ventricular regurgitation. Together, these data point to the small GTPases and their role in the mechano-transduction pathways as critical actors of valves development and homeostasis.

In conclusion, we identified *ARHGAP24* as the first gene associated with the FED-type MVP. Together with our previous works on *FLNA*, our discovery points to the cellular mechanical stress pathway as a critical determinant of valve development and homeostasis.

Authors Contribution.

DD, AR, AJD, NT, SL, NJ, PB, CT, TLT, JM, PL, SO, XE, DT designed and/or performed the experiments. ED, HC, CB, CC, HLM, JCR, VP, TLT recruited the patients. RRM, RAN, SS, RB, AH, RR, XJ participated to discussion within the Leducq Network and edited the manuscript. DM, TLT, JJS, JM, FK, VP, TLT organized and designed the study and NJ, DM, TLT, JJS, JM wrote the manuscript.

Acknowledgements.

FRAP and TIRF experiments were performed at the core microscopic facility in Nantes; MicroPICell SFR Bonamy and APEX respectively. We thank Laurence Dubreil, Steven Nedellec and Philippe Hulin for their technical expertise and assistance in these microscopic fluorescence experiments. We thank Marie Marrec, Monique Dupas and Guénola Coste for their assistance in patients' recruitment and family screening as well as the biological resource centre for biobanking (CHU Nantes, CRB, BRIF: BB-0033-00040). We are grateful to Stéphanie Bonnaud for her help in Haloplex study. This work was funded by The Leducq Foundation, Transatlantic Mitral Network of Excellence grant 07CVD04 (Paris, France), the Clinical Research Hospital Program (PHRC) from the French Ministry of Health PHRC-I (2012) and the Fédération Française de Cardiologie , (2011) (TLT, JM) (FFC, Paris, France), the Fondation Coeur et Recherche 2014 (TLT). The work at MUSC was performed in a facility constructed with support from the National Institutes of Health, Grant Number C06 RR018823 from the Extramural Research Facilities Program of the National Center for Research Resources. Other funding sources: National Heart Lung and Blood Institute: R01-HL33756 (RRM), COBRE 1P30 GM103342 (RRM, RAN), 8P20 GM103444 (RRM and RAN), R01-HL127692 (RAN); American Heart Association: 11SDG5270006 (RAN); National Science Foundation: EPS-0903795 (RRM); NHLBI K24, HL67434 and HL109506 (RAL).

Materials and Methods.

Study approval.

The study was conducted in compliance with current Good Clinical Practice standards and in accordance with principles set forth under the Declaration of Helsinki (1989). Institutional review board approvals of the study were obtained before the initiation of patient enrollment. Each patient entering the study agreed to and signed an institutional review board-approved statement of informed consent. The present study was conducted according to French guidelines for genetic research and approved by the ethics committee of Nantes University Hospital. Written informed consent was obtained from all participants.

Clinical investigations.

Clinical investigation included a review of medical history and a physical examination, with particular attention given to the cardiovascular system and any connective tissue diseases. The phenotypic assignment of family members was based on echocardiographic examination detailed in Supplemental Methods.

Patient recruitment and DNA extraction

This study was conducted according to French guidelines for clinical and genetic research. Informed written consent was obtained from each patient who agreed to participate in the genetic study. A group of 272 MVP index cases (192 males, 80 females) were recruited. The target re-sequencing custom design based on the HaloPlex™ technology (Agilent), the validation and analysis of the data are detailed in Supplemental Methods.

Custom target re-sequencing design

We developed a target re-sequencing custom design based on the HaloPlex™ technology (Agilent) to perform high-throughput sequencing of the coding regions of genes previously linked to non-syndromic MVP (*DCHS1*, *FLNA*); syndromic MVP genes (*FBN1*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD4*), genes involved in cytoskeleton and mechano-transduction signaling (*ARHGAP24*, *AGAP2*,

DAB2IP, DOCK1, FLNB, GIT2, IQGAP2, PDLIM7, PLXNA1, PTPN13, VAV2, TNS1 and FLNC).

Targeted coding regions (± 10 bp) correspond to 240.21 kb of genomic sequence (29,25kb for described genes). Sequencing was performed on Illumina HiSeq 2500 platform using 100 paired end sequencing.

Detection of rare genetic variants

Raw sequence reads were aligned to the human reference genome (GRCh37) using BWA-MEM (version 0.7.5a) after removing sequences corresponding to Illumina adapters with Cutadapt v1.2. Variants were called for each sample separately using GATK UnifiedGenotyper (version 2.8) and Samtools mpileup (version 0.1.19), and variants were considered for further analyses if found by both GATK and Samtools. Variants were considered as rare if the minor allele frequency (MAF) was lower than 1% in non-Finnish European population using Exome Aggregation Consortium database (Cambridge, MA, *exac.broadinstitute.org*). The potential pathogenicity of variants was determined using Variant Effect Predictor annotations (Ensembl). We considered variants with functional and splice potential consequences. Filtering was performed using an in house developing tool Knime4Bio (46).

Validation (visualisation and Sanger sequencing)

All relevant variants identified in individuals sequenced were manually reviewed by visual inspection of sequence reads using the Integrative Genomics Viewer (47). Secondly, sanger sequencing was performed to validate in-silico data. After amplification by PCR, excess primers were removed from the amplified fragments using exoSAP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and sequenced with a dye-terminator cycle-sequencing system (ABI PRISM 3730, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif). Sequences analyses were performed with Seqscape v2.5.

Reagents.

Polyclonal antibodies for GAPDH (1:10,000); and HRP-conjugated antibodies (1:10 000) were purchased from Santa Cruz. Monoclonal antibodies were purchased from Chemicon (anti-filamin

A, 1:1000), BD Transduction Laboratories (anti-Rac1, 1:500), Sigma – Aldrich and Novus Biological (FilGAP, 1:250), Roche (anti-HA, 1:1000). Total human mitral valve RNAs from a healthy 41 years old man were obtained from AMS Biotechnology. Brain and kidney total RNAs were from Clontech (Human Multiple Tissue cDNA Panels).

RT-PCR

mRNA were reverse transcribed and amplified using the High Capacity cDNA Reverse transcription kits (Applied Biosystems) and amplified by PCR following the manufacturers recommendations. The following forward (F) and reverse (R) isoforms specific *ARHGAP24* primers were used: iso1-F: 5'-CAATGACTCCACGGAGAACC-3'; iso1-R: 5'-TCCCTGGGTCTCTTCATTG-3'; iso2-F: 5'-AAACCGGGTTCAGAACTTCA-3'; iso2-R: 5'-CCCACAGTCAAAGGCATCTT-3'; iso3-F: 5'-TGGGATGGGAGGATACTGAC-3'; iso3-R: 5'-ATATGACTCGGCGGATTGAC-3'; iso4-F: 5'-CTGAAGTGTATGTTTGTGCAAG-3'; For *GAPDH* and *FLNA* we used GAPDH-F: 5'-TTCATTGACCTCAACTACATGGT-3'; GAPDH-R: 5'-CTCAGTGTAGCCCAGGATGCCCTT-3'; FLNA-F: 5'-CAGGCTTGGTGTCTGCTTACG-3'; Primer FLNA-R: 5'-TCCCGCATTGCTCGTGTT-3'.

Cell culture and transfection, Plasmids and siRNA.

Routine Hek293 and HT1080 cell culture and transfection techniques together with FilGAP expression vector and the siRNA used are detailed in Supplementary Methods.

Adhesion and spreading assays.

The impedance measurement technology of the xCELLigence system was used to monitor cell adhesion and spreading as previously described (22, 48). 1×10^4 cells per well were plated into 96-wells E-Plates (Roche Diagnostics, GmbH), placed on the Real Time Cell Analyzer and incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Cell adhesion and spreading were measured and expressed as a *Cell Index* (CI) according to the manufacturer's guidelines. Impedance measurements were taken every 1 min for 3 hours. The slope of CI changes (dCI/dt) were calculated between $t_{30\text{min}}$ and $t_{1\text{h}30\text{min}}$.

Co-immunoprecipitation and immunoblotting.

Cells transfected with FilGAP-HA and other tagged FilGAP (Myc, mCherry, EGFP) were lysed in NETF buffer containing: 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaF, 1 % NP-40, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1X protease inhibitor cocktail (Roche) and lysates clarified by centrifugation (15,000 × g for 15 min at 4°C). The cell lysates (500 µg) were incubated with 6 µg of anti-HA for 2 h at 4°C and then with 30 µl of protein A conjugated beads (Dynabeads, Invitrogen) for 1h at 4°C. The immunoprecipitates were washed four times with NETF buffer and separated by SDS-PAGE transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad Transblot). Immunoblots probed with appropriate antibodies and revealed using enhanced chemiluminescence (ECL) kit (GE Healthcare). Chemiluminescence signals were quantified using an Imager system (Roche Diagnostic) and the data normalized with respect to GAPDH.

Glutathione-S-transferase (GST) protein purification and GST pull-down assays.

GST-PAK1 containing the Cdc42/Rac1 Interactive Binding (Crib) region of p21 activated kinase were produced in B121 E.Coli treated overnight with 1 mM IPTG at 25°C. The GST-Rac1-Q61L fusion protein used to analyze FilGAP activity in a Rac1-GAP activity pull down assay, was a kind gift of Dr C. Guilluy and K Burrige (Institut du Thorax, Nantes, France) (27). The GST-fusion proteins were purified using Glutathione Agarose 4B beads (Macherey-Nagel). Transfected Hek293 cells grown for 2-4 hrs after seeding and lysed. The cell lysates were centrifuged at 15,000 ×g for 15 min at 4°C. 500 µg of cleared cell lysates were incubated with GST-tagged proteins (30µg) and rotated (18 rpm) for 1h at 4°C. The beads were washed four times with cell lysis buffer and bound proteins separated by SDS-PAGE. Bound Rac1 was detected by immunoblotting as describe above. In Rac1-GAP activity assay, cells were transfected with WT and mutant HA-FilGAPs and pulled down FilGAPs quantified by western blotting using anti-HA antibody.

Phosphoinositides binding assay, structural prediction and molecular dynamics analysis.

Structural and molecular dynamic predictions are detailed in Supplementary Methods. PIP strips (Echelon) were used according to the manufacturer's instructions to test FilGAP binding to phosphatidylinositols. Strips were incubated overnight at 4°C with cleared cell lysates (20µg) and anti-HA antibody and then revealed by ECL.

FRAP experiments.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments were performed on mCherry-FilGAP transfected HT1080 cells (WT and FlnA KO cells) seeded on 8µm slide chambers (Ibidi) 24 hours after transfection using a Nikon confocal Eclipse C1 inverted microscope equipped with a temperature (37°C) and atmosphere controlled (5% CO₂) chamber. Briefly, steady state control images were captured for 30 sec and a region of interest (1 µm²) was bleached for 500 msec using 488 and 564 laser wavelengths to obtain ≈ 70-80% decrease of fluorescence. Images were then captured every 5 sec for 1 min after bleaching. Kinetics of recovery were fitted to a mono-exponential, t_{1/2} and percentage of recovery calculated according to (49).

Zebrafish studies.

All experiments were performed in accordance with approved Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) protocols. Zebrafish of the Tubingen/AB strain were reared according to standard techniques. Minimal effective doses of antisense morpholino oligonucleotides were calculated by serial dilution of morpholino and evaluation of transcript expression at 96 hours post fertilization. Semiquantitative PCR was used to demonstrate morpholino knockdown efficacy with *ef-1a* used as a loading control. Effective doses were injected into single cell stage embryos, manually dechorionated at 24 hours post fertilization and treated with 0.003% Phenylthiourea to inhibit pigmentation. At 96 hours post fertilization, embryos were scored for presence of AV regurgitation using high speed videography (125fps) on a Nikon Eclipse 50i microscope coupled to a Fastec Imaging Inline IN250 high speed CCD camera.

Statistical analysis

Each assay presented here was performed at least three times. Graphs depict mean values \pm SEM of sample size n. Data were analyzed using Prism (GraphPad Software) and p-values were generated using a Mann-Whitney test or two-ways ANOVA test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Statistical evaluations of zebrafish atrioventricular valve regurgitation were calculated using Fisher's exact test.

References

1. Freed LA, Levy D, Levine RA, Evans JC, Larson MG, Fuller DL, Lehman B, and Benjamin EJ. Mitral valve prolapse and atrial septal aneurysm: an evaluation in the Framingham Heart Study. *The American journal of cardiology*. 2002;89(11):1326-9.
2. Freed LA, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Evans JC, Fuller DL, Lehman B, and Levine RA. Mitral valve prolapse in the general population: the benign nature of echocardiographic features in the Framingham Heart Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(7):1298-304.
3. Enriquez-Sarano M, Akins CW, and Vahanian A. Mitral regurgitation. *Lancet*. 2009;373(9672):1382-94.
4. Flack JM, Kvasnicka JH, Gardin JM, Gidding SS, Manolio TA, and Jacobs DR, Jr. Anthropometric and physiologic correlates of mitral valve prolapse in a biethnic cohort of young adults: the CARDIA study. *Am Heart J*. 1999;138(3 Pt 1):486-92.
5. Freed LA, Levy D, Levine RA, Larson MG, Evans JC, Fuller DL, Lehman B, and Benjamin EJ. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med*. 1999;341(1):1-7.
6. Adams DH, Rosenhek R, and Falk V. Degenerative mitral valve regurgitation: best practice revolution. *Eur Heart J*. 2010;31(16):1958-66.
7. Anyanwu AC, and Adams DH. Etiologic classification of degenerative mitral valve disease: Barlow's disease and fibroelastic deficiency. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*. 2007;19(2):90-6.
8. Icardo JM, Colvee E, and Revuelta JM. Structural analysis of chordae tendineae in degenerative disease of the mitral valve. *Int J Cardiol*. 2013;167(4):1603-9.
9. Lee B, Godfrey M, Vitale E, Hori H, Mattei MG, Sarfarazi M, Tsipouras P, Ramirez F, and Hollister DW. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature*. 1991;352(6333):330-4.
10. Malfait F, Coucke P, Symoens S, Loeys B, Nuytinck L, and De Paepe A. The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: a comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients. *Hum Mutat*. 2005;25(1):28-37.
11. Singh KK, Rommel K, Mishra A, Karck M, Haverich A, Schmidtke J, and Arslan-Kirchner M. TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with features of Marfan syndrome and Loeys-Dietz syndrome. *Hum Mutat*. 2006;27(8):770-7.
12. Dellling FN, Rong J, Larson MG, Lehman B, Osypiuk E, Stantchev P, Slaughter SA, Benjamin EJ, Levine RA, and Vasani RS. Familial clustering of mitral valve prolapse in the community. *Circulation*. 2015;131(3):263-8.
13. Geirsson A, Singh M, Ali R, Abbas H, Li W, Sanchez JA, Hashim S, and Tellides G. Modulation of transforming growth factor-beta signaling and extracellular matrix production in myxomatous mitral valves by angiotensin II receptor blockers. *Circulation*. 2012;126(11 Suppl 1):S189-97.
14. Groenink M, den Hartog AW, Franken R, Radonic T, de Waard V, Timmermans J, Scholte AJ, van den Berg MP, Spijkerboer AM, Marquering HA, et al. Losartan reduces aortic dilatation rate in adults with Marfan syndrome: a randomized controlled trial. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3491-500.
15. Bowen JM, and Connolly HM. Of Marfan's syndrome, mice, and medications. *N Engl J Med*. 2014;371(22):2127-8.
16. Brooke BS, Habashi JP, Judge DP, Patel N, Loeys B, and Dietz HC, 3rd. Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *N Engl J Med*. 2008;358(26):2787-95.
17. Lacro RV, Dietz HC, Sleeper LA, Yetman AT, Bradley TJ, Colan SD, Pearson GD, Selamet Tierney ES, Levine JC, Atz AM, et al. Atenolol versus losartan in children and young adults with Marfan's syndrome. *N Engl J Med*. 2014;371(22):2061-71.

18. Fornes P, Heudes D, Fuzellier JF, Tixier D, Bruneval P, and Carpentier A. Correlation between clinical and histologic patterns of degenerative mitral valve insufficiency: a histomorphometric study of 130 excised segments. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 1999;8(2):81-92.
19. Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, Toquet C, Roy E, McGregor L, Lynch SA, et al. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation*. 2007;115(1):40-9.
20. Kyndt F, Schott JJ, Trochu JN, Baranger F, Herbert O, Scott V, Fressinaud E, David A, Moisan JP, Bouhour JB, et al. Mapping of X-linked myxomatous valvular dystrophy to chromosome Xq28. *Am J Hum Genet*. 1998;62(3):627-32.
21. Trochu JN, Kyndt F, Schott JJ, Gueffet JP, Probst V, Benichou B, and Le Marec H. Clinical characteristics of a familial inherited myxomatous valvular dystrophy mapped to Xq28. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(7):1890-7.
22. Duval D, Lardeux A, Le Tourneau T, Norris RA, Markwald RR, Sauzeau V, Probst V, Le Marec H, Levine R, Schott JJ, et al. Valvular dystrophy associated filamin A mutations reveal a new role of its first repeats in small-GTPase regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(2):234-44.
23. Ehrlicher AJ, Nakamura F, Hartwig JH, Weitz DA, and Stossel TP. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature*. 2011;478(7368):260-3.
24. Nakamura F. FilGAP and its close relatives: a mediator of Rho-Rac antagonism that regulates cell morphology and migration. *Biochem J*. 2013;453(1):17-25.
25. Ohta Y, Hartwig JH, and Stossel TP. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol*. 2006;8(8):803-14.
26. Hurlstone AF, Haramis AP, Wienholds E, Begthel H, Korving J, Van Eeden F, Cuppen E, Zivkovic D, Plasterk RH, and Clevers H. The Wnt/beta-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature*. 2003;425(6958):633-7.
27. Guilluy C, Dubash AD, and Garcia-Mata R. Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat Protoc*. 2011;6(12):2050-60.
28. Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, Hartwig JH, and Stossel TP. Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol*. 2007;179(5):1011-25.
29. Klarlund JK, Tsiaras W, Holik JJ, Chawla A, and Czech MP. Distinct polyphosphoinositide binding selectivities for pleckstrin homology domains of GRP1-like proteins based on diglycine versus triglycine motifs. *J Biol Chem*. 2000;275(42):32816-21.
30. Lemmon MA. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):99-111.
31. Nakamura F, Heikkinen O, Pentikainen OT, Osborn TM, Kasza KE, Weitz DA, Kupiainen O, Permi P, Kilpelainen I, Ylanne J, et al. Molecular basis of filamin A-FilGAP interaction and its impairment in congenital disorders associated with filamin A mutations. *PLoS One*. 2009;4(3):e4928.
32. Saito K, Ozawa Y, Hibino K, and Ohta Y. FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPase-activating protein for Rac, controls tumor cell migration. *Mol Biol Cell*. 2012;23(24):4739-50.
33. Baldassarre M, Razinia Z, Burande CF, Lamsoul I, Lutz PG, and Calderwood DA. Filamins regulate cell spreading and initiation of cell migration. *PLoS One*. 2009;4(11):e7830.
34. Shifrin Y, Arora PD, Ohta Y, Calderwood DA, and McCulloch CA. The role of FilGAP-filamin A interactions in mechanoprotection. *Mol Biol Cell*. 2009;20(5):1269-79.
35. Razinia Z, Makela T, Ylanne J, and Calderwood DA. Filamins in mechanosensing and signaling. *Annu Rev Biophys*. 2012;41(227-46).
36. Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, and Shapiro SS. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):138-45.

37. Zhou AX, Hartwig JH, and Akyurek LM. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol.* 2010;20(2):113-23.
38. Akilesh S, Suleiman H, Yu H, Stander MC, Lavin P, Gbadegesin R, Antignac C, Pollak M, Kopp JB, Winn MP, et al. Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest.* 2011;121(10):4127-37.
39. Kawaguchi K, Saito K, Asami H, and Ohta Y. ADP ribosylation factor 6 (Arf6) acts through FilGAP protein to down-regulate Rac protein and regulates plasma membrane blebbing. *J Biol Chem.* 2014;289(14):9675-82.
40. Kilner PJ, Yang GZ, Wilkes AJ, Mohiaddin RH, Firmin DN, and Yacoub MH. Asymmetric redirection of flow through the heart. *Nature.* 2000;404(6779):759-61.
41. Padala M, Hutchison RA, Croft LR, Jimenez JH, Gorman RC, Gorman JH, 3rd, Sacks MS, and Yoganathan AP. Saddle shape of the mitral annulus reduces systolic strains on the P2 segment of the posterior mitral leaflet. *Ann Thorac Surg.* 2009;88(5):1499-504.
42. Combs MD, and Yutzey KE. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ Res.* 2009;105(5):408-21.
43. Hinton RB, and Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. *Annual review of physiology.* 2011;73(29-46).
44. Katsumi A, Milanini J, Kiosses WB, del Pozo MA, Kaunas R, Chien S, Hahn KM, and Schwartz MA. Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol.* 2002;158(1):153-64.
45. Sanematsu F, Hirashima M, Laurin M, Takii R, Nishikimi A, Kitajima K, Ding G, Noda M, Murata Y, Tanaka Y, et al. DOCK180 is a Rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4. *Circ Res.* 2010;107(9):1102-5.
46. Lindenbaum P, Le Scouarnec S, Portero V, and Redon R. Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinformatics.* 2011;27(22):3200-1.
47. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, and Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24-6.
48. Keogh RJ. New technology for investigating trophoblast function. *Placenta.* 2010;31(4):347-50.
49. Reits EA, and Neefjes JJ. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol.* 2001;3(6):E145-7.

	All n=54	ARHGAP24 n=15	Controls n=39	p
Age, yrs	50±15	53±18	49±14	NS
Men, n (%)	30(56)	10(67%)	20(51%)	NS
BSA, m ²	1.87±0.2	1.9±0.2	1.86±0.2	NS
sinus rhythm	53 (98)	14 (93%)	39 (100%)	NS
Heart rate, bpm	66±10	62±8	68±10	NS
Systolic blood pressure, mmHg	134±18	138±22	134±17	NS
Diastolic blood pressure, mmHg	82±11	86±18	81±8	NS

Table 1: Baseline clinical characteristics of adult *ARHGAP24* mutation carriers and Controls patients.

Sinus Rhythm indicates the number of patient in sinus rhythm in the cohort. P indicates statistical significance between Control and *ARHGAP24* mutation carriers. NS indicates no significant statistical difference was detected. BSA: Body surface area.

Adults	ARHGAP24 n=15	Controls n=39	p
Unindexed Measurements			
Diastolic annulus diameter, mm	35.3±4.8	32.0±2.6	0.036
AML length, mm	22.7±2.9	21.3±1.8	NS
PML length, mm	15.7±4.0	11.0±2.0	0.0001
Mitral Annulus/AML ratio	1.6±0.3	1.4±0.1	0.015
AML tip thickness, mm	2.5±0.8	2.1±0.4	NS
PML tip thickness, mm	2.8±1.2	2.2±0.5	NS
AML body position to annulus, mm	2.4±1.3	3.4±1.6	0.04
PML body position to annulus, mm	-2.4±1.6	3.2±1.9	<0.0001
Antero-posterior coaptation point, mm	18.1±3.0	19.5±2.8	NS
Antero-posterior coaptation point/annulus ratio, %	52±11	66±7	<0.0001
Indexed Measurements			
Diastolic annulus diameter, mm/m ²	18.8±2.5	17.3±2	0.03
AML length, mm/m ²	11.4±3.3	11.5±1.3	NS
PML length, mm/m ²	8.4±2.1	6.0±1.2	0.0003
AML prolapse, n (%)	0	0	-
PML prolapse, n (%)	10 (67)	0	-
MVPprod, n (%)	3 (20)	0	-
MR any severity	13(87)	15(38)	0.004
MR trace to mild, n (%)	9 (60)	15 (38)	NS
MR moderate to severe, n (%)	4 (27)	0	-

Table 2: Mitral valve echocardiographic characteristics in adult *ARHGAP24* mutations carriers compared with “Control” patients.

Indexed measurements give diastolic annulus diameter anterior and posterior mitral leaflet lengths (AML and PML respectively) reported to body surface area. MR: mitral regurgitation, MVPprod: prodromal form of MVP. p indicates statistical significance between Control and *ARHGAP24* mutation carriers. NS indicates no significant statistical difference was detected.

Figure legends.

Figure 1: Discovery of 4 new rare variants in FilGAP protein. **A)** Schematic diagram of FilGAP structure and localization of MVP-associated mutations. R95Q targets the N-terminal pleckstrin homology domain (PH) next to the GTPase Activating Protein domain (GAP) domain which regulates Rac1 activity. P417H and T481M mutations target the Spacer domain preceding the coiled-coil domain (CC) which determines FilGAP dimerization and where Q671* sits. The amino acids sequence (F726-V734) interacts with Filamin A (FlnA) are indicated and the crucial V734 underlined. **B)** Pedigree tree of the three FilGAP-associated MVP families. The probands are indicated by arrows. Female are identified by circles and males by squares. Affected individuals and those exhibiting prodromal MVP (see Suppl Method) are indicated by filled black and grey, respectively. FilGAP mutation carriers and non-carriers are indicated by + or – signs, respectively. The “?” sign indicates patients not examined by the clinicians. Note the patient II:6 in Family “3” (dashed gray) not carrying FilGAP-T481M mutation was diagnosed with Barlow disease. **C)** Two-dimensional parasternal long-axis echocardiographic view of posterior MVP (arrow) recorded in patient II.2 from Family 1. Posterior, anterior mitral leaflet lengths (PML, AML) and mitral annulus diameter (MAD) are materialized by curly brackets. The abnormal anterior position of leaflets coaptation (with AML/MAD ratio < 60%) is indicated by the dashed line. LV: left ventricle, LA: left atrium. **D)** Posterior mitral valve from proband (II.4) in Family “2” FilGAP T481M. Moderate myxoid infiltration is present at the tip of the leaflet while the rest of the valve appeared normal. **E)** Tissue expression profile of FilGAP determined by RT-PCR in brain, kidney and mitral valve mRNA. The 4 isoforms of FilGAP are expressed in Mitral Valve but FilGAP isoform 1 is the most expressed isoform compared to kidney and brain. **F)** Immunohistological localization of FilGAP in a control human mitral valve posterior leaflet. FilGAP is detected in both endothelial (arrows) and interstitial cells (arrow heads).

Figure 2. ARHGAP24/FilGAP invalidation determines atrio-ventricular regurgitation in Zebrafish.

A) ARHGAP24 knocked down using two specific morpholinos (ARHGAP24 1 and 2) do not affect morphological development neither cardiac chamber morphology (**C**) but significantly increased atrio-ventricular blood regurgitation (**B**). * indicates significant statistical difference ($p < 0.05$) with control morpholino. Representative videos of blood regurgitation are available as Supplemental Materials.

Figure 3: FED-MVP-associated FilGAP-R95Q, P417H and T481M mutations are loss of function mutations.

A) Typical western blot of a Rac1-GTP pull down assay experiment. Hek293 cells were transfected with pcDNA3 (control), HA-FilGAP-WT, R95Q, P417H or T481M and active Rac1 isolated using GST-PAK1. Although all HA-FilGAP constructs were expressed to similar levels (input FilGAPs-HA) only FilGAP-WT (second lane) significantly decreased the active Rac1 pulled down compared to control. The histogram on the right gives the mean data from seven experiments. Error bars show SEM, ** $P < 0.01$ versus pcDNA3 condition. **B)** Pull down assay active Rac1 specific GAP regulators. Equal amount of HA-FilGAPs (see input HA-FilGAPs) were loaded on GST-Rac1-Q61L fusion protein (red ponceau staining is shown in the bottom image) and “active” FilGAPs pulled down were revealed using anti-HA (upper blot). Only FilGAP-WT significantly interacted with “active”-Rac1. The histogram on the right gives the mean of five experiments. ** indicates significant difference ($P < 0.01$) versus FilGAP-WT cells.

Figure 4. Loss of function of FilGAP-R95Q, P417H and T481M revealed in cell spreading assays.

A) Cell indexes (CI) values measured using xCELLigence system. FilGAP-WT transfected cells exhibited slower CI increases and lower steady states CI (CI_{st}) compared to pcDNA3 or siRNA control treated cells. On the other hand, cells treated with siRNA targeting FilGAP exhibited faster increase and higher CI_{st} compared to controls. The blot image illustrates the $\approx 80\%$ extinction of endogenous FilGAP obtained using FilGAP specific siRNA. **B)** CI recordings obtained from R95Q, P417H and T481M transfected cells. The pcDNA3 and FilGAP-WT data shown in **A)** are reproduced to facilitate comparison. None of the mutant FilGAPs altered cell spreading and adhesion compared to pcDNA3 transfected cells. Values represent the mean of six experiments and SEM are indicated by the bars. ** significant difference ($p < 0.01$) vs FilGAP-WT. Numerical data are given in supplemental Table 2. **C)** FilGAP mutations do not affect its dimerization capacities. Hek293 cells were co-transfected Myc-tagged FilGAP-WT and HA-tagged FilGAP mutants. The blots on the right show immuno-precipitated mutant FilGAPs using anti-HA antibody (lower image) and the co-immuno-precipitated myc-tagged FilGAP-WT (upper image). Myc-FilGAP-WT was co-IPed with WT and all the HA-tagged mutant FilGAPs. Control experiment shows Myc-FilGAP was not immuno-precipitated by anti-HA antibody in the absence of co-transfected HA-FilGAPs. The blots on the left show the constructs were expressed at similar levels in the different conditions. GAPDH was used as “gel loading” control. These experiments were reproduced at least twice.

Figure 5. FilGAP-R95Q mutation affects FilGAP/PIPs binding. **A)** Ribbon representation of FilGAP-WT and R95Q plekstrin homology domain tertiary structure at the end of the molecular dynamic simulation (200 ns). Two orthogonal projections are shown. The inter β -

strand loops, R95 and E86 residues are indicated. In FilGAP-R95Q, the longer $\beta 3$ - $\beta 4$ and shorter $\beta 5$ - $\beta 6$ loops compared to WT-FilGAP are indicated. **B)** Representation of PIP₃ binding site in the WT-FilGAP PH domain. K28,52 and R39 which strongly participate to PIP₃ stabilization are shown in stick model (blue, red and yellow indicate amine, oxygen and phosphate atoms, respectively). No stable model could be computed for FilGAP-R95Q mutant. **C)** PIP strips carrying (3,4)PIP₂, (3,5)PIP₂, (4,5)PIP₂, (3,4,5)PIP₃ dots were incubated with equal amounts of HA-FilGAP-WT, R95Q, P417H or T481M (as shown on the western blot) and their binding revealed by ECL using anti-HA-and peroxidase coupled antibodies. Only R95Q mutation suppressed both (3,4)PIP₂ and (3,4,5)PIP₃ FilGAP binding. GAPDH was used as a “gel loading” control in the western blots. These experiments and data were reproduced three times.

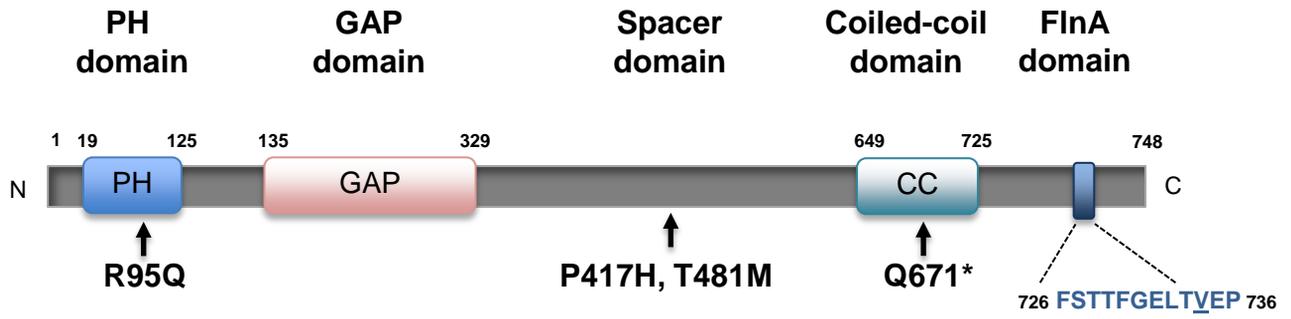
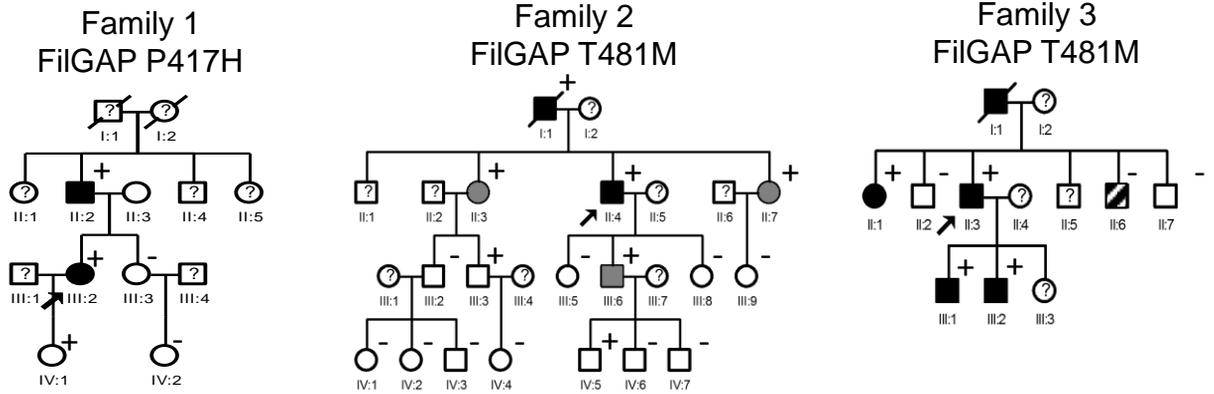
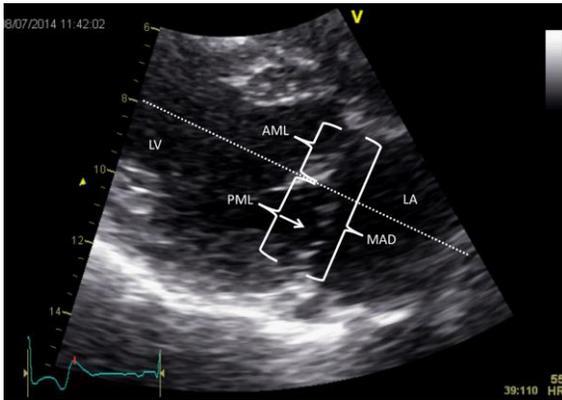
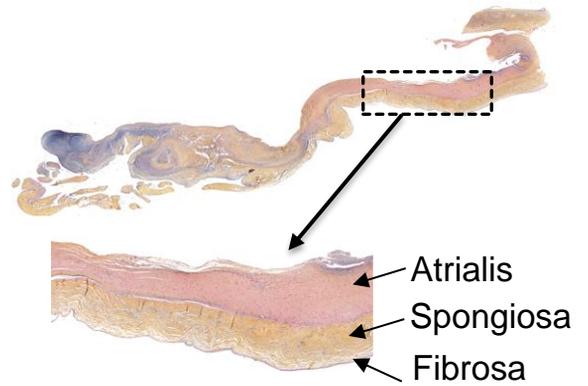
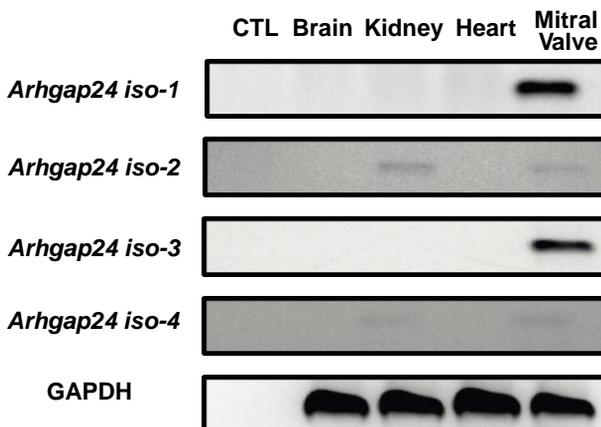
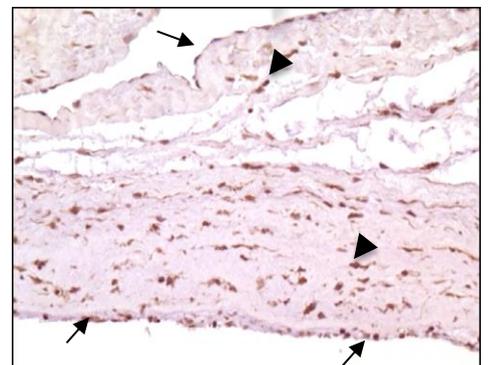
Figure 6. FilGAP-P417H and T481M mutations impede FlnA/FilGAP interactions and cellular sequestration of FilGAP.

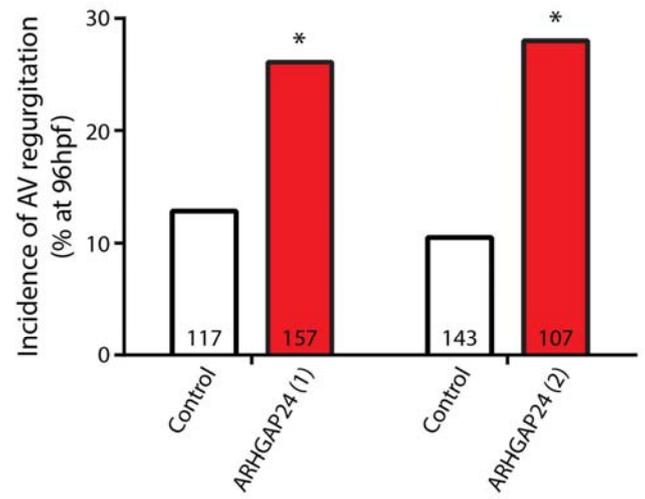
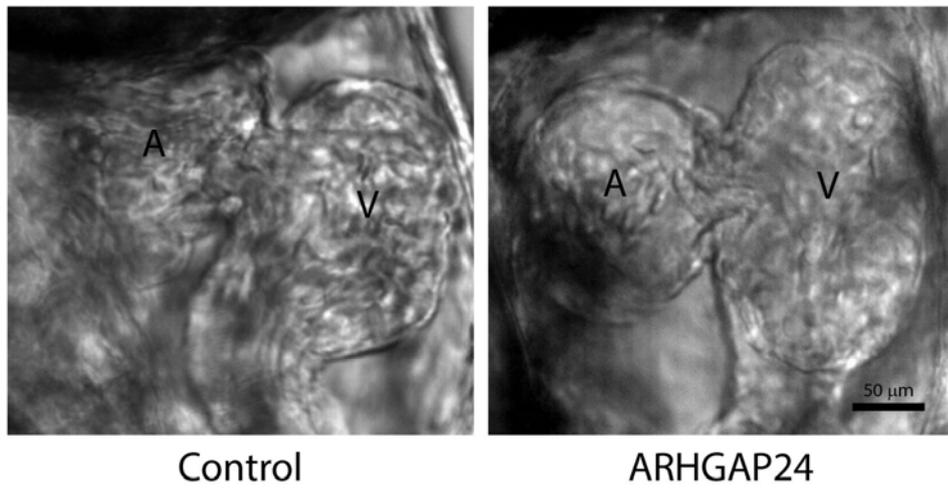
A) The two upper blots on the left show immuno-precipitated (IP) HA-FilGAP-WT, R95Q, P417H and T481M transfected in Hek293 cells and the co-immuno-precipitated (Co-IP) endogenous FlnA. Note that P417H and T481M mutations significantly reduced Co-IPed FlnA. The lower blots show the similar expression levels of FlnA and HA-FilGAP in the different conditions and GAPDH was used as a “gel loading” control. The histogram on the right shows the quantification of three experiments. ** indicates significant ($p < 0.01$) difference vs FilGAP-WT. **B)** A typical recording of a FRAP experiment performed on a HT1080 cell expressing mcherry-FilGAP-WT is shown on the left. The mobile and immobile fractions of FilGAP are indicated. The averaged data from FilGAP-WT (n=16), R95Q (n=13), P417H (n=12) and T481M (n=15) transfected cells from 3-4 experiments are shown on the right. The histograms show the averaged recovered fluorescence at $t = 1$ min and the mean $t_{1/2}$

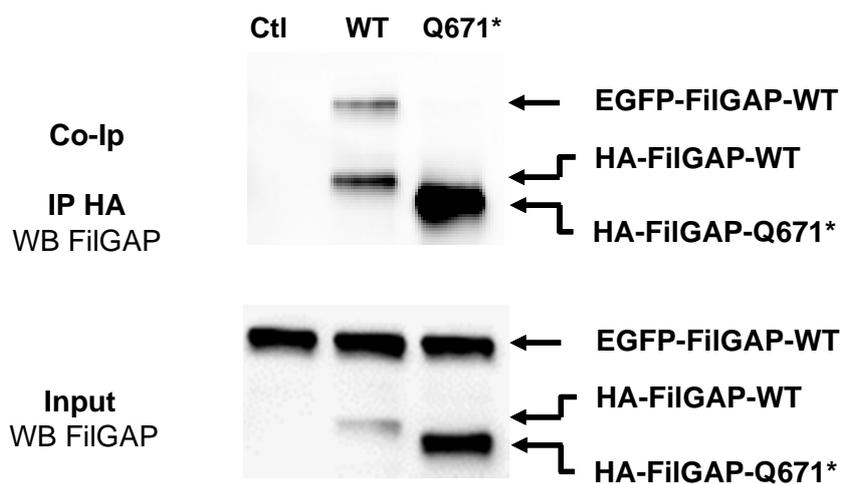
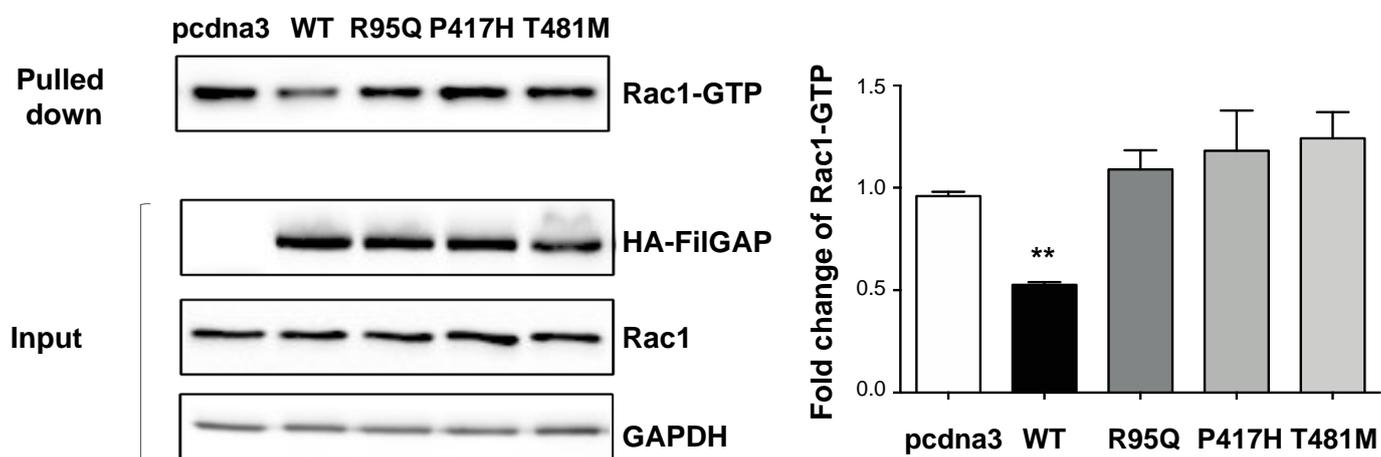
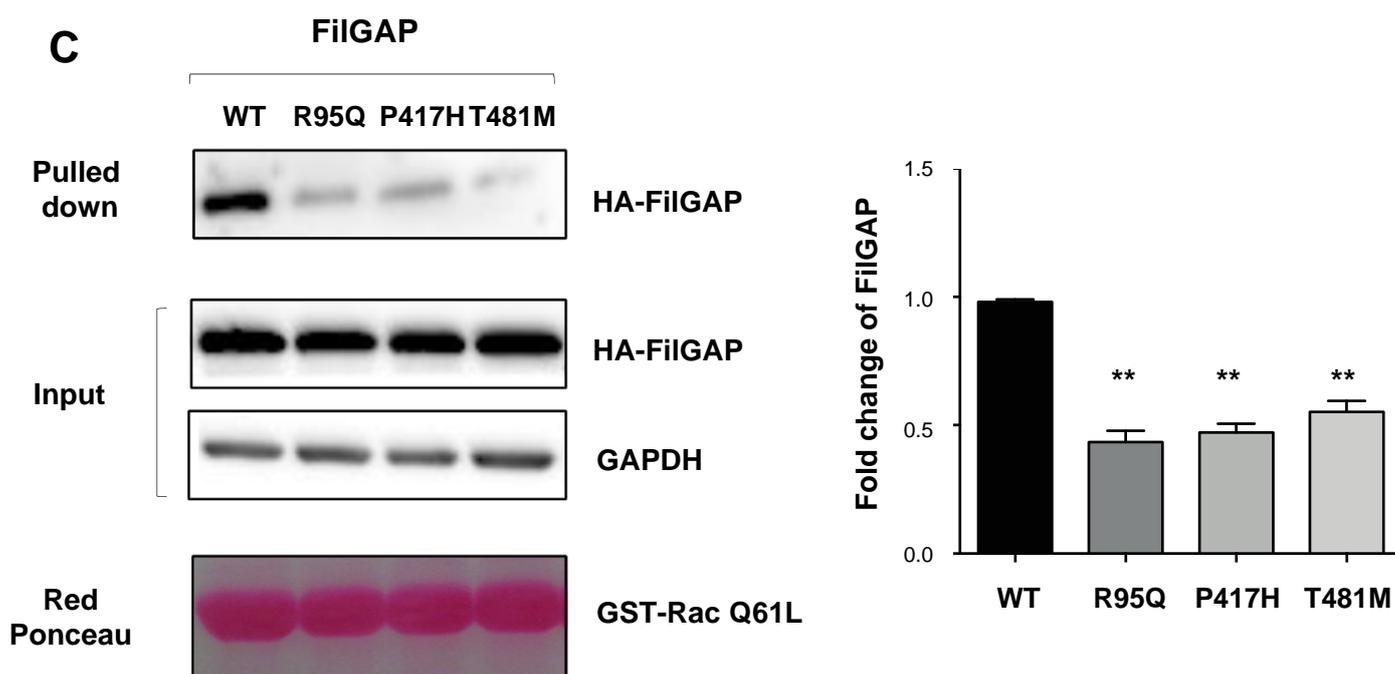
of recovery from the data shown above. P417H and T481M mutations but not R95Q significantly increase the rates of recovery and reduce the immobilized fraction. ** indicates significant ($p < 0.01$) difference vs FilGAP-WT. Numerical data are given in supplemental Table 3.

Figure 7. FilGAP sequestration depends on FlnA expression.

Recovered fractions (immobile/mobile) and recovery rate ($t_{1/2}$) of FilGAP-WT (n=6), R95Q (n=6), P417H (n=9), T481M (n=11) and V734Y (n=7) measured in three experiments performed in shRNA FlnA-KO HT1080 cells. The FilGAP-WT data obtained in FlnA expressing HT1080 cells from Fig 5B are added to facilitate comparison. All the constructs tested, including FilGAP-WT, exhibited similar mobility characteristics in the absence of FlnA ** indicates significant difference ($p < 0.01$) vs FilGAP-WT in HT1080 cells. Numerical data are given in supplemental Table 3.

A**B****C****D****E****F****Figure 1**

A**B****C****Figure 2**

A**B****C****Figure 3**

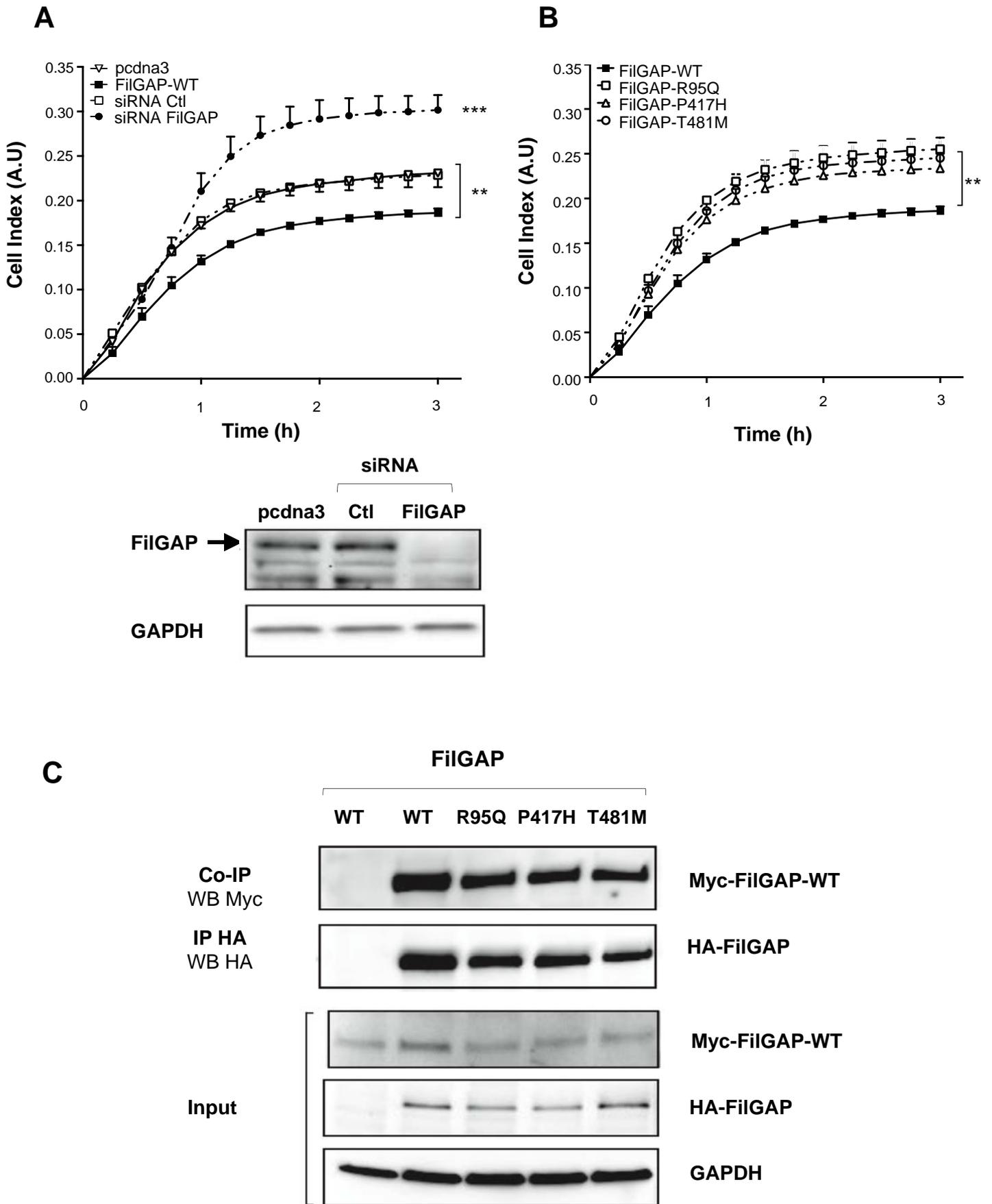


Figure 4

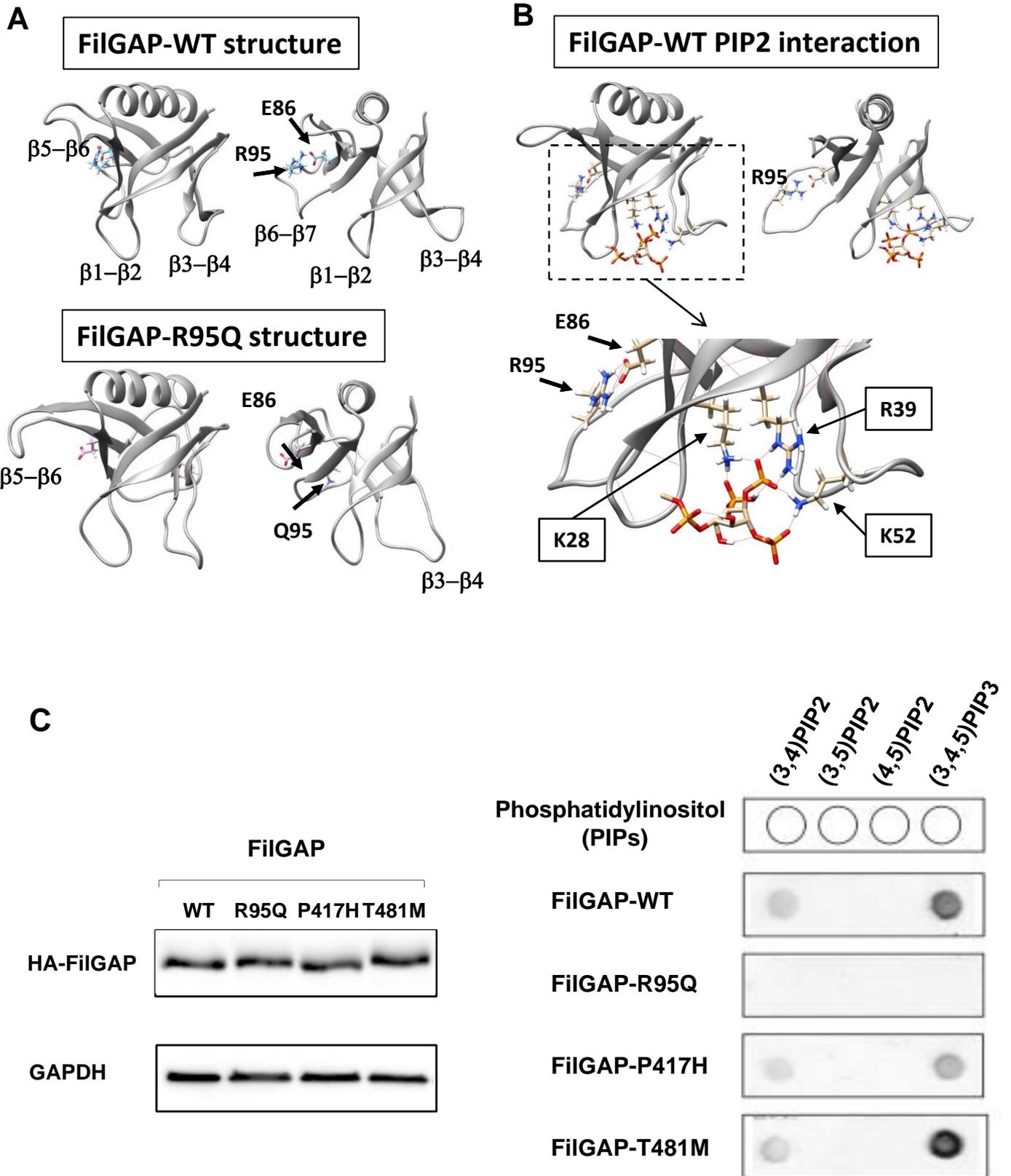


Figure 5

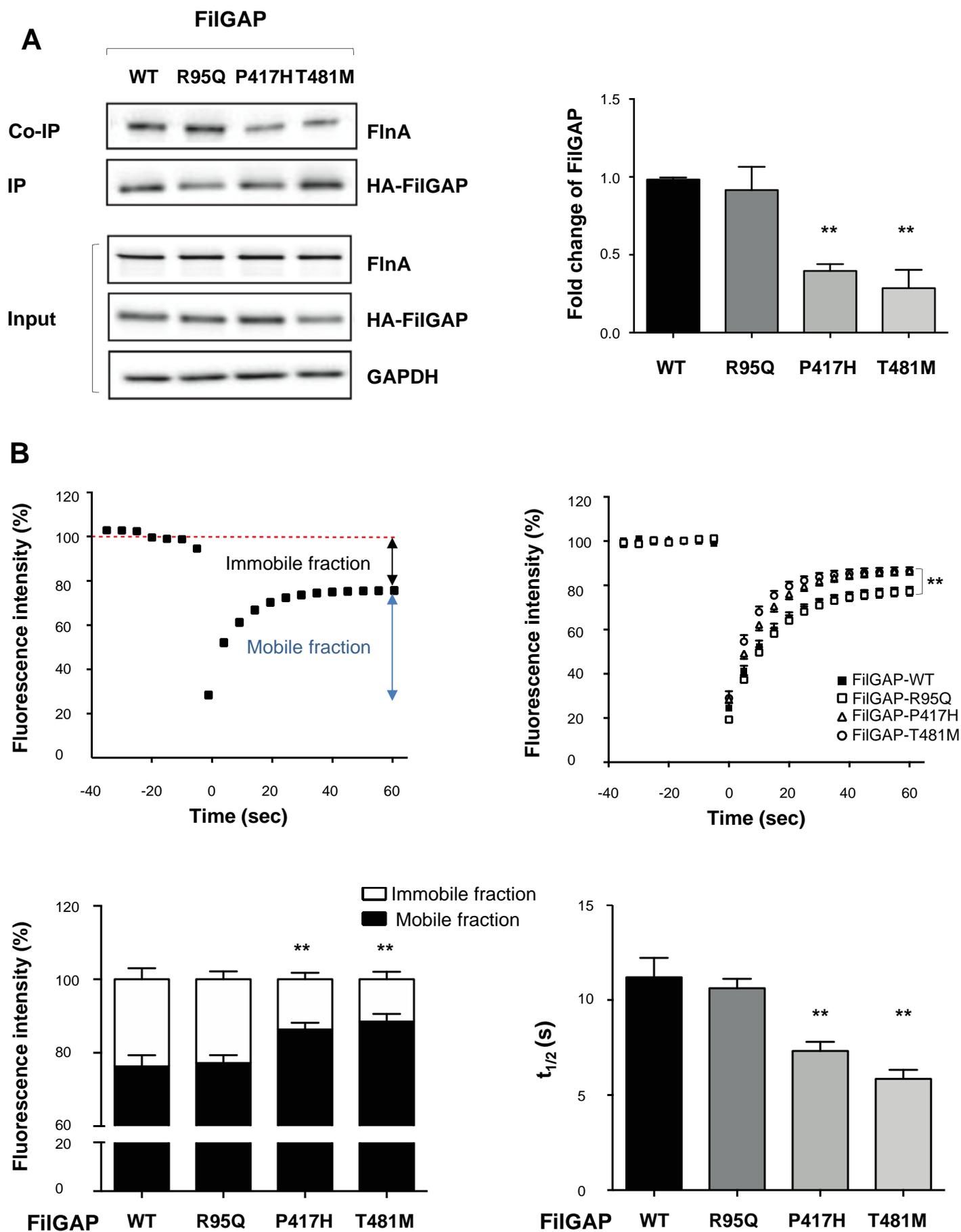


Figure 6

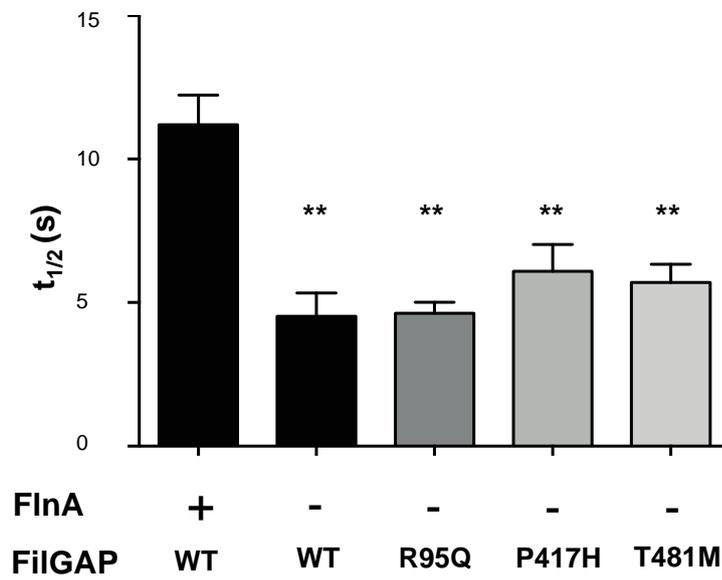
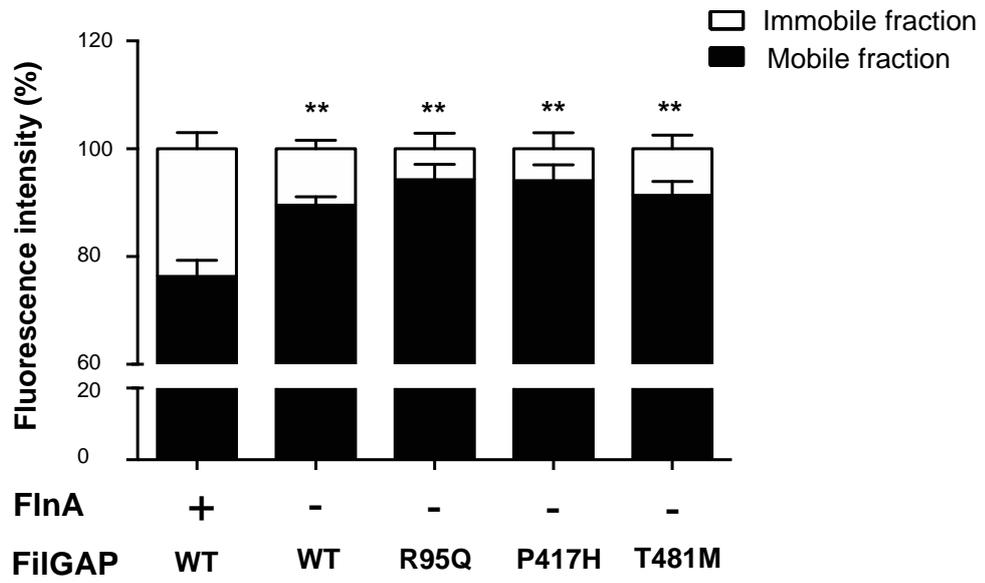


Figure 7

Supplemental Method.

Custom design

We developed a target re-sequencing custom design based on the HaloPlex™ technology (Agilent) to perform high-throughput sequencing of the coding regions of 78 MVP candidate genes including : -genes previously linked to non-syndromic MVP (*DCHS1*, *FLNA*); -genes linked to syndromic MVP (*FBNI*, *TGFBRI*, *TGFBR2*, *SMAD4*) and candidate genes (including *ARHGAP24*). Targeted coding regions (± 10 bp) correspond to 240.21 kb of genomic sequence (29,25kb for described genes). Sequencing was performed on Illumina HiSeq 2500 platform using 100 paired end sequencing.

Detection of rare genetic variants

Raw sequence reads were aligned to the human reference genome (GRCh37) using BWA-MEM (version 0.7.5a) after removing sequences corresponding to Illumina adapters with Cutadapt v1.2. Variants were called for each sample separately using GATK UnifiedGenotyper (version 2.8) and Samtools mpileup (version 0.1.19), and variants were considered for further analyses if found by both GATK and Samtools. Variants were considered as rare if the minor allele frequency (MAF) was lower than 1% in non-finnish European population using Exome Aggregation Consortium database (Cambridge, MA, exac.broadinstitute.org/). The potential pathogenicity of variants was determined using Variant Effect Predictor annotations (Ensembl). We considered variants with functional and splice potential consequences. Filtering was performed using an in house developing tool Knime4Bio (1).

Validation (visualisation and Sanger sequencing)

All relevant variants identified in individuals sequenced were manually reviewed by visual inspection of sequence reads using the Integrative Genomics Viewer (2). Secondly, sanger sequencing was performed to validate in-silico data. After amplification by PCR, excess

primers were removed from the amplified fragments using exoSAP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and sequenced with a dye-terminator cycle-sequencing system (ABI PRISM 3730, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif). Sequences analyses were performed with Seqscape v2.5.

Cell culture and transfection, Plasmids and siRNA.

Hek293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and L-glutamine. HT1080 cells and shRNA mediated FlnA knocked down HT1080 cells were obtained from Dr D Calderwood (Yale Univ, New Have CT, USA) and grown in DMEM supplemented with 10% FCS, L-glutamine and the same medium supplemented with 2 μ g/ml puromycin, respectively. The cells were transfected with FilGAP constructs plasmids using Lipofectamine (Invitrogen) or Genecellin (BiocellChallenge) according to the manufacturers' specifications.

The pCMV5 N-terminally HA-tagged FilGAP (HA-FilGAP-WT) was a gift of Dr Yasutaka Ohta (Division of Cell Biology, Kitasato University, Japan). Myc-tag and mutations were introduced in the wild-type FilGAP using PCR based mutagenesis kits (Quickchange and Q5 site directed mutagenesis kits from Agilent Tech and New England Biolabs, respectively). The EGFP and mcherry-C1 expression vectors (Clontech) were used to construct green and red fluorescent protein (mcherry) N-terminally tagged FilGAPs respectively. All the constructs were verified by sequencing. To deplete endogenous FilGAP, siRNA oligonucleotide duplexes targeting the sequence 5'-AAGATAGAGTATGAGTCCAGGATAA-3' (nt 1975–1999 of FilGAP) were used (3). Control siRNA duplexes targeting GFP were used (sens 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUUCAU-3', antisens 5'-GAACUUCAGGGU CAGCUUGCCG-3'). The cells were transfected according to the suppliers' guidelines (Eurogentec) and used 48 hours post transfection.

Modelisation and molecular dynamics simulations.

The model of the PH domain of FILGAP (a.a 21-125) was first built based on the solution NMR structure of the PH homology domain of human Rho GTPase – activating protein 25 (ARHGAP25, Protein Data Bank (PDB) ID code 1V89) as template structure due to high sequence identity (53.4 %, see Figure S1) and using SWISS-MODEL(4-6) and ModLoop (7). The mutant R95Q model was generated from this first model using Chimera 1.8.1 (8). These wild type and mutant PH domain of FILGAP models were further refined using the 4.6.3 version of GROMACS (9) and the CHARMM22 protein force field (10, 11). The model was immersed in a cubic box with periodic boundary conditions. The TIP3P water model was used. The box dimensions (3.7 nm x 4.0 nm x 3.0 nm) was set to allow at least 1 nm between the protein and the box faces on each side. The final system consists of 1718 protein atoms surrounded by 8051 water molecules. All the MD simulations were carried out using periodic boundary conditions. The system was first relaxed through energy minimization using the steepest descents algorithm. Then equilibration was performed and consists of the following steps: 4 ns NVT ensemble (constant Number of particles, Volume, and Temperature) at 50 K followed by 1 ns NVT ensemble simulation at 310 K and finally a 5 ns NPT (constant Number of particles, Pressure, and Temperature) ensemble simulation at 310 K. Next, the molecular dynamics was run for 200 ns at 310 K, and the data were collected every 5 ps. Constant temperature (310 K, $\tau_T = 0.1$ ps) was maintained by coupling to a bath using a v-rescale algorithm, whereas pressure was kept at 1 atm using the Parrinello-Rahman barostat. Long range electrostatic interactions were calculated using the Particle-Mesh Ewald method, whereas application of the Lincs method allowed for an integration step size of 2 fs. Analysis of the simulations was performed using GROMACS tools.

The PIP3 ligand structure (Figure x supplementary material) used for the complexes was built by grafting a methyl group on the PIP3 headgroup at the C1 position (POPI33 molecule in

CHARMM-GUI), (12, 13). The starting position of the PIP3 ligand within the complexes was similar to the position of the Ins(1,3,4,5)P4 ligand within the Grp1-PH/Ins(1,3,4,5)P4 complex as seen in the X-ray crystal structure (PDB ID code 1FHX). The simulation protocol was similar to that used for the protein without ligand as described above except that the molecular dynamics were run for 500 ns. All the calculations were performed with the supercomputing resources available at the CCRT (Centre de Calcul Recherche et Technologie, CEA, France).

Clinical and echocardiography analysis.

For the phenotypic study, echocardiography was carried out in 3 families and 1 isolated patient with an *ARHGAP24* mutation. Among them, 13 adults (> 16 years old) carried an *ARHGAP24* mutation. Children were excluded from quantitative analysis because only 2 individuals \leq 16 years old carrying an *ARHGAP24* mutation were identified. The mutated group was matched with a control group of 39 adults with normal echocardiography, including 6 *ARHGAP24* un-mutated relatives, and un-mutated relatives of a large family from the western part of France (healthy relatives of *FLNA* associated *MVP* family) (14, 15). Patients with other causes of MV disease (rheumatic, functional or ischemic, congenital) or aortic valve disease were excluded from the analyses. One *MVP* phenocopy patient (family 3; II.6) was excluded from quantitative analyses.

All echocardiograms were performed by one experienced investigator (T.L.T) using a commercially available echocardiograph (Vivid, GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA). Data were prospectively recorded and transferred without alteration for the purpose of the study. Measurements were performed using an offline cardiac analysis system (*Echo PAC, GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA*). All values were obtained from the mean of 3 beats and from the mean of 5 to 10 beats in patients with atrial fibrillation (AF). Anterior (AML) and posterior (PML) mitral leaflets lengths were measured in the zoomed parasternal long-axis

(PLA) view at mid-diastole. On the same image tip leaflet thicknesses were also assessed. Maximal mitral annulus diameter was assessed in early diastole. Maximal superior displacement of each MV leaflet during systole (toward the left atrium) relative to the annulus line was measured in the PLA view by two-dimensional (2D) echocardiography. The antero-posterior coaptation point position of the mitral leaflets was assessed at end-systole and quantified by the leaflet coaptation height relative to systolic annulus diameter (AML projection/annular diameter (Fig 1D). Normally, the MV leaflets meet within the posterior 70% to 75% of the mitral annulus (16) because the posterior leaflet is shorter than the anterior one. According to previous publication, abnormal anterior coaptation (AAC) was defined by an anterior coaptation point < 60% (17). MR degree was assessed either by a quantitated or semi quantitated method according to current guidelines.

The diagnosis of mitral valve prolapse (MVP) was based on a superior displacement > 2 mm above the mitral annulus line of at least one leaflet in the PLA view(18, 19). Prodromal form (MVPprod) was defined as the conjunction of a minimal systolic displacement (MSD) of the MV leaflets < 2 mm and an AAC. Patients with either MVP or MVPprod were considered affected by the disease.

Supplemental Methods References.

1. Lindenbaum P, Le Scouarnec S, Portero V, and Redon R. Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinformatics*. 2011;27(22):3200-1.
2. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, and Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24-6.
3. Saito K, Ozawa Y, Hibino K, and Ohta Y. FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPase-activating protein for Rac, controls tumor cell migration. *Mol Biol Cell*. 2012;23(24):4739-50.
4. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, and Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006;22(2):195-201.
5. Benkert P, Biasini M, and Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011;27(3):343-50.

6. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Web Server issue):W252-8.
7. Fiser A, and Sali A. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics.* 2003;19(18):2500-1.
8. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, and Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-12.
9. Pronk S, Pall S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics.* 2013;29(7):845-54.
10. Mackerell AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B.* 1998;102(18):3586-616.
11. Mackerell AD, Jr., Feig M, and Brooks CL, 3rd. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem.* 2004;25(11):1400-15.
12. Jo S, Kim T, Iyer VG, and Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem.* 2008;29(11):1859-65.
13. Mallajosyula SS, Guvench O, Hatcher E, and Mackerell AD, Jr. CHARMM Additive All-Atom Force Field for Phosphate and Sulfate Linked to Carbohydrates. *J Chem Theory Comput.* 2012;8(2):759-76.
14. Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, Toquet C, Roy E, McGregor L, Lynch SA, et al. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation.* 2007;115(1):40-9.
15. Trochu JN, Kyndt F, Schott JJ, Gueffet JP, Probst V, Benichou B, and Le Marec H. Clinical characteristics of a familial inherited myxomatous valvular dystrophy mapped to Xq28. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(7):1890-7.
16. Nesta F, Leyne M, Yosefy C, Simpson C, Dai D, Marshall JE, Hung J, Slaugenhaupt SA, and Levine RA. New locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 13: clinical insights from genetic studies. *Circulation.* 2005;112(13):2022-30.
17. Delling FN, Gona P, Larson MG, Lehman B, Manning WJ, Levine RA, Benjamin EJ, and Vasan RS. Mild expression of mitral valve prolapse in the Framingham offspring: expanding the phenotypic spectrum. *J Am Soc Echocardiogr.* 2014;27(1):17-23.
18. Adams DH, Rosenhek R, and Falk V. Degenerative mitral valve regurgitation: best practice revolution. *Eur Heart J.* 2010;31(16):1958-66.
19. Freed LA, Levy D, Levine RA, Larson MG, Evans JC, Fuller DL, Lehman B, and Benjamin EJ. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med.* 1999;341(1):1-7.
20. Nakamura F, Heikkinen O, Pentikainen OT, Osborn TM, Kasza KE, Weitz DA, Kupiainen O, Permi P, Kilpelainen I, Ylanne J, et al. Molecular basis of filamin A-FilGAP interaction and its impairment in congenital disorders associated with filamin A mutations. *PLoS One.* 2009;4(3):e4928.

Supplemental Table 1. Rare *ARHGAP24* non-synonymous sequence variations detected in 272 MVP patients.

Non-synonymous rare (MAF<0.01) sequence variations identified in the target sequencing (kit Haloplex) of the 272 MVP patients cohort. Genomic positions refer to GRCh/Hg19 (Feb.2009), mRNA positions refers to RefSeq isoform NM_001025616.2 and protein positions correspond to NP_001020787.2. To evaluate *ARHGAP24* variants frequencies, we used the "[Exome Aggregation Consortium](http://exac.broadinstitute.org/)" (ExAC) database (Cambridge, MA, *exac.broadinstitute.org/*) containing Whole Exome Sequencing data from 60,706 unrelated individuals from 7 subpopulations. MAF: Minor Allele frequency = AC/AN where "AC" corresponds to Allele Count of alternative alleles and "AN" corresponds to the number of reference alleles genotyped at the position. "Novel" means that the variant is not found in the database and shaded variants indicate those analyzed in the present study.

Supplemental Table 2. Kinetics and steady state CI_{st} values of cell indexes measured in Xcelligence experiments.

Xcelligence numerical data presented in Fig 3A and B. Data were obtained from Hek293 cells transfected with control (pcdna3) and FilGAP-HA constructs or treated with control or FilGAP targeting siRNAs. dCI/dt were calculated between t_{30min} and $t_{1h30min}$. and the CI_{st} at $t=3$ hours. Values are means \pm SD of 6 experiments. Statistics are given in the legend of Fig 3.

Supplemental Table 3: FilGAP-P417H and T481M affect their interaction with FlnA and increase their cellular mobility.

Percentage of recovery and rate of recovery ($t_{1/2}$ in s) of mcherry tagged FilGAP measured in FRAP experiments on WT FlnA expressing (FlnA⁺)-HT1080 cells and FlnA depleted (KO) cells. Values of FilGAP-V734Y correspond to the mutant in which the previously FlnA/FilGAP binding interface is specifically impaired (20). ** indicates significant statistical difference ($p < 0.01$) versus WT-FilGAP. Note that there is no significant difference between any of the FilGAP constructs in the absence of FlnA. NT: not tested.

Supplemental Figure S1. Schematic representation of the four human FilGAP protein isoforms.

Alternative splicing of FilGAP mRNA results in 4 mRNAs encoding 4 isoforms that essentially differ on the presence the N-terminal pleckstrin homology domain. See Fig 1 legend for details.

Supplemental Figure S2. FilGAP amino acid R95, P417 and T481 are conserved between species.

Sequence alignment of FilGAP protein from different species showing that the 3 amino acids targeted by the MVP-associated mutations are highly conserved.

Supplemental Figure S3. FilGAP knock down in zebrafish.

A) Sequences of the two morpholinos used in the study and of the primers used to quantify extinction by QPCR. The efficacy of the knock down is shown in B. C) The survival of the fishes was not significantly modified morpholinos up to 140Hrs post fertilization.

Supplemental Figure S4. Histological features of the mitral valve tissue removed during the first surgical repair procedure of proband II:4 in “Family 2”: **A)** Elastic stain showing clearly the different layers of the leaflet. The architecture is well preserved. The endocardium (the atrialis and ventricularis) is moderately thickened. Elastic stain; original X 2.5. **B)** In the fibrosa the collagen fibers are disrupted by myxoid extracellular matrix. The spongiosa shows myxoid matrix overload. H&E stain; Original X 2.5. **C)** Higher magnification of the bounded area shows myxoid disruption of the fibrosa and myxoid matrix overload in the spongiosa. H&E stain; Original X 10. **D)** Higher magnification of the bounded area shows alcian blue positive matrix accumulating in the fibrosa and the spongiosa. Alcian blue stain; Original X 10. **E)** Section of a chordae tendinae: Myxoid disruption of the collagen fibers. H&E stain; Original X 10. **F)** Section of a chordae tendinae (CT). The collagen fibers of the core are disrupted by alcian blue positive matrix. Alcian blue positive stain; Original X10.

Supplemental Figure S5. FilGAP-R95Q mutation disturbs FilGAP’s pleckstrin homology domain structure.

Amino acids alignment of human FilGAP and ARHGAP25 (PDB Id 1V89) PH domains. Identical amino acids are in red and R95 is underlined. The beta strand and helical secondary structure predicted for FilGAP-WT and R95Q mutant are indicated by b and h, respectively. Note R95Q mutation mostly impacts $\beta 3$, $\beta 4$ and $\beta 5$ strands and consequently the lengths of $\beta 3$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\beta 6$ loop.

Supplemental Figure S6. FilGAP-R95Q modifies the flexibility of PH domain loops.

Comparison of Root Mean Square Fluctuations (RMSF) of the carbon atoms of the FilGAP-WT and R95Q mutant along the last 50 nanoseconds of the simulation. Note the $\beta 3$ – $\beta 4$ and $\beta 5$ – $\beta 6$ loops are more mobile and flexible in the mutant compared to WT whereas the reverse is true for the $\beta 6$ – $\beta 7$ loop.

Supplemental Figure S7. R95Q mutation destabilizes the salt bridge between R95 and E86

Computed distance (nanometer) during 500 ns simulation between CD atom of E86 and CZ atom of R95 in WT FilGAP or the NE2 atom of Q95 in FilGAP-R95Q. The stable and short distance (<0.5 nm) consistent with the presence of a salt bridge between E86 and R95 in WT-FilGAP is consistently higher in R95Q mutation.

Supplemental Figure S8. mCherry-FilGAP chimeras are functional.

The function of mCherry-FilGAP chimeras used in the FRAP experiments was tested in Xcelligence cell spreading assay. The absence of effect of the mCherry tag on FilGAP-WT and T481M function is shown. Similar data were obtained with R95Q and P417H mutants. ** significant difference ($p < 0.01$) between mCherry FilGAP-WT and T481M.

Supplemental Figure S9. mCherry-FilGAPs are expressed to similar levels in WT and FlnA-KO HT1080.

Western blot analysis of cellular lysates of WT and FlnA-KO HT1080 cells transfected with mCherry tagged FilGAPs. Anti-FlnA, anti-GFP and anti-GAPDH probing revealed over 80%

extinction of FlnA expression by shRNA and the similar expression levels of the different FilGAP constructs in both cell lines.

Supplemental video 1 and 2.

Live imaging videos 96hrs post fertilization showing blood cells regurgitation from the ventricle to the atrium in *ARHGAP24* knocked out (video 1) zebrafish but not in control one (Video 2).

Genomic position	mRNA position	protein position	AC	AN	Allele Frequency (AC/AN) European Non-Finnish (from ExAc Browser)
chr4:g.86491702A>G	c.8A>G	p.Glu3Gly	8	66188	MAF=1,21 10 ⁻⁴
chr4:g.86643057G>A	c.200G>A	p.Gly67Glu	68	66442	MAF=1,02 10 ⁻³
chr4:g.86844816G>A	c.284G>A	p.Arg95Gln	16	66546	MAF=2,40 10 ⁻⁴
chr4:g.86915928G>A	c.1121G>A	p.Cys374Tyr			NOVEL
chr4:g.86916057C>A	c.1250C>A	p.Pro417His	2	66738	MAF=3,00 10 ⁻⁵
chr4:g.86916249C>T	c.1442C>T	p.Thr481Met	88	66724	MAF=1,32 10 ⁻³
chr4:g.86921639C>T	c.2011C>T	p.Gln671*	1	66258	MAF=1,51 10 ⁻⁵

Supplemental Table 1, *ARHGAP24* non-synonymous sequence variations detected in 272 MVP patients.

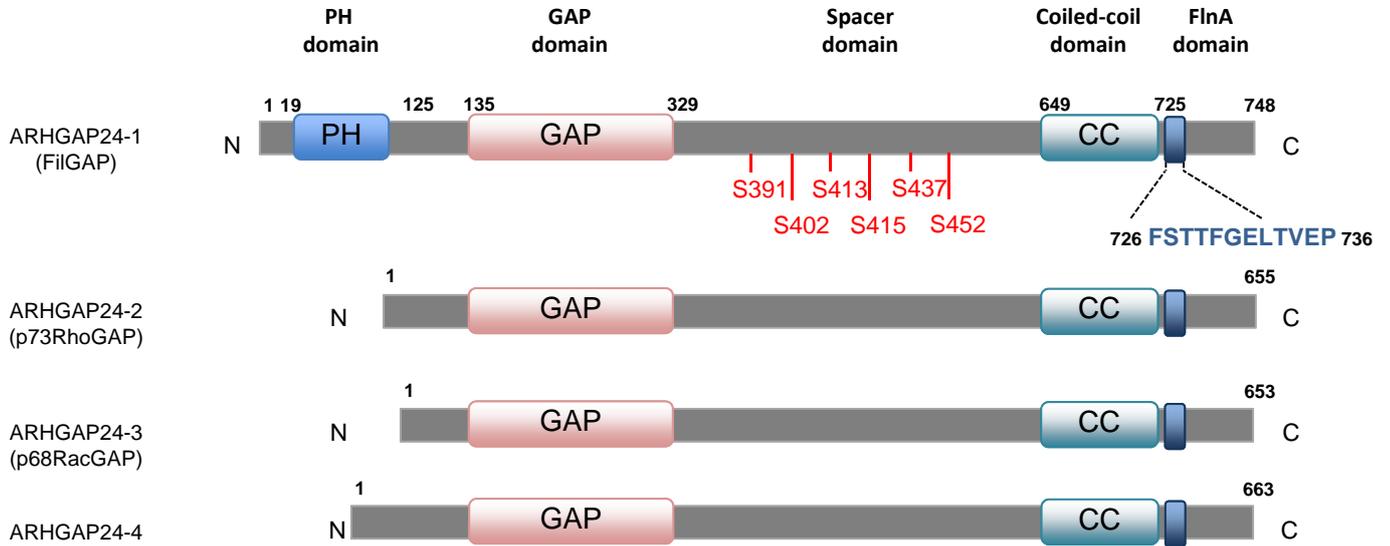
	Plasmide					siRNA	
	pcdna3	FilGAP				CTL	FilGAP
		WT	R95Q	P417H	T481M		
dCI/dt	0.105 +/- 0.016	0.095 +/- 0.009	0.119 +/- 0.016	0.116 +/- 0.015	0.125 +/- 0.02	0.105 +/- 0.01	0.188 +/- 0.021
CI _{st}	0.230 +/- 0.008	0.186 +/- 0.005	0.255 +/- 0.01	0.233 +/- 0.016	0.245 +/- 0.02	0.228 +/- 0.013	0.301 +/- 0.016

Supplemental Table 2, Kinetics and steady state CI_{st} values of cell indexes measured in Xcelligence experiments.

FlnA⁺-HT1080					
FilGAP	WT	R95Q	P417H	T481M	V734Y
Recovery (%)	76.2+/-3.0 n=16	77.1+/-2.1 n=13	86.5 +/-2.04 n=12**	86.2+/-2.0 n=15 **	91.3+/-2.5 n=7**
t _{1/2} (s)	11.19+/-1.02 n=16	10.62+/-0.49 n=13	7.32+/-0.47 n=12**	5.84+/-0.47 n=15**	5.50+/-0.55 n=7**
FlnA-KO HT1080					
Recovery (%)	89.5+/-1.6 n=10	94.2+/-2.9 n=6	94.1+/-2.9 n=9	91.3+/-2.5 n=11	NT
t _{1/2} (s)	4.52+/-0.81 n=10	4.62+/-0.35 n=6	6.08+/-0.93 n=9	5.70+/-0.61 n=11	NT

Supplemental Table 3. FilGAP P417H and T481M affect their interaction with FlnA and increase their cellular mobility

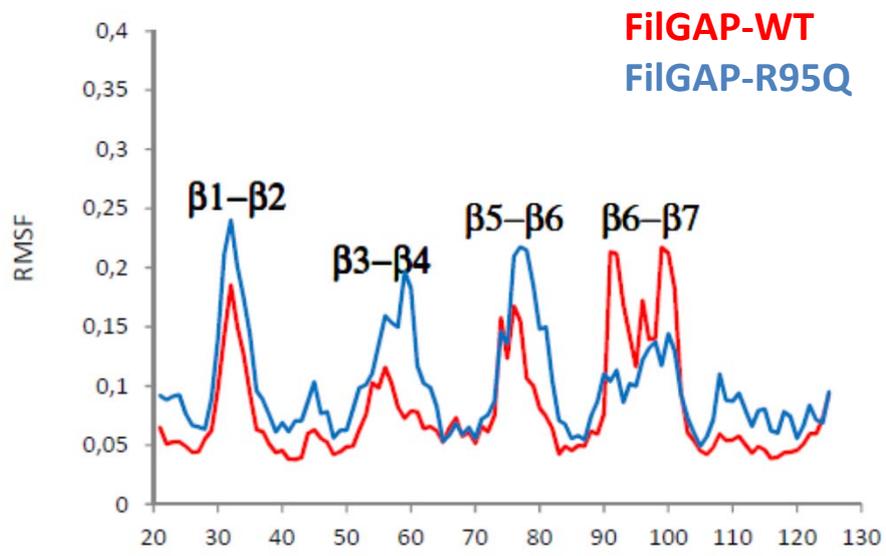
S1



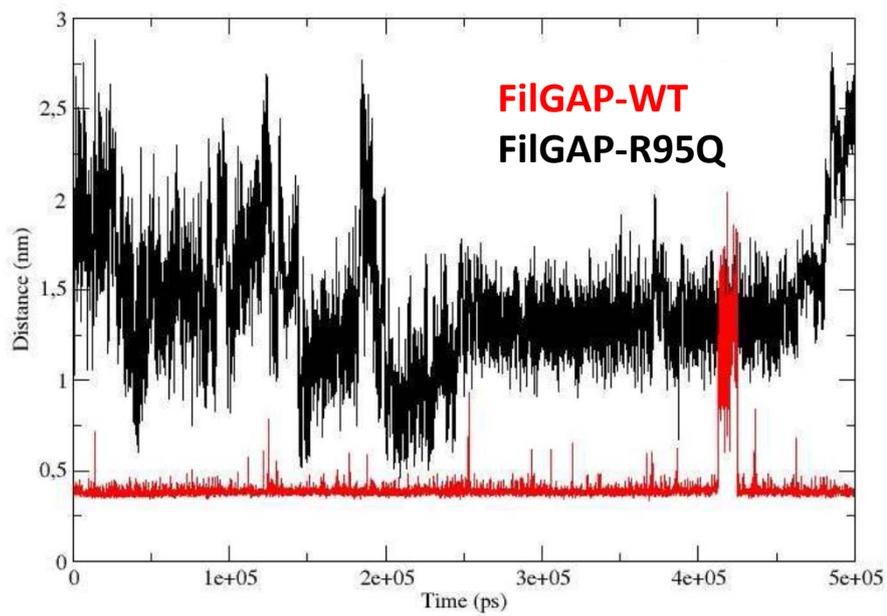
S2

	E3	G67	R95	C371	P417	T481
<i>Human</i>	ME E NND . . . FLP G NKV . . . DRD R MTA . . . SRQ C SWDK . . . RSP P LMV . . . QNG T VRM					
<i>Resus</i>	ME E NND	FLS G NKV	DRD R MTA	GRQ C SWDK	RSP P LMV	QNG T VRM
<i>Mouse</i>	ME E RCE	FLH G NKV	ERD R MTA	VRR C SWDK	RSP P LMV	QNG T VRM
<i>Rat</i>	ME E NC D	FLP G NKV	ERD R MTA	VRR C SWDK	RSP P LMV	QNG T VRM
<i>Pig</i>	ME E NHD	FLP G NRV	NRE R MTA	GRR C SWDK	RSP P LMV	QNG T VRM
<i>Cat</i>	ME E NND	FLP G NKV	DRD R MTA	GRR C SWDK	RSP P LMV	QNG T VRM
<i>Dog</i>	ME E NND	FLP G NKV	DRD R MTA	GRQ C SWSE	RSP P LMV	QNG T VRM
<i>Elephant</i>	ME E NND	FLP G NKV	DRD R MTA	GRQ C SWDK	RSP P LMV	QNG T VRM
<i>Chicken</i>	MDE H NG	-----	DRE R MTA	VRR C SWDK	RSP P LMV	PNGAVKM
<i>X_Tropicalis</i>	MDD D YNV	FLP G NRV	DRE R MTA	VRR C SWEK	RSP P LMV	QNG T VRM
<i>Zebrafish</i>	MGE L W P	FLP G NRV	EKD K AAM	ARQ C TWDA	RSP P LMV	QNGVVRM

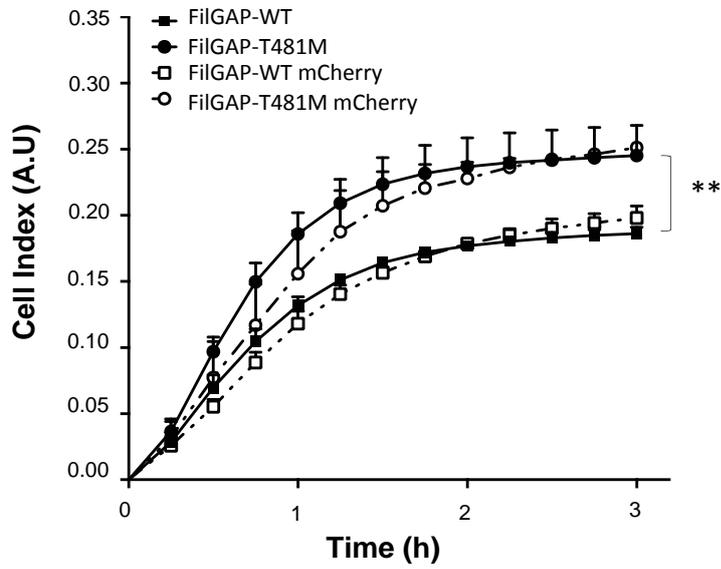
S6



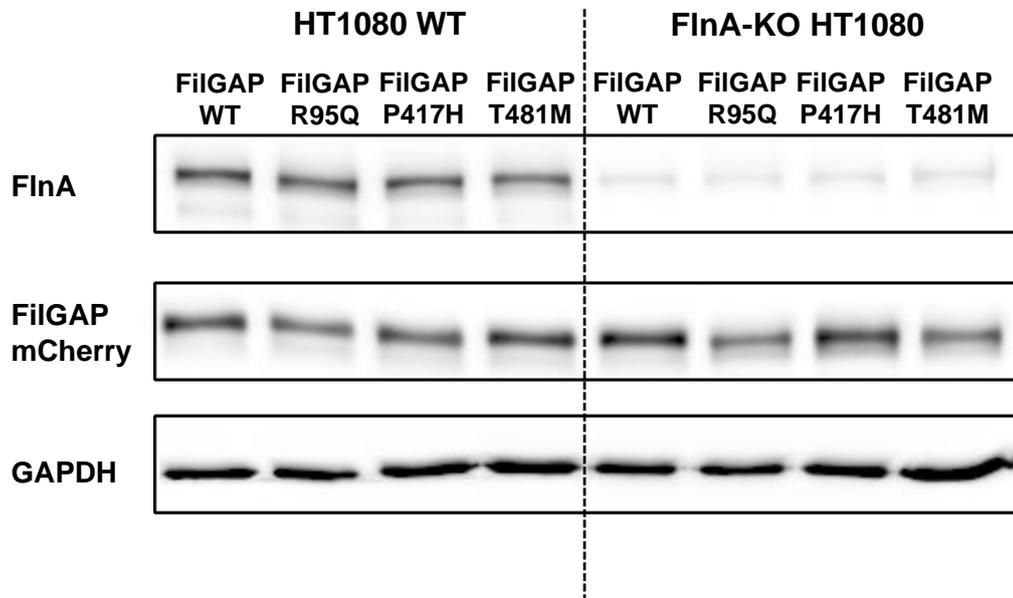
S7



S8



S9



➤ Conclusion du projet 1

La réalisation de ce projet a permis d'identifier, pour la première fois, le caractère héréditaire d'une forme spécifique de PVM de dégénérescence fibro-élastique (FED) préalablement décrite comme une affection dégénérative. Nous avons identifié des mutations perte de fonction du gène *ARHGAP24* comme responsable de cette forme héritée de PVM. L'identification de ces mutations a permis l'étude des processus moléculaires et fonctionnels dans des modèles cellulaires et animaux. Nous renforçons ainsi les observations précédentes impliquant les mécanismes de régulation du maintien du cytosquelette d'actine et leur régulation par les GTPases monomériques dans la survenue du PVM. Les PVM de type FED présentent des complications importantes liées à la survenue de rupture de cordages sans manifestations préalables de symptômes avant-coureurs. Ces observations permettront une surveillance clinique spécifique des patients apparentés mutés pour lesquels la pathologie n'est pas diagnostiquée à l'heure actuelle.

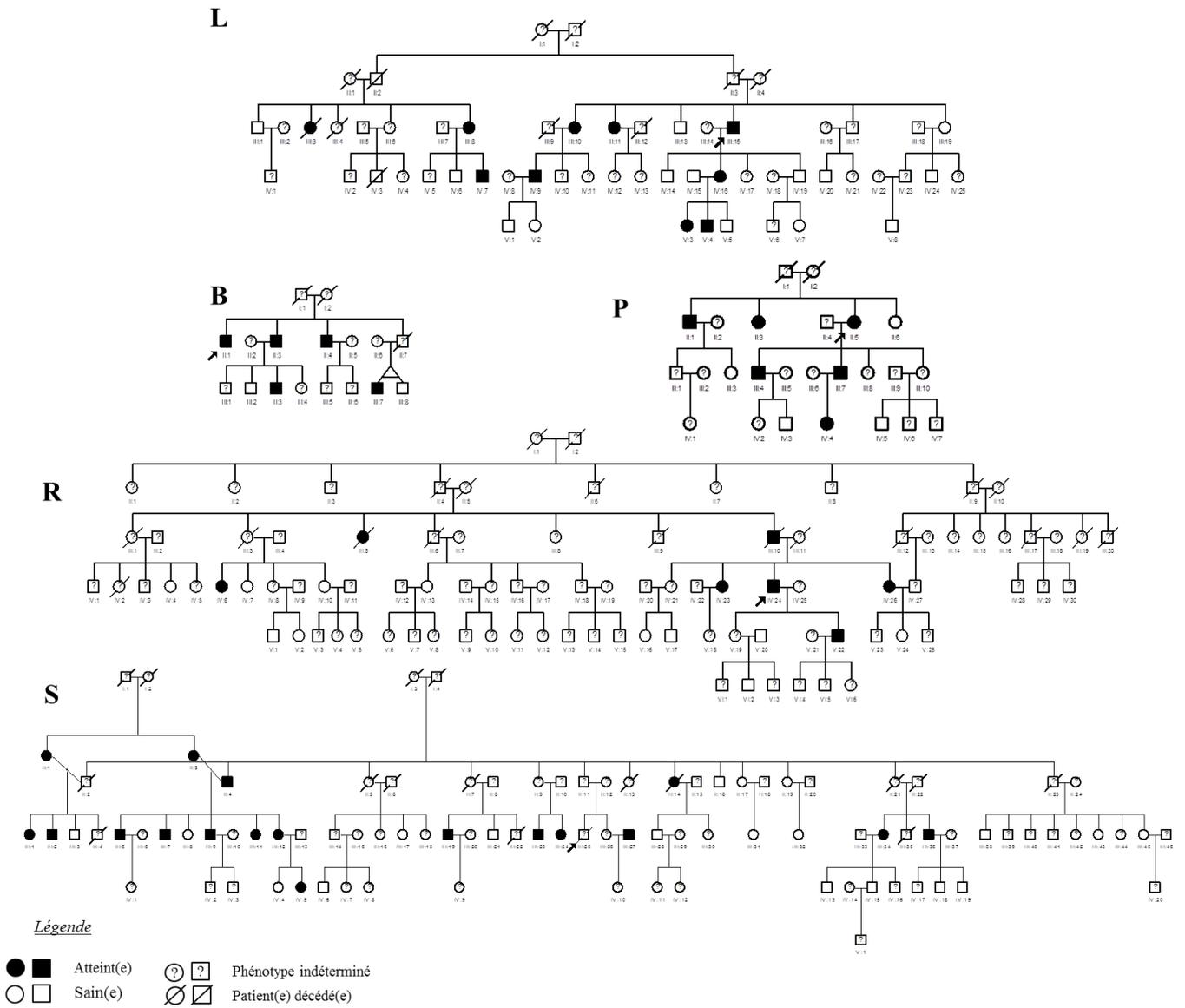


Figure 18: Arbres généalogiques des cinq familles étudiées

Projet #2

Recherche de nouveaux gènes responsables de formes familiales de PVM

Le but de ce projet, est **d'identifier de nouveaux gènes responsables** de PVM familial non syndromique afin de mieux **comprendre les mécanismes de survenue de la pathologie**.

Le travail présenté a été réalisé à partir de cinq familles atteintes de PVM (Figure 18). Les statuts phénotypiques des individus ont été classés en trois catégories. Les sujets sont diagnostiqués **atteints** si le déplacement valvulaire d'au moins une des valvules mitrales (prolapsus) est **supérieur ou égal à deux millimètres au-dessus du plan de l'anneau** (Adams, Rosenhek, and Falk 2010) ou sains s'ils ne présentent **pas de prolapsus ni d'épaississement valvulaire (supérieur à trois millimètres)**. Dans les autres cas les patients sont désignés comme **indéterminés***.

L'approche génétique utilisée consiste à combiner l'identification de régions IBD (pour **identité par descendance**) et le **séquençage d'exome complet afin d'identifier les variants rares retrouvés dans les régions codantes du génome**. Les approches utilisées se réfèrent à plusieurs bases de données et reposent sur des méthodes de capture, séquençage et génotypage de nouvelle génération. Pour des raisons de clarté et de cohérence de présentation des résultats, les méthodes seront succinctement décrites. Cependant, l'ensemble des matériels et méthodes utilisées sont détaillés en annexes pages 136 à 160.

La recherche de régions IBD permet d'identifier les régions génomiques partagées par les individus atteints d'une même famille grâce aux données de **génotypage haut-débit sur génome entier**. Le **séquençage d'exome complet** nous permet ensuite d'identifier les variations génétiques retrouvées dans les régions codantes du génome.

Ainsi, nous pouvons focaliser nos analyses*, sur les variants génétiques retrouvés **dans les régions IBD, fonctionnels** (ayant un impact potentiel sur la séquence protéique et/ou sur les sites d'épissage), **rares** (vis-à-vis des bases de données publiques et internes) et identifiés par **deux algorithmes** de « calling » (GATK Unified Genotyper et Samtools mpilup)*.

Dans certains cas, l'informativité des familles et les méthodes génétiques utilisées ne permettent pas d'exclure suffisamment de variants pour identifier les variants causaux. Ainsi nous réalisons une **priorisation** des variants à partir de données d'**expression*** et de **conservation inter-espèces***.

* Les étapes d'analyses phénotypiques et génétiques sont décrites dans les matériels et méthodes (chapitre IV.1 et IV.2)

II.2.1 Famille B

II.2.1.1 Résultats des investigations cliniques de la famille B

Le recrutement de la famille B a débuté suite à l'identification d'un patient souffrant d'un PVM bivalvulaire de type Barlow (patient II:1, Figure 19). Ce patient a bénéficié d'une plastie mitrale à l'âge de 49 ans et le compte rendu opératoire décrit des valvules épaissies avec élongation de cordages et dilatation de l'anneau. De plus le frère de ce patient (II:3, Figure 19) a aussi bénéficié d'une plastie mitrale à l'âge de 62 ans sur un PVM de type Barlow. En plus du phénotype mitral, ces deux patients présentent des affections plurivalvulaires avec des valvules aortiques remaniées (tricuspides), une ballonnisation de la valve tricuspide et une dilatation de l'anneau tricuspide.

Le recrutement familial a permis d'identifier trois nouveaux patients atteints de PVM au sein de la famille (Figure 19). L'échocardiographie du patient III:7, âgé de 43 ans est présenté sur la Figure 20 et les données cliniques des patients atteints de la famille sont présentées dans le Tableau 4. Les deux patients III:7 et III:8, sont jumeaux monozygotes, cependant un seul des deux est atteint suggérant une pénétrance incomplète (III:8) ou l'existence d'une phénocopie (III:7).

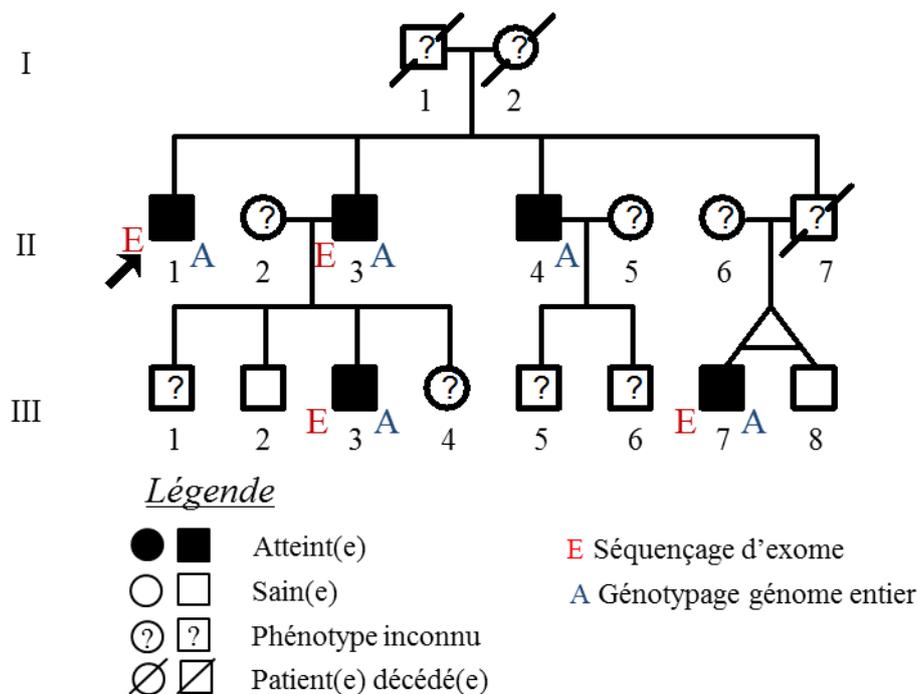


Figure 19: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille B

Les individus III:7 et III:8 sont jumeaux monozygotes

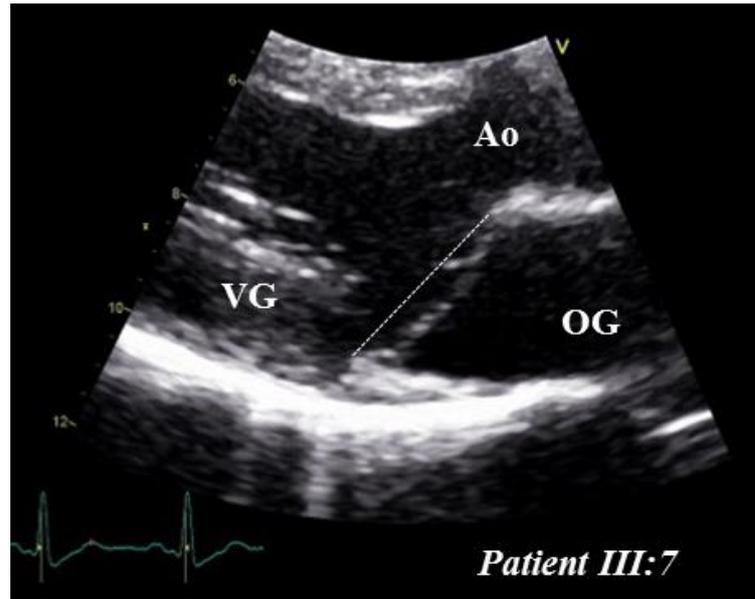


Figure 20 : Examen écho-cardiographique du patient III:7 de la famille B

L'image permet de visualiser un prolapsus bivalvulaire lors de la systole ventriculaire gauche (Prolapsus valvule mitrale antérieure = -3,3mm et prolapsus de la valvule mitrale postérieure = -3,9 mm)

Individu	Phénotypes	Prolapsus V. Ant	Prolapsus V. Post	Âge
II:1	Atteint	Plastie mitrale (49 ans)		75
II:3	Atteint	Plastie mitrale (62 ans)		74
II:4	Atteint	-	-	76
III:7	Atteint	-3,3 mm	-3,9 mm	43
III:4	Atteint	-	-	47

Tableau 4: Données cliniques des 5 patients atteints de la famille B

Les mesures de prolapsus des valvules mitrales, antérieure (V. Ant) et postérieure (V. Post) sont reportées en millimètres. Les mesures négatives correspondent aux mesures au-dessus du plan de l'anneau.

II.2.1.2 Résultats et discussion des investigations génétiques et fonctionnelles de la famille B

• **Identification de régions génomiques partagées par les individus atteints**

A partir des données de génotypage des cinq patients atteints de la famille (II:1, II:3, II:4, III:3, III:7) nous avons recherché les régions identiques par descendance (IBD) partagées par les cinq individus atteints génotypés.

Le nombre de paires d'atteints maximal partageant des régions génomiques IBD est de neuf ($\lfloor \frac{n*(n-1)}{2} \rfloor - p^{p/e} = 9$) (Avec n le nombre d'individus atteints génotypés (n=5) et $p^{p/e}$ le nombre de paires parent/enfant ($p^{p/e}=1$); La paire parent/enfant correspond à la paire II:3/III:3). Les régions atteignant ce seuil sont présentées sur la Figure 21.

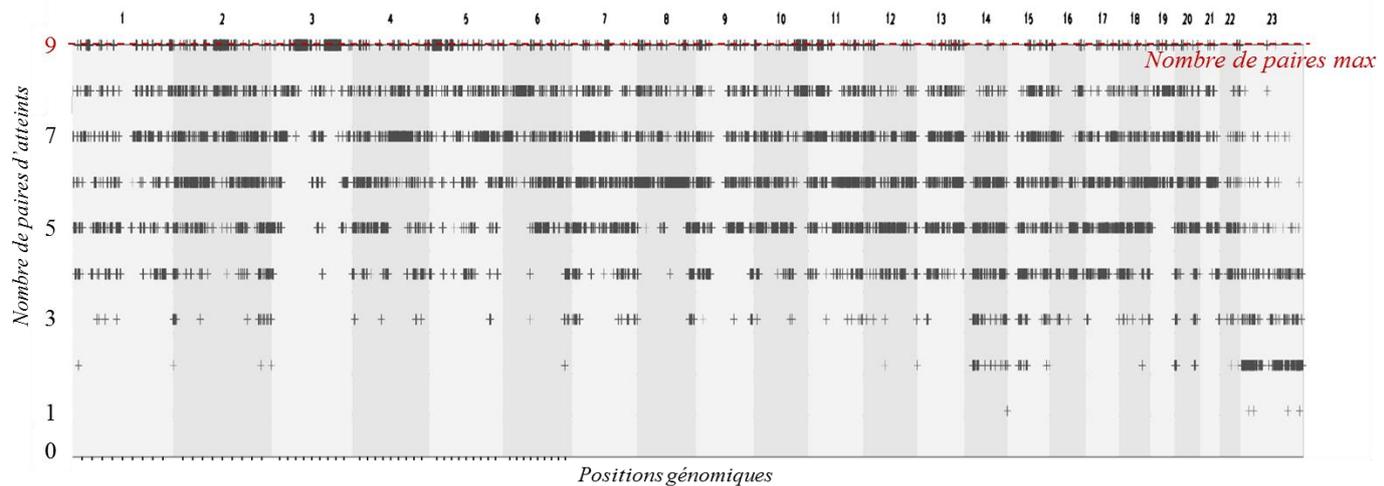


Figure 21: Représentation des régions IBD partagées par les individus atteints de la famille B

Chaque variant génotypé (puces Affymetrix 250K) est représenté en fonction de sa position génomique (abscisse) et du nombre de paires d'individus atteints qui le partage (ordonnées).

• **Identification des variants rares au sein des régions IBD puis priorisation**

Le séquençage des quatre exomes réalisés pour cette famille présente des données de couvertures moyennes supérieures à 40X (III:7=56X, II:2=56X, II:1=47, III:4=55X) nécessaires à l'analyse.

Ainsi, l'analyse des données de séquençage d'exome de ces quatre patients a permis d'identifier 23 variants rares fonctionnels partagés par les quatre patients atteints. De plus, neuf de ces variants sont retrouvés dans les régions IBD (Tableau 5).

		III:7	II:2	II:1	III:4
Variants fonctionnels VEP	GATK	16694	17018	16758	17047
	Samtools	14349	14141	15198	15361
1000 Génomes, EVS (MAF<1%)	GATK	3561	3815	2377	2568
	Samtools	1223	1418	1185	1222
UK10K, CG, GoNL	GATK	2179	2431	1328	1480
	Samtools	715	625	569	584
Bases de données internes	GATK	659	776	544	604
	Samtools	457	445	457	482
ExAC_NFE (MAF<0.1%)	GATK	372	419	345	386
	Samtools	310	311	313	337
2 algorithmes	GATK/samtools	68	70	231	260
Partagés par les 4 individus	GATK/samtools	23			
Régions IBD (9 paires max)	GATK/samtools	9			

Tableau 5: Analyses combinées des données de séquençage d'exome et des régions IBD identifiées.

Les filtres successifs d'analyse d'exome ont été réalisés avec l'outil Knime4bio et permettent de conserver les variants fonctionnels décrits par Variant Effect Predictor (VEP), rares (bases de données publiques et internes), retrouvés par les deux algorithmes de « calling » et partagés par les individus atteints au sein des régions IBD. (Les étapes de l'analyse et les bases de données utilisées sont décrites dans le matériel et méthodes chapitre IV.2.2.4)

A ce stade, les analyses de co-ségrégation réalisées ne permettent d'exclure aucun variant identifié. Nous avons ensuite priorisé les variants à partir de données d'**expression génique au sein de la valve mitrale** et de la **conservation inter espèces des bases nucléotidiques substituées** (score GERP) (Tableau 6) (matériel et méthodes chapitre IV.2.7 et IV.2.2.3).

Les variants identifiés possèdent des scores de conservation GERP importants (1,71 à 5,27), cependant, quatre sont retrouvés dans des gènes faiblement exprimés au sein de la valve mitrale (*ADAM12*, *SCTR*, *OR2AJ1*, *OR7A17*) (Tableau 6).

Position génomique (GRCh37)	Position ADNc	Position protéique	MAF (ExAC_NFE)	Gène	Expression valve mitrale	Score GERP
Chr10:g.129217946G>A	c.4646G>A	p.Arg1549Q	1,3E-04	<i>DOCK1</i>	15,37	4,88
Chr2:g.118588196G>A	c.1909G>A	p.Gly637Ser	2,1E-04	<i>DDX18</i>	20,92	4,83
Chr10:g.105361869C>T	c.2707C>T	p.Ala903Thr	2,7E-04	<i>SH3PXD2A</i>	7,42	5,27
Chr10:g.102269198C>T	c.274C>T	p.Gly92Arg	-	<i>SEC31B</i>	4,55	3,51
Chr19:g.57326356C>T	c.3454C>T	p.Glu1152Lys	-	<i>PEG3</i>	3,16	4,33
Chr10:g.127797240A>G	NA	région d'épissage	-	<i>ADAM12</i>	0,95	2
Chr2:g.120231045G>A	c.389G>A	p.Ser130Phe	-	<i>SCTR</i>	0,28	3,9
Chr1:g.248097753T>A	c.683T>A	p.Met228Lys	5,4E-04	<i>OR2AJ1</i>	0,00	3,89
Chr19:g.14992056T>C	c.112T>C	p.T38A	1,5E-04	<i>OR7A17</i>	0,00	1,71

Tableau 6: Variants rares partagés par les 4 individus atteints séquencés de la famille B et retrouvés dans les régions IBD

Les fréquences de l'allèle mineure (MAF) sont issues de la base de données Exome Aggregation Consortium (ExAC) pour la population européenne non finlandaise (NFE). Les données d'expression génique au sein de la valve mitrale sont exprimées en FPKM (pour « Fragment per Kilobase of exon per million reads mapped »)

Nous avons porté notre attention sur le variant retrouvé dans le gène *DOCK1*. D'une part ce variant substitue un nucléotide très conservé (GERP 4,88), est retrouvé dans un gène **fortement exprimé** dans la valve mitrale (15,37 FPKM) et d'autre part le gène *DOCK1* est un très bon gène candidat qui lors de son invalidation dans un modèle murin provoque d'importants défauts valvulaires mitraux (Sanematsu et al. 2010). De plus *DOCK1* est un acteur important du remodelage du cytosquelette d'actine dont nous avons démontré l'implication à partir de l'identification des gènes *ARHGAP24* et *FLNA* dans la pathogénèse du PVM.

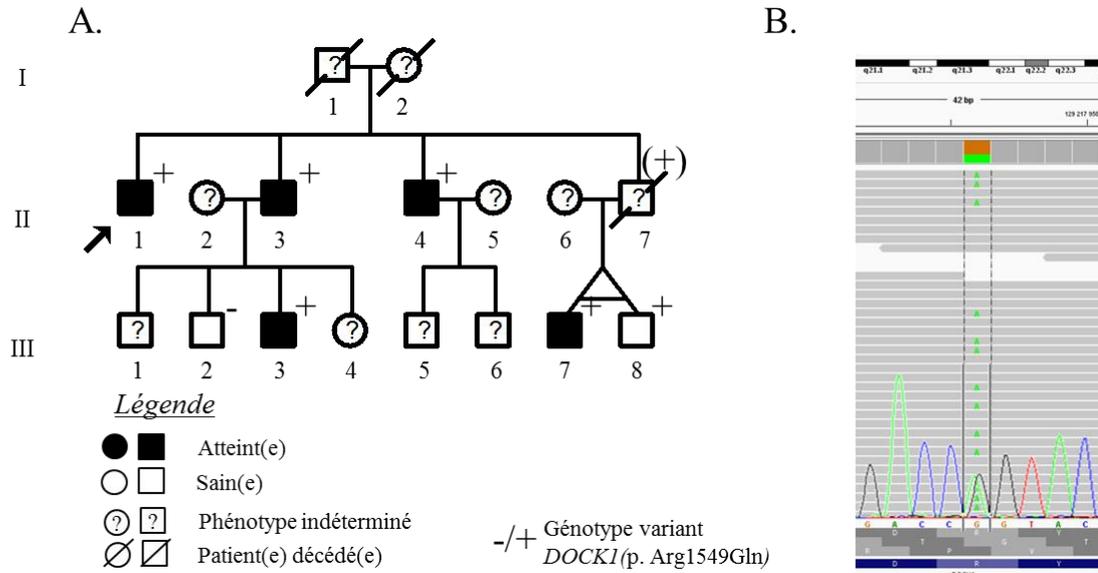


Figure 22: Analyse de co-ségrégation du variant *DOCK1* (p.Arg1549Gln) avec le PVM au sein de la famille B

A Visualisation de la co-ségrégation du variant *DOCK1* (p.Arg1549Gln) au sein de la famille B. + correspond à la présence du variant à l'état hétérozygote, - à son absence. B. La présence de ce variant a été visualisée sur l'outil d'alignement IGV des « reads » issus du séquençage d'exome. Cet alignement permet de visualiser la présence de l'allèle alternatif (A) pour environ la moitié des reads alignés. De plus, la présence de ce variant a été validée par séquençage capillaire (électrophorégramme correspondant superposé aux alignements IGV).

- **Hypothèses physiopathologiques de l'implication du variant *DOCK1* (p.Arg1549Gln)**

DOCK1 code pour la protéine Dock180 qui a d'abord été identifiée par son interaction avec les adaptateurs protéiques CRK (Hasegawa et al. 1996). La superfamille des protéines Dock180 (« Deducator of cytokinesis 180kD ») est très conservée au cours de l'évolution et ses membres correspondent à des « GTP Exchange Factor » (GEF) des petites protéines G de la famille des Rho GTPases (Ras Homolog GTPases). Comme vu précédemment, nous avons successivement démontré l'implication de la voie du remodelage du cytosquelette d'actine par les petites GTPases *via* l'identification des gènes *ARHGAP24* et *FLNA* au sein de familles atteintes de PVM. De plus, cette famille de protéines est impliquée dans un grand nombre de processus, en particulier dans la physiologie cardiovasculaire (Côté and Vuori 2002) (Loirand, Sauzeau, and Pacaud 2013).

Les GEF sont des protéines capables d'activer et de maintenir l'état actif des Ras GTPases, en facilitant l'échange de GDP en GTP (Loirand, Sauzeau, and Pacaud 2013) (Figure 23).

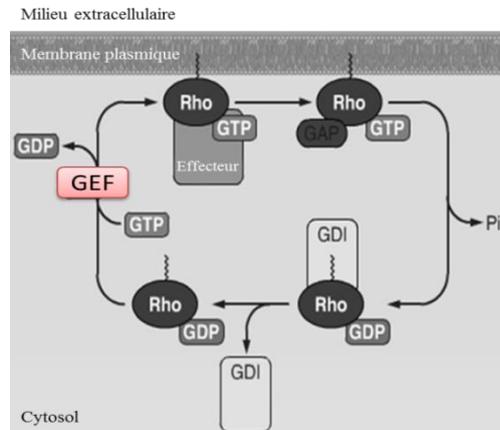


Figure 23: Représentation schématique de l'activité GEF pour les protéines de la famille des RhoGTPases

L'activation des protéines Rho est médiée par une GEF (Guanine exchange factor). Le chargement de GTP sur les protéines Rho induit leur translocation à la membrane où elles interagissent avec leurs effecteurs. Le retour à l'état inactif des protéines Rho est médié par les « GTPases activating protein » (GAP). L'état inactif des protéines Rho est prolongé par le « guanine nucleotide-dissociation inhibitor » (GDI) par la séquestration du complexe Rho-GDP.

(D'après (Loirand, Sauzeau, and Pacaud 2013))

Les études sur les modèles de drosophiles puis C-elegans, ont démontré que les gènes orthologues de *DOCK1* (Mbc (drosophile) et CED-5 (C-elegans)) sont des médiateurs **spécifiques de Rac1** qui est lui-même impliqué dans le **remodelage du cytosquelette d'actine** (Nolan et al. 1998) (J.-F. Côté and Vuori 2002) (Braga 2002). Cette activation est impliquée dans de nombreux processus biologiques, comme : la phagocytose des cellules apoptotiques (Wu and Horvitz 1998) (Albert, Kim, and Birge 2000), la myogénèse (Erickson, Galletta, and Abmayr 1997) (Moore et al. 2007), **la migration et la contraction cellulaire** (B. Wu et al. 2011) (Gumienny et al. 2001) (Cheresh, Leng, and Klemke 1999). Dock180 catalyse les échanges de GDP en GTP en activant la Rho GTPase **Rac1 spécifiquement** (Brugnera et al. 2002).

Il a été montré successivement dans des modèles de zebrafish puis murin que Dock180 était nécessaire à la formation des myotubes (Moore et al. 2007) (Laurin et al. 2008). De plus, en 2010, il a été démontré que les embryons de modèles murins déplétés pour le gène Dock1 (ou déplétés pour sa partie N-terminale (domaine SH3)), n'étaient pas viables à cause de

malformations cardiaques conduisant à de larges œdèmes embryonnaires. **Les embryons présentent des défauts de septation ventriculaire et des valvules mitrales anormalement épaissies voire fusionnées conduisant à une rétention sanguine dans l'oreillette gauche** (Sanematsu et al. 2010) (Figure 24).

Les auteurs montrent successivement, que la déplétion de *Dock1* n'influe pas sur la capacité des cellules endocardiques à réaliser la transition épithélio-mésenchymateuse, mais qu'en revanche, les **capacités invasives** des cellules au sein d'une matrice de collagène **sont diminuées**. De ce fait, les embryons présentent une **diminution de la cellularisation des coussins valvulaires**. De plus les auteurs avancent des arguments en faveur de l'implication des récepteurs CXCR4 dans l'activation de la cascade de signalisation Dock180 lors d'une activation par son ligand CXCL12 indépendante du VEGF. En définitive, cette étude montre que la **signalisation de Rac1, médiée ici par l'activation de Dock180 est un acteur majeur de la migration endothéliale dans le cadre du développement cardiovasculaire**. Les défauts de développement cardiaque multiples retrouvés dans ces modèles sont concordants avec les phénotypes valvulaires multiples observés chez les patients de la famille.

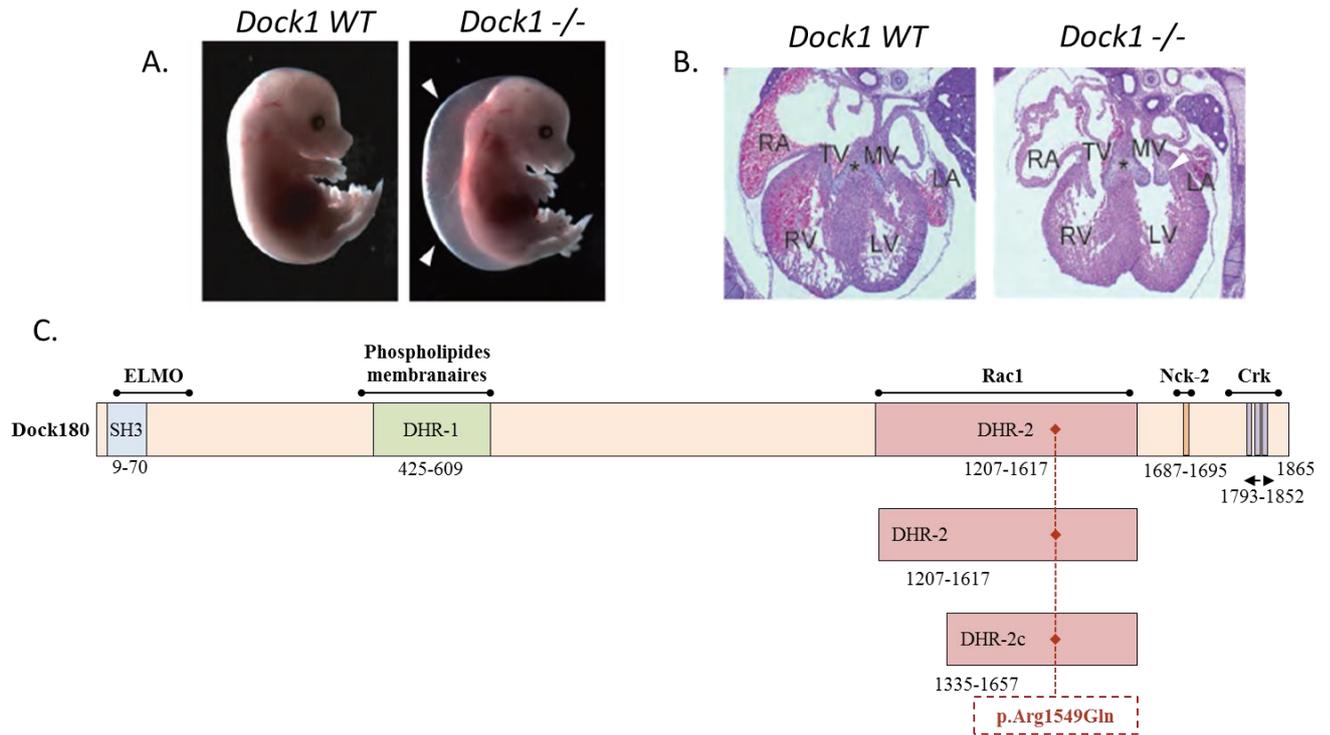


Figure 24: Défaut développementaux du modèle murin déplété pour le gène *Dock1* et représentation schématique de la protéine *Dock180* humaine

A. Morphologie des embryons murins déplétés pour le gène *Dock1* (jour E14,5). Les flèches indiquent les œdèmes dus à des défauts du développement cardiovasculaire B. Coupe histologique du tissu cardiaque d'embryon murin déplété pour le gène *Dock1* de 14,5 jours. Les valvules mitrales du modèle knockout, apparaissent largement épaissies et dysmorphiques [Images issues de l'étude (Sanematsu et al. 2010)]. C. La protéine *Dock180* codée par le gène *DOCK1* est constituée d'un domaine SH3 dans sa partie N-terminale qui permet son interaction avec la protéine ELMO, d'un domaine DHR-1 qui interagit avec les phospholipides membranaires, un domaine DHR-2 d'interaction avec *Rac1* et deux domaines en C-terminal de la protéine, qui permettent l'interaction avec *Nck2* et *Crk*. Les domaines DHR-2 et DHR-2c ont successivement été montrés comme responsables de l'activité GEF de *Dock180*.

La protéine *Dock180* comporte cinq domaines fonctionnels (Figure 24). Le variant (NM_001380 : *DOCK1* : p.Arg1549Gln) est retrouvé dans le domaine DHR-2 (pour *Dock180* homology region 2) aussi appelé domaine « docker ». Ce domaine est responsable de l'activité GEF de *dock180* grâce à son interaction avec *Rac1*. Ce domaine permet, à lui seul, de conférer l'activité GEF à la protéine dans des conditions *in-vitro*. Il a été démontré successivement que le domaine nécessaire à cette activité était compris entre les acides aminés 1335-1657 où est situé notre variant d'intérêt (NM_001380 :NP_001371.1 :*DOCK1*) (J.-F. Côté and Vuori 2002; Braga 2002; X. Wu et al. 2011)(Figure 24).

➤ **Implications fonctionnelles du variant *DOCK1* (p.Arg1549Gln)**

Afin d'investiguer les répercussions de ce variant sur la fonction protéique de Dock180, nous avons réalisé une surexpression de Dock180-WT (humaine) et de Dock180-muté (R1549Q) dans des modèles cellulaires Hek293 et HT-1080. Étant donné l'implication de la protéine Dock180 dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaires, nous avons évalué ces caractéristiques par des études fonctionnelles cellulaires.

Mesure d'adhésion et d'étalement au cours du temps par la technique d'xCELLigence

La surexpression de Dock180 a été effectuée grâce à la transfection de vecteurs plasmidiques pCAGGS-EGFP-DOCK1-WT ou pCAGGS-EGFP-DOCK1-R1549Q dans des cellules Hek293. Les cinétiques d'adhésion et d'étalement cellulaire sont mesurées par la technique d'xCELLigence (Matériel et méthodes IV.3.5). Nous avons ainsi mesuré les cinétiques d'étalement et d'adhésion de cellules transfectées pendant 6 heures.

Les taux de transfection cellulaire sont évalués grâce aux constructions tagguées GFP. Les taux de transfection obtenus sont d'environ 50% pour les constructions dock1 (wt et mutés) et de plus de 70% pour la construction p.EGFP. Les courbes obtenues, (Figure 25) représentent l'augmentation de l'étalement et de l'adhésion cellulaire au cours du temps. Les mesures ont été réalisées à partir de 10 000 cellules en triplicata (n=3).

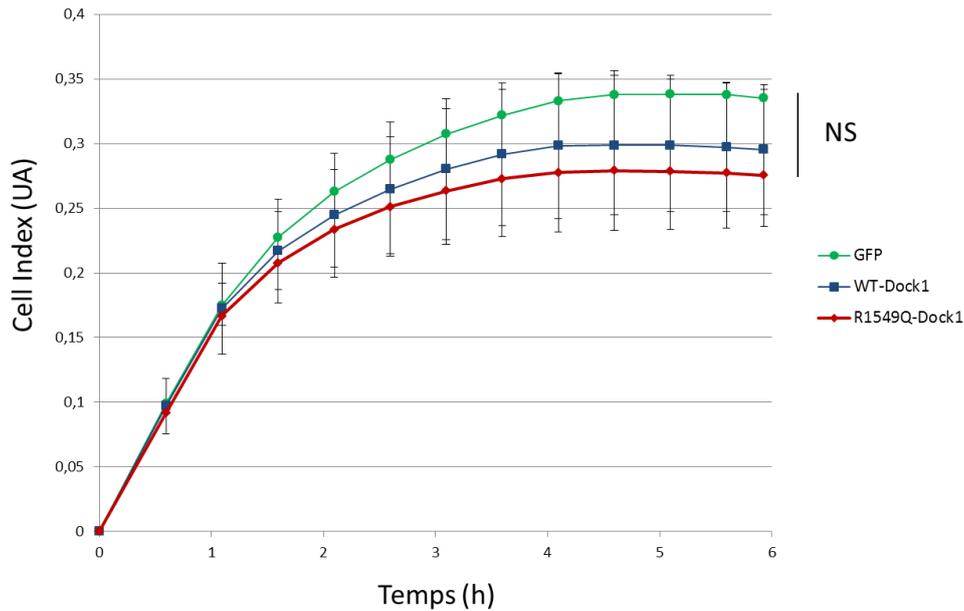


Figure 25: Cinétique d'adhésion cellulaire en fonction du temps de cellules Hek293 transfectées avec des constructions plasmidiques (pCAGGS-EGFP-DOCK1-WT ; pCAGGS-EGFP-DOCK1-R1549Q et pEGFP)

Les mesures d'adhésion (en unités arbitraires, traduites en Cell Index) sont réalisées pendant 6 heures et atteignent un plateau à partir de 4h. Les mesures présentées sont espacées de 30 minutes par souci de lisibilité. Les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives, sur les cinétiques d'adhésion et d'étalement (NS)

Les cinétiques d'adhésion atteignent un plateau à 4h. De plus les cinétiques observées ne permettent pas d'observer de différences significatives de comportement cellulaire en fonction de la construction transfectée. De manière surprenante, la surexpression de Dock180 ne semble pas avoir d'effet sur les capacités d'adhésion et d'étalement cellulaire (décrite dans la littérature) et la surexpression de la forme mutée de Dock180 ne semble pas affecter ces cinétiques.

Mesure des cinétiques de migration des cellules HT1080 par la technologie cytoo

Les cellules de fibrosarcome (HT1080) ont été transfectées avec les constructions Dock1 tagguées GFP précédemment présentées (wt et mutées p.R1549Q). La technologie « cytoo migration assay » permet de visualiser et de mesurer les cinétiques de migrations cellulaires unidimensionnelles. Les cellules sont placées dans des puits au fond desquels sont « gravés » des rails d'écartement précis en fonction du type cellulaire étudié. La migration des cellules est ensuite suivie grâce à l'acquisition d'images toutes les 10 minutes pendant 16h grâce à un microscope à fluorescence et à un logiciel dédié (MetaMorph) (Figure 26). Les

images sont ensuite visualisées sur le logiciel ImageJ pour permettre une mesure de distance parcourue par les cellules en fonction du temps.

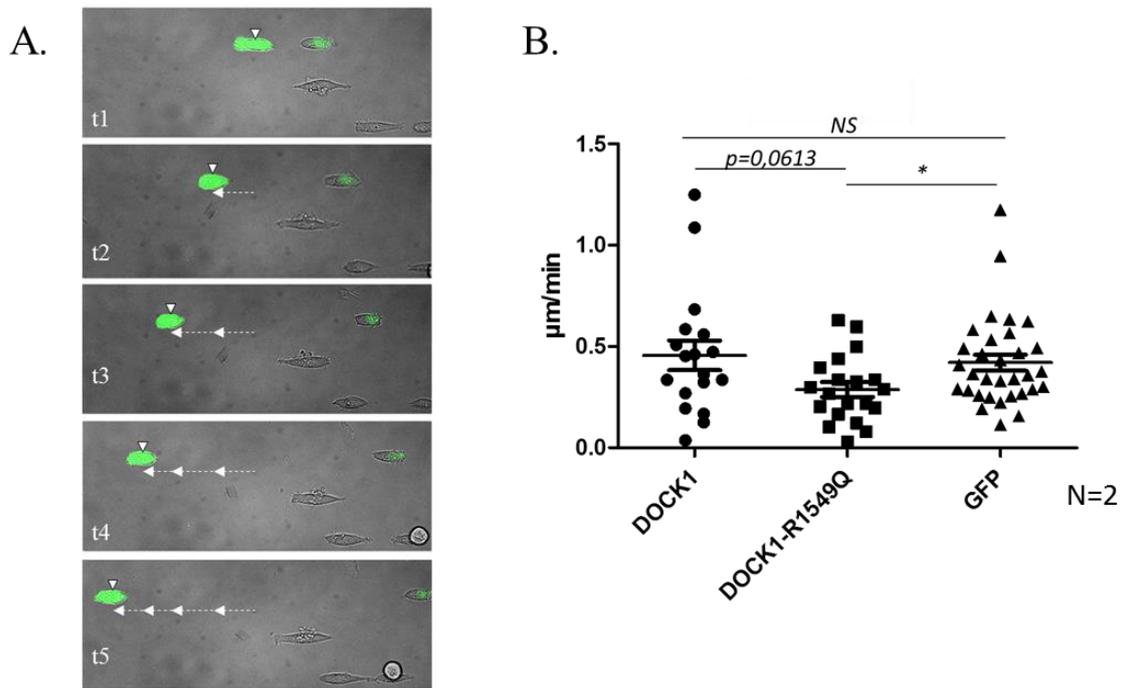


Figure 26: Visualisation de la migration et quantification de la vitesse de migration cellulaire unidimensionnelle grâce à la technologie cytoo de cellules HT1080 surexprimant les formes WT ou muté de Dock180

A. Les cellules (HT1080) visualisées, sont transfectées avec la construction plasmidique pCAGGS-EGFP- Dock1-wt. Les acquisitions sont réalisées à 10 minutes d'intervalle par microscopie à fluorescence puis en lumière blanche (superposées sur la figure) B. La migration des cellules a été réalisée sur plaques « cytoo migration assay » en fonction de la surexpression de constructions plasmidiques dock1-WT, dock1-R1549Q et gfp. La vitesse de migration cellulaire est exprimée en μm par minute. Les moyennes et écart types sont représentés sur la figure (* $p < 0.05$; NS non significatif) (n=2)

Les vitesses de migration cellulaires sont présentées en μm par minute et sont très variables en fonction des cellules. Ces expérimentations préliminaires ne permettent pas de mettre en évidence une augmentation des cellules surexprimant Dock180 vis-à-vis des cellules contrôles (exprimant la GFP) (NS : Figure 26).

Les cellules surexprimant Dock180-R1549Q présentent une diminution significative de la vitesse de migration cellulaire vis-à-vis des contrôles mais ne présentent pas de différence significative vis-à-vis de la surexpression de dock1-wt (Figure 26) (Dock1-R1549Q vs GFP ($p < 0,05$), Dock1-R1549Q vs Dock1-wt (NS)). L'analyse des acquisitions a permis d'identifier

une forte mortalité cellulaire au cours du temps des cellules transfectées avec les constructions plasmidiques pCAGGS-EGFP-Dock1 (wt ou mutées).

Les **manipulations fonctionnelles préliminaires** de mesure d'adhésion et de migration, ne permettent pas de mettre en évidence **d'effet de la surexpression de la protéine wt ou mutées au sein des lignées cellulaires étudiées.**

Ces observations peuvent être dues à plusieurs paramètres. Il est possible que les conditions d'observations (culture 2D) de ces cellules ne soient pas adaptées pour l'observation des phénotypes cellulaires recherchés. De plus Dock180 est une protéine de taille importante (180kDa) et les activités transcriptionnelles et traductionnelles cellulaires sont probablement trop sollicitées par la surexpression de cette protéine. En effet grâce au suivi des cellules transfectées au cours du temps, on observe une forte mortalité cellulaire.

En définitive, les systèmes de surexpression hétérologues ne semblent pas permettre une analyse pertinente des répercussions mécanistiques de la mutation du gène *DOCK1* identifiée dans la famille B, des approches d'édition génomique (en particulier l'utilisation de CRISPR/Cas9) sont actuellement en cours de développement au laboratoire et pourront, grâce à la présence de mutations intégrées au génome cellulaire de s'affranchir des modèles de surexpression.

II.2.2 Famille L

II.2.2.1 Résultats des investigations cliniques de la famille L

Le recrutement de la famille L a débuté suite à l'identification de deux patients ayant bénéficié de chirurgies valvulaires mitrales. La première patiente (III:3, Figure 27), présentait une insuffisance mitrale sévère par prolapsus bivalvulaire de type Barlow, justifiant une intervention chirurgicale. Elle a bénéficié de l'implantation d'une valve mécanique à l'âge de 68 ans et le compte rendu chirurgical décrit des valvules dystrophiques, épaissies et calcifiées. Le second patient (III:15, Figure 27), présentait un PVM de type Barlow, avec des distensions de cordages, un anneau mitral dilaté et un excès tissulaire des valvules mitrales conduisant à la nécessité d'une intervention chirurgicale à l'âge de 63 ans. Les observations chirurgicales décrivent des remaniements fibro-myoïdes. Par la suite, il a été identifié que la sœur (III:8) de la patiente III:3 présentait des valvules mitrales dystrophiques avec ruptures de cordages et dilatation annulaire et a donc été indiquée pour une plastie mitrale à l'âge de 67 ans.

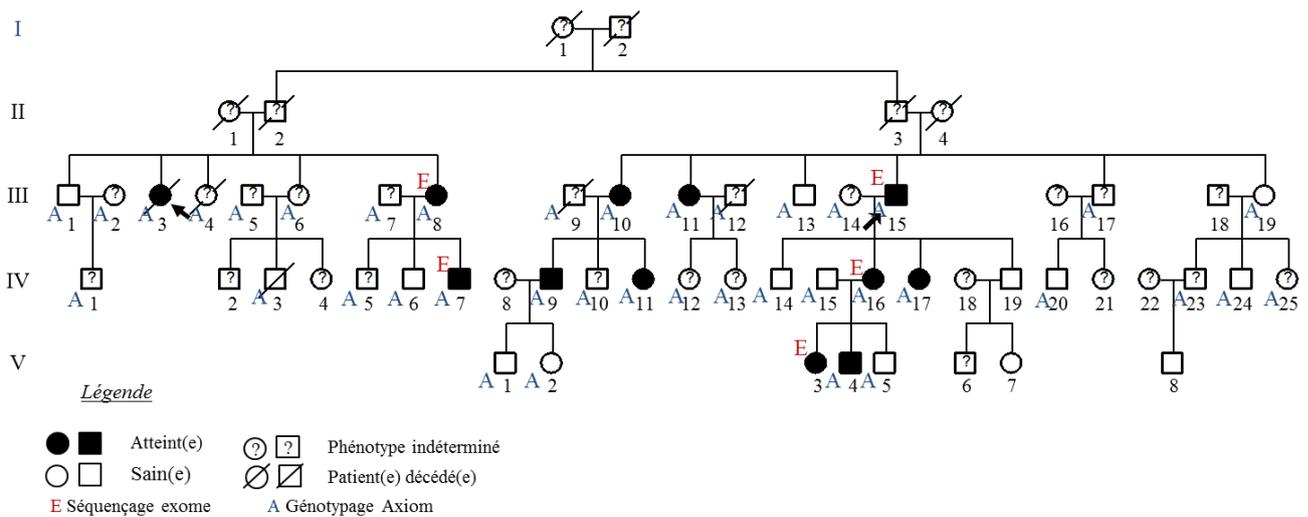


Figure 27: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille L

Dans un premier temps, le recoupement des bases de données cliniques au sein du CHU de Nantes a permis d'identifier que ces deux individus étaient cousins germains. De plus, l'étude des apparentés a permis d'identifier 38 individus parmi lesquels **12 sont atteints**. Les caractéristiques cliniques de ces derniers sont présentées dans le Tableau 7. La moyenne d'âge des patients atteints est de 53 ans et la patiente atteinte la plus jeune est âgée de 15 ans (V:3). Les prolapsus apparaissent plus marqués pour les valvules postérieures (moyenne -4,93 mm) que pour les valvules antérieures (moyenne -2,79 mm).

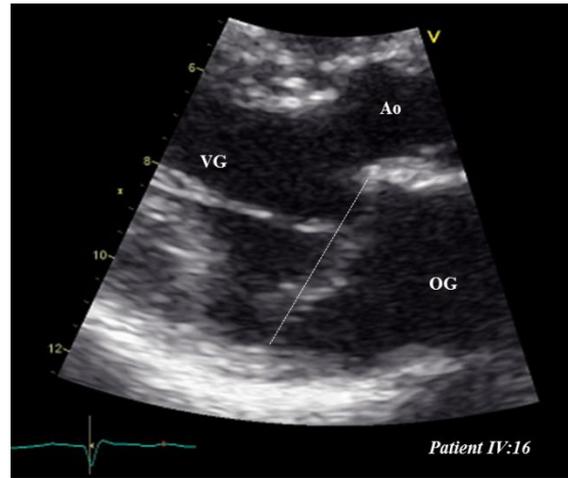


Figure 28: Examen échocardiographique du patient IV:16 de la famille L

L'image permet de visualiser un prolapsus bivalvulaire lors de la systole ventriculaire gauche (Prolapsus de la valvule antérieure = -7 mm et prolapsus de la valvule postérieure = -10,6 mm)

Individu	Âge	PVM	Prolapsus V. ant (mm)	Prolapsus V. post (mm)
III:3	Décédée à 98 ans	Atteinte	Implantation valve mécanique 68 ans	
III:8	76	Atteinte	Plastie mitrale 37 ans	
III:10	75	Atteinte	-	-9,3
III:11	73	Atteinte	-1,3	-4
III:15	79	Atteint	Intervention chirurgicale 63 ans	
IV:11	48	Atteinte	0	-2,7
IV:16	47	Atteinte	-7	-10,6
IV:17	52	Atteinte	-3,1	-3,8
IV:7	52	Atteint	-	-
IV:9	46	Atteint	-2	-2
V:3	15	Atteinte	-2,1	-3,6
V:4	24	Atteint	-1,2	-3,4

Tableau 7 : Mesures échocardiographiques et données cliniques des 12 patients atteints de la famille L

II.2.2.2 Résultats et discussion des investigations génétiques de la famille L

A partir de données de génotypage haut débit (Axiom 567K), nous avons recherché les régions IBD partagées par les 11 individus atteints génotypés de la famille (Figure 27). Ces analyses ont permis d'identifier **qu'aucune région n'était partagée spécifiquement par l'ensemble des individus atteints** (nombre de paires maximal = 49 paires) (données non présentées).

De plus, cinq patients atteints de la famille ont bénéficié d'un séquençage d'exome complet (Figure 27). Les données de couvertures moyennes de séquençage sont supérieures à 40X (III:8=55X, IV:7=57X, III:15=53X, IV:16=63X, V:3=47X) nécessaires à l'analyse.

L'analyse des données de séquençage d'exome de ces cinq patients a permis d'identifier un variant retrouvé chez tous les patients atteints séquencés (chr6(GRCh37):g. 51613173T>C, *PKHD1* (p.Ile3081Val)). Cependant, l'analyse de co-ségrégation de ce variant au sein de la famille a permis **d'exclure l'implication de ce dernier** au sein de cette famille (présence de trois phénotopies (patients IV:9, IV:17, V:4) - *données non présentées*) confirmant ainsi les données de recherches de régions IBD partagées par les individus atteints.

Ne connaissant pas les phénotypes des parents des cas index (III:3 et III:15), il est possible que la pathologie soit héritée du côté maternel pour l'un des deux individus initiaux. Dans ce sens, grâce aux bases de données cliniques, il a été possible d'identifier des cas sporadiques reliés généalogiquement à ces patients.

En définitive, ces premières analyses, réalisées à partir des données de génotypage, de séquençage et l'identification de cas isolés de part et d'autre de la famille initiale suggèrent l'existence de **deux effets fondateurs et donc de deux gènes différents responsables de PVM au sein de la famille L.**

Nous avons donc focalisé notre analyse sur la partie de la famille la plus informative afin d'identifier le gène responsable de la pathologie chez ces individus, dans un premier temps (Figure 29).

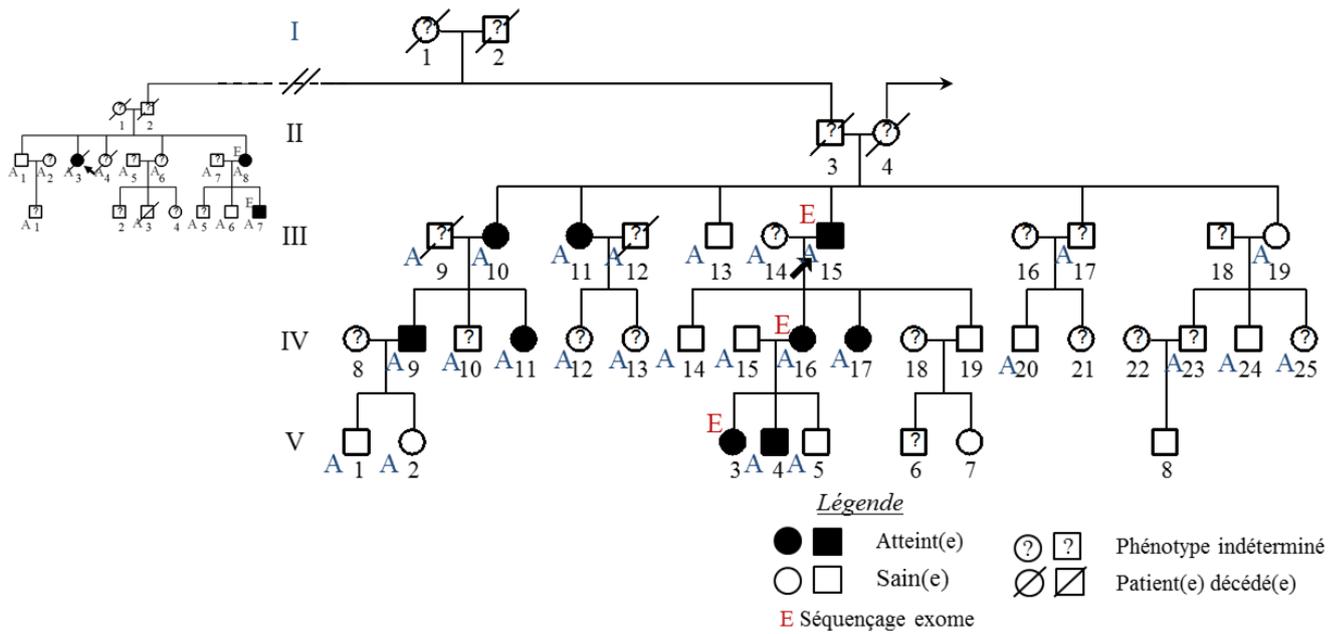


Figure 29: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la branche familiale de la famille L étudiée

➤ **Identification de régions génomiques partagées par les individus atteints de la branche familiale ciblée**

Nous avons recherché les régions IBD partagées par les huit individus atteints génotypés. Le nombre maximal de paires d'atteints partageant ces régions génomique est de 23 paires ($\lfloor \frac{n(n-1)}{2} \rfloor - p^{p/e} = 23$) (Avec n le nombre d'individus atteints génotypés (n=8) et $p^{p/e}$ le nombre de paires parent/enfant ($p^{p/e}=5$); Les paires parent/enfant correspondent aux paires III:10/IV:11, III:10/IV:9, III:15/IV:16 ; III:15/IV:17, IV:16/V:4).

Quatre régions génomiques atteignent le seuil maximal de régions partagées sur les chromosomes 1, 3, 5 et 6 (Figure 30).

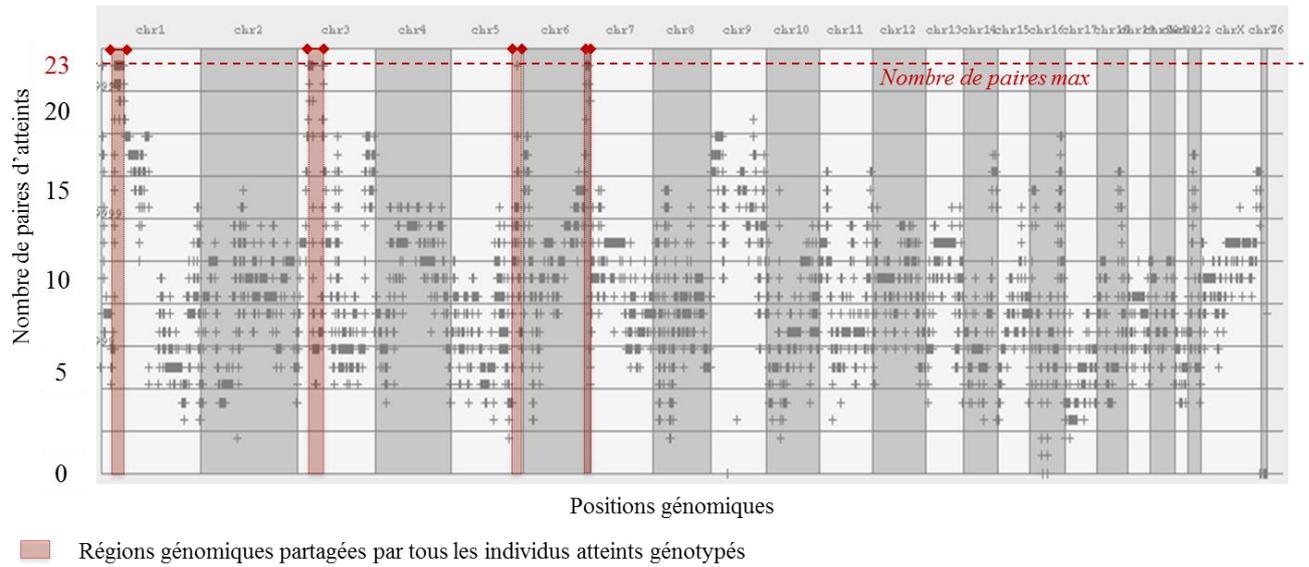


Figure 30: Représentation des zones identifiées par analyse d’IBD au sein de la « branche droite » de la famille L

Chaque variant est représenté en fonction de sa position chromosomique (abscisse) et du nombre de paires d’individus atteints qui le partage (ordonnées).

➤ **Identification des variants rares au sein des régions IBD**

L’analyse des données de séquençage d’exome de trois patients (IV:16, III:15 et V:3 (Figure 29)), a permis de ne conserver qu’un seul variant rare fonctionnel retrouvé au sein des régions IBD (Tableau 8).

		IV:16	III:15	V:3
Variants fonctionnels VEP	GATK	15493	15772	15495
	Samtools	14191	13387	12638
1000 Génomes / EVS (MAF<1%)	GATK	2053	3285	2056
	Samtools	1586	1296	1267
UK10K, CG, GoNL	GATK	1199	2055	1148
	Samtools	1315	609	1105
Bases de données internes	GATK	825	635	753
	Samtools	1264	427	1086
ExAC_NFE (MAF<0,1%)	GATK	565	351	491
	Samtools	1126	285	995
2 algorithmes	GATK/samtools	266	211	200
Partagés par les 3 individus atteints	GATK/samtools	50		
Régions IBD (23 paires max)	GATK/samtools	1		

Tableau 8: Analyses combinées des données de séquençage d'exome et des régions IBD identifiées.

Les filtres successifs d'analyse d'exome ont été réalisés avec l'outil Knime4bio et permettent de conserver les variants fonctionnels décrits par Variant Effect Predictor (VEP), rares (bases de données publiques et internes), retrouvés par les deux algorithmes de « calling » et partagés par les individus atteints au sein des régions IBD. (Les étapes de l'analyse et les bases de données utilisées sont décrites dans le matériel et méthodes chapitre IV.2.2.4)

Ce variant est situé sur le chromosome 1 en position 44044896. Il est localisé dans un transcrit de la base de données ENSEMBL (ENST00000437607), qui correspond à une isoforme prédite du gène *PTPRF*. Ce variant (C>G) induit la substitution d'une Isoleucine en Méthionine en position 328 de la protéine (p.Ile328Met). Ce variant est rare (MAF < 0.1% chez les européens non finlandais de la base de données ExAC) et a été retrouvé trois fois sur 5602 allèles. Ce variant a été validé puis l'analyse de sa co-ségrégation avec le PVM a été réalisée sur l'ensemble de la famille par séquençage capillaire (Figure 31).

Le variant est présent chez tous les patients atteints de la famille (9/9) ainsi que chez 5 des 10 individus sains de la famille. Quatre des cinq individus sains présentant le variant *PTPRF* ont un âge inférieur à 50 ans (IV:14 (50 ans), IV:24 (36 ans), V:1 (19 ans) ; V:2 (15 ans)). Seule la patiente III:19 âgée de 69 ans n'est pas atteinte mais présente le variant *PTPRF*.

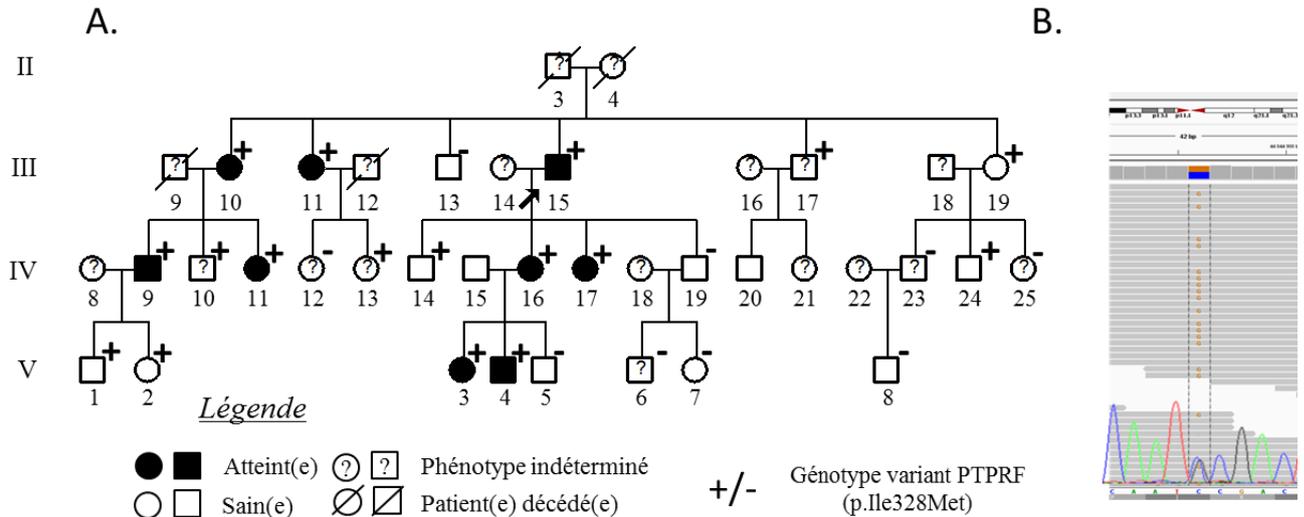


Figure 31: Analyse de co-ségrégation du variant *PTPRF* (p.Ile328Met)

A Visualisation de la co-ségrégation du variant *PTPRF* (*chr1*(GRCh37):g.44044896C>G *PTPRF* (p.Ile328Met)) au sein de la famille L. + correspond à la présence du variant à l'état hétérozygote, - à son absence. B. La présence de ce variant a été visualisée sur l'outil d'alignement IGV des « reads » issus du séquençage d'exome. Cet alignement permet de visualiser la présence de l'allèle alternatif pour environ la moitié des reads alignés. De plus, la présence de ce variant a été validée par séquençage capillaire (électrophorégramme correspondant superposé aux alignements IGV)

Le variant identifié dans le gène *PTPRF* est rare (MAF=0,0005) dans la base de données ExAC et a été génotypé 5602 fois. Nous avons évalué la fréquence de ce variant sur une population locale de **285 individus contrôles de la région Ouest** par la technologie **HRM** (High Resolution Melting (Matériel et méthodes IV.2.6)) afin de vérifier que le variant ne soit pas un variant retrouvé plus fréquemment dans notre population locale. Les résultats ont permis d'identifier qu'aucun des individus contrôles génotypés ne présente ce variant.

➤ Évaluation de l'expression du gène *PTPRF* dans la valve mitrale

Les données d'expressions géniques obtenues par séquençage d'ARN haut débit ne permettent pas d'évaluer spécifiquement l'expression de l'isoforme spécifique dans laquelle est retrouvé le variant p.Ile328Met, c'est pourquoi, nous avons évalué son expression par RT-PCR à partir d'ARN de valve mitrale saine (Figure 32.A). Nous avons pu constater que l'isoforme spécifique décrite est exprimée dans la valve mitrale (Figure 32.B).

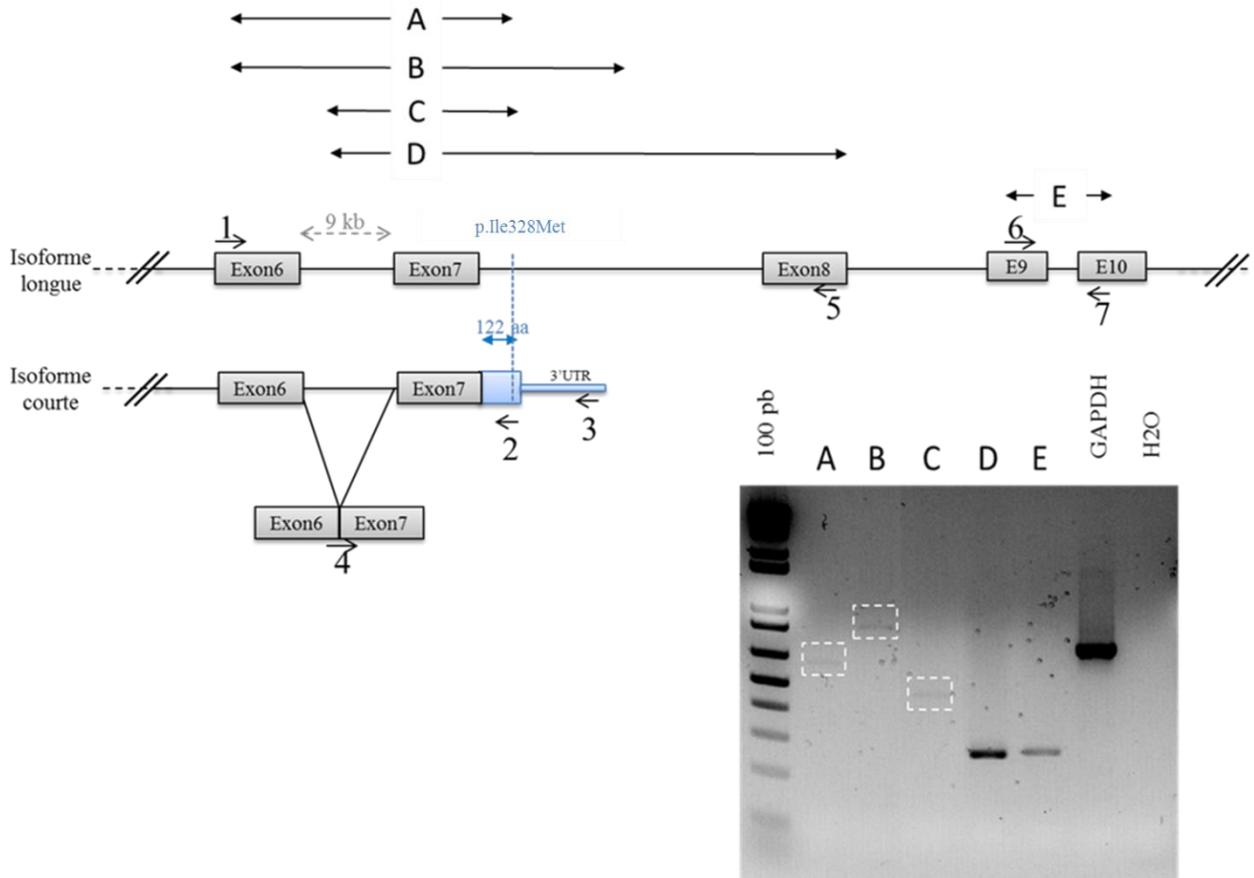


Figure 32: Évaluation de l'expression de l'isoforme « courte » de PTPRF par RT-PCR

A- Représentation schématique des deux isoformes du gène PTPRF. L'isoforme longue est représentée sur la partie supérieure et l'isoforme courte sur la partie inférieure. La région génomique représentée en bleu, sur la représentation de l'isoforme courte, correspond à la région codante spécifique de l'isoforme courte prédite. B- L'évaluation de l'expression du gène PTPRF a été réalisée avec de l'ARNm de valve mitrale saine, amplifié par RT-PCR puis visualisé grâce à une migration électrophorétique sur gel d'agarose 1,5%. Les encadrés blancs correspondent aux fragments de taille attendue spécifiques de l'isoforme courte de PTPRF. RT-PCR A (amorces 1+2) RT-PCR B (amorces 1+3) RT-PCR C (amorces 4+2) RT-PCR D (amorces 4+5) RT-PCR E (amorces 6+7)

➤ **Hypothèses physiopathologiques de l'implication du variant PTPRF (p.Ile328Met)**

Le gène PTPRF (pour Protéine Tyrosine-Phosphatase Récepteur de type F) code pour la protéine LAR (pour « **Leukocyte Antigen-Related** ») qui fait partie de la famille des protéines tyrosine-phosphatases impliquées dans la régulation de la balance phosphorylation/déphosphorylation des tyrosines. C'est une protéine transmembranaire composée de deux domaines catalytiques à activité tyrosine phosphatase et d'un domaine transmembranaire. La partie extra cellulaire est composée de sept domaines Fibronectine de

type III (similaires aux molécules d'adhésion des cellules neurales) et de trois domaines « Immunoglobulin-like » (Figure 33).

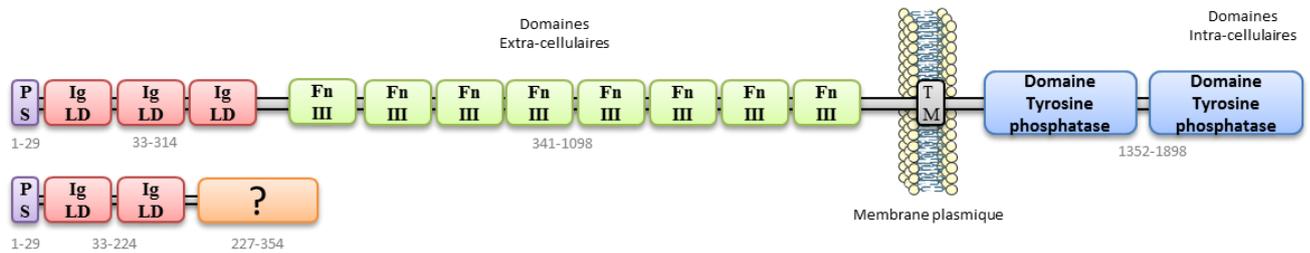


Figure 33: Représentation schématique de deux isoformes de la protéine « Leukocyte Antigen Related »

La protéine LAR codée par le gène PTPRF est constituée d'un Peptide signal (PS), de trois domaines Immunoglobulin Like (IgLD) de sept domaines fibronectine de type 3 (FnIII), d'un segment transmembranaire TM et de deux domaines catalytiques intracellulaires. Le domaine protéique représenté en orange est codé par l'isoforme courte de PTPRF pour lequel la fonction n'est pas connue.

Physiologiquement, le récepteur LAR est très impliqué dans les voies du développement : - des glandes mammaires (Schaapveld et al. 1997), -cérébral (Van Lieshout et al. 2001), - urétéral (Uetani et al. 2009), cranio facial (Stewart et al. 2013) et neuronal (Tisi et al. 2000).

La modulation de ces processus développementaux divers, intervient grâce à son implication moléculaire dans: -**le maintien de l'intégrité et la migration des cellules épithéliales** (Gebbinck et al. 1993) (Müller et al. 1999) -la régulation des **voies des facteurs de croissance** («growth factor » EGF, FGF) (J. Wang et al. 2005) -la **régulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténines** (Haapasalo et al. 2007) et dans les **interactions avec les protéoglycanes** (héparane-sulfates) de la matrice extra cellulaire (Johnson et al. 2006) (Wang et al. 2012).

Il a été montré que les protéines réceptrices à activité tyrosine phosphatase (RPTPs) de la famille LAR (RPTP δ , RPTP σ et LAR), sont nécessaires pour la morphogénèse mandibulaire. Les souris déficientes en récepteurs à activité tyrosine phosphatase présentent des **défauts de délamination, de migration et de survie des cellules des crêtes neurales qui formeront la mandibule**. Les défauts de morphogénèse sont médiés par une dérégulation des voies de signalisation **Wnt/ β caténine et Bmp** (Stewart et al. 2013). De plus les auteurs décrivent que cette famille de récepteurs active la voie Wnt/ β -caténine en levant l'inhibition des β -caténines et ainsi influe sur la prolifération et la différenciation cellulaire.

De plus grâce à l'activité inhibitrice du miRNA-24, il a été montré que le récepteur LAR est capable d'inhiber **l'EGFR qui à son tour active la voie des métallo-protéinases** (Adam15, Mmp2, Mmp9) et ainsi influe sur la migration et l'invasion cellulaire (C. Du et al. 2010).

Il existe de nombreuses isoformes courtes ou tronquées du récepteur LAR dans le cerveau de rat (Zhang and Longo 1995) et certains auteurs décrivent que ces dernières pourraient être sécrétées (Tabiti et al. 1996).

Les voies de signalisation, dans lesquelles le récepteur LAR est impliqué, sont pertinentes notamment au regard des **mécanismes développementaux valvulaires** (Voie Wnt/ β -caténines) et du **remodelage de la matrice extracellulaire** (interaction avec les héparanes sulfates de la matrice) dans lequel il intervient. Cependant les études menées jusqu'alors se sont majoritairement concentrées sur les fonctions de l'isoforme longue du récepteur LAR (Figure 33). Dans le cas de la famille L, le variant intervient dans un exon qui n'est pas contenu dans l'isoforme longue de la protéine.

Nous devons dans un premier temps, **comprendre la fonction de cette isoforme courte**, du nouveau domaine fonctionnel de cette isoforme (Figure 33-orange) puis ensuite comprendre les répercussions de ce variant génétique sur cette fonction. Les études fonctionnelles sont en cours au laboratoire et des résultats préliminaires par des expériences de fractionnement cellulaires ont permis d'identifier que cette isoforme est capable de se fixer à la membrane plasmique, suggérant la présence de sites potentiels d'adressage et d'interaction membranaires.

II.2.3 Famille R

II.2.3.1 Résultats des investigations cliniques de la famille R

Le recrutement de la famille R a débuté suite à l'identification d'un patient (IV:24 ; Figure 34) présentant un PVM qui a nécessité une plastie mitrale à l'âge de 57 ans. Les valvules apparaissaient dystrophiques, l'anneau et les valvules mitrales étaient calcifiés. L'interrogatoire clinique a permis d'identifier que le père de ce patient avait aussi bénéficié d'un remplacement valvulaire mitrale par une prothèse mécanique, à l'âge de 62 ans. L'aspect de sa valve mitrale était aussi calcifié.

La moyenne d'âge des patients atteints est de 57 ans et le patient atteint le plus jeune est âgé de 40 ans (V:22). Les prolapsus mitraux apparaissent plus marqués pour les valvules postérieures (moyenne -5,07 mm) que pour les valvules antérieures (moyenne -0,6 mm).

L'étude de cette famille a permis le recrutement de 36 individus phénotypés et l'identification de **cinq autres patients atteints** (Tableau 9). De plus, l'analyse des échographies des patients apparentés a permis d'identifier la présence de bicuspidies aortiques chez quatre individus (IV:21, IV:26, V:25, VI:5 Figure 34).

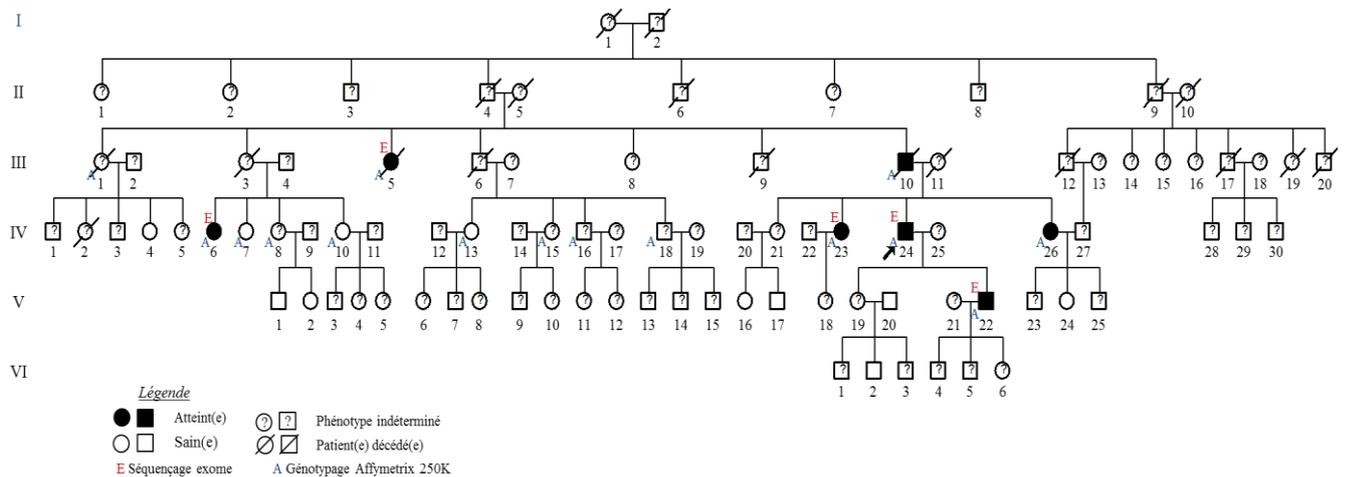


Figure 34: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille R

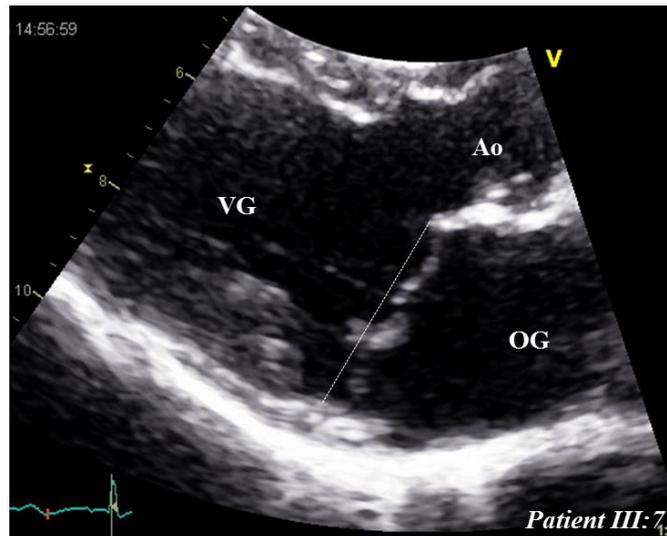


Figure 35: Examen échocardiographique représentatif d'un patient de la famille R

L'image permet de visualiser un prolapsus bivalvulaire lors de la systole ventriculaire gauche (Prolapsus de la valvule antérieure = -7 mm et prolapsus de la valvule postérieure = -10,6 mm)

Individus	Phénotype	Prolapsus V. Ant	Prolapsus V. post	Âge
III:10	Atteint	Prothèse mécanique à 62 ans		Décédé à 85 ans
IV:24	Atteint	Plastie mitrale à 57 ans		67
V:22	Atteint	-1,5	-4	40
III:5	Atteinte	-	-	Décédée à 86 ans
IV:23	Atteinte	-4,9	-9,6	62
IV:26	Atteinte	+2,1	-3,2	58
IV:6	Atteinte	1,8	-3,5	62

Tableau 9: Données cliniques des 7 patients atteints de la famille R

Les mesures de prolapsus des valvules mitrales, antérieure (V. Ant) et postérieure (V. Post) sont reportées en millimètres. Les mesures négatives correspondent aux mesures au-dessus du plan de l'anneau.

II.2.3.2 Résultats et discussion des investigations génétiques de la famille L

Quatorze individus de la famille R ont bénéficié d'un génotypage génome entier (Puces Affymetrix 250K). Les premières analyses de liaison pour cette famille ont été réalisées par Éric Seboun (Université Pierre et Marie Curie - Paris). L'étude de liaison avait permis d'identifier une liaison sur le chromosome 9 (avec une pénétrance $p=0.9$) avec un LOD score maximal de 2.89.

Cependant depuis la réalisation de ces analyses de nouveaux patients ont été identifiés et certains phénotypes indéterminés à l'époque sont établis actuellement. La recherche de régions IBD partagées par les individus atteints de la famille est en cours de ré-analyse.

• **Identification des variants rares**

Le séquençage des cinq exomes réalisés pour cette famille présente des données de couvertures moyennes supérieures à 40X (II:5=59X, IV:6=47X, IV:23=55X, IV:24=60X, V:22=62X) nécessaires à l'analyse.

L'analyse des données de séquençage d'exome de ces cinq patients, présentée dans le Tableau 10, a permis d'identifier 2 variants rares fonctionnels partagés par les cinq patients atteints. Ces deux variants sont dits « NOVEL » en raison de leur absence dans les bases de données génétiques.

		V:22	II:5	IV:6	IV:24	IV:23
Variants fonctionnels VEP	GATK	16966	17292	15895	16639	15962
	Samtools	14309	14365	13451	14074	13644
1000 Génomes EVS (MAF<1%)	GATK	3835	4096	3381	3667	3324
	Samtools	1516	1601	1391	1484	1339
UK10K, CG, GoNL	GATK	2382	2598	2139	2215	2023
	Samtools	683	719	648	628	581
ExAC_NFE (MAF<0.1%)	GATK	560	636	553	574	549
	Samtools	395	407	379	409	403
2 algorithmes	GATK/samtools	337	344	312	344	323
Partagés par les 5 individus	GATK/samtools	2				

Tableau 10: Analyses des données de séquençage d'exome de la famille R

Les filtres successifs d'analyse d'exome ont été réalisés avec l'outil Knime4bio et permettent de conserver les variants fonctionnels décrits par Variant Effect Predictor (VEP), rares (bases de données publiques et internes), retrouvés par les deux algorithmes de « calling » et partagés par les individus atteints. (Les étapes de l'analyse et les bases de données utilisées sont décrites dans le matériel et méthodes chapitre IV.2.2.4)

Le premier variant, situé dans le gène APC (chr5(GRCh37):g.112175526G>C), induit la substitution d'une Glycine en position 1412 en Alanine (NM_000038.5(APC): p.Gly1412Ala). Le second variant est situé dans le gène GRAMD3 (chr5(GRCh37):g.125820120G>C) et induit la substitution d'une Valine en Leucine en position 300 de la protéine (NM_001146321.1 (GRAMD3): p.Val300Leu).

L'analyse de co-ségrégation a été réalisée sur l'ensemble de la famille et a permis d'identifier que tous les patients atteints présentent les deux variants (7/7 (*GRAMD3* et *APC*)).

Ces deux variants sont très conservés (scores GERP 5,13 et 6,07) et retrouvés dans des gènes exprimés au sein de la valve mitrale (Expression *APC* (5,8 FPKM), Expression *GRAMD3* (9,7 FPKM)). Les deux variants sont transmis sur le chromosome 5 au sein du même bloque haplotypique (distance 13Mb).

Seuls deux patients sains présentent les variants identifiés (patient V:17 et V:24 Figure 36) et ont respectivement 44 et 23 ans. De manière intéressante, les quatre individus de la famille atteints de bicuspidie aortique, présentent les variants identifiés (IV:26, IV:21, V:25, IV:5, Figure 36).

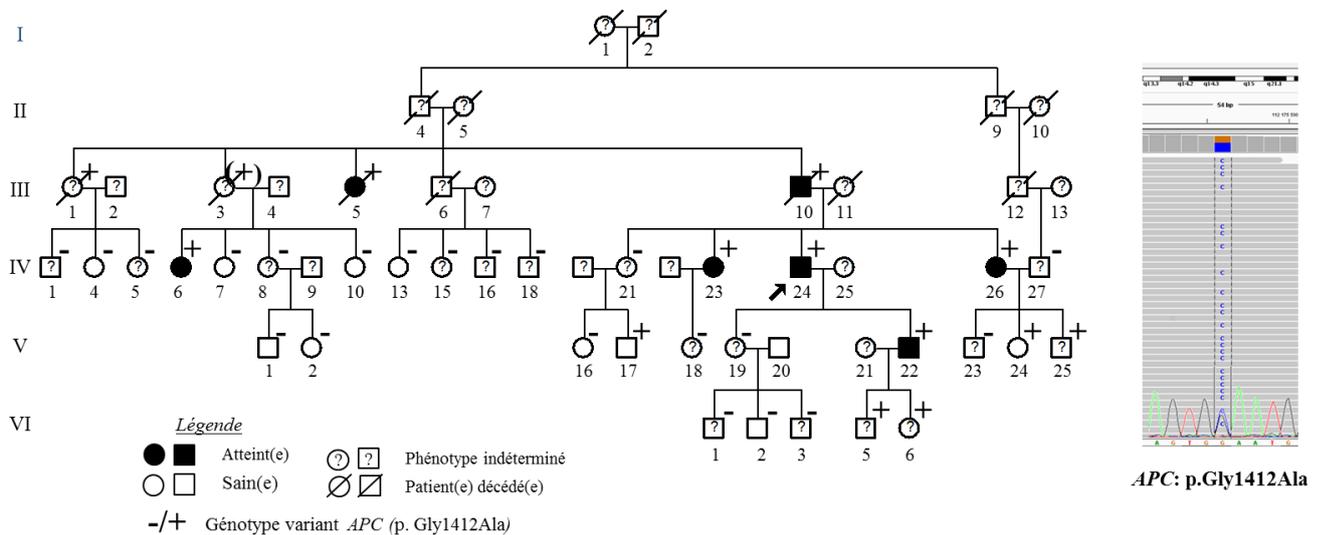


Figure 36: Représentation de la co-ségrégation du variant *APC* (p.Gly1412Ala) dans la famille R

Seuls les individus pour lesquels les ADN sont disponibles sont représentés (+ correspond à la présence du variant à l'état hétérozygote, - à son absence) La présence de ce variant a été visualisée sur l'outil d'alignement IGV puis validée par séquençage capillaire (électrophorogramme correspondant superposé aux alignements IGV).

Le gène *GRAMD3* code pour la protéine « hepatitis C virus nonstructural protein 3-transactivating protein 2 » dont les fonctions sont peu connues. Seules deux études font états d'associations génétiques potentielles entre ce gène et des formes tardives de déficiences cognitives ou d'une implication dans la pigmentation de l'épithélium rétinien (Strunnikova et al. 2010) (Dubé et al. 2013).

En revanche, le gène *APC*, qui code pour une protéine ubiquitaire du même nom (pour « Adenoma Polyposis Coli »), est impliqué dans des fonctions biologiques nécessaires au développement valvulaire mitral.

- **Hypothèses physiopathologiques de l'implication du variant *APC* (p.Gly1412Ala)**

La protéine Apc, comporte dans sa partie N-terminale (acides aminés (aa) 6-57) un domaine d'oligomérisation suivi de domaines « armadillo » qui permettent son **intéraction avec des régulateurs du cytosquelette d'actine** (IQGAP1 et Asef1 (GEF de Rac1) (aa 453-767)). Elle est aussi composée de deux grands **domaines de liaison avec les protéines du complexe (Axine, GSK3 β , β -Caténines)** impliquées dans la voie de signalisation **Wnt/ β -Caténines** (aa 1020-1169 ; 1262-2033) puis un domaine d'interaction avec les microtubules dans sa partie C-terminale (aa 2560-2843) (Aoki and Taketo 2007) (Figure 37). Les deux domaines centraux d'Apc sont constitués de **répétitions de 15 à 20 acides aminés** très conservés entre les espèces et très riches en sérines. Ces sites consensus, contiennent des **répétitions de type SXXXS** (Sieber, Tomlinson, and Lamlum 2001) qui sont phosphorylées par la glycogène-synthase-kinase-3 β et ainsi permettent **l'intéraction d'Apc avec les β -Caténines** (Rubinfeld et al. 1996).

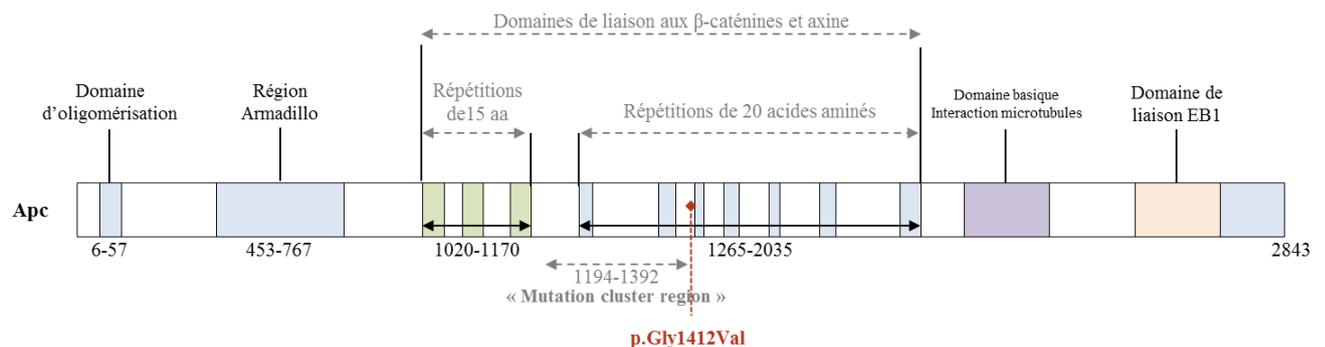


Figure 37: Représentation schématique de la protéine Apc (Adenoma Polyposis Coli)

D'après (García and Knoers 2009)

Grâce à ces interactions, Apc joue un rôle central dans la voie **Wnt/ β -caténine canonique**. Cette voie est très impliquée dans la **différenciation et le développement cardiaque** (Gessert and Kühl 2010). En absence de signalisation Wnt, les β -caténines

cytosoliques interagissent avec un complexe protéique composé de l'Axine, Apc et GSK3 β . Ces interactions induisent une phosphorylation par GSK3 β des β -caténines qui va induire leur dégradation par le protéasome (Figure 38).

En présence d'un signal Wnt (réception de Wnt sur son récepteur Frizzled) GSK3 β va être inhibé par l'action de Dishevelled. Ainsi, l'activation de cette voie va inhiber la dégradation des β -Catenines qui vont pouvoir être transloquées dans le noyau. Via leur interaction nucléaire avec des facteurs de transcription (TCF/LEF) elles vont activer la transcription de gènes cibles (gènes de prolifération (ex : cycline D1, c-myc) (Tetsu and McCormick 1999). Cette voie dite Wnt/ β -Catenines canonique provoque une forte prolifération cellulaire (Figure 38).

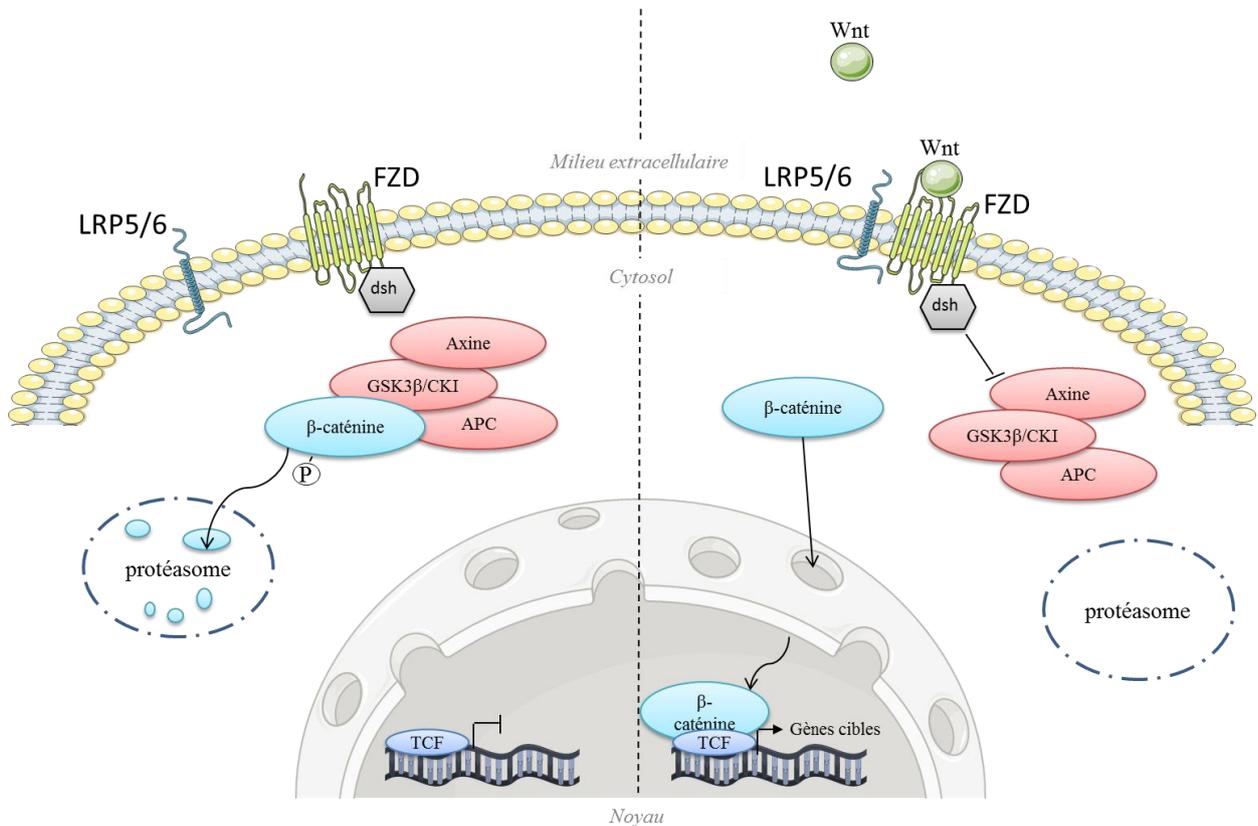


Figure 38: Voie de signalisation Wnt/ β -caténines canonique

En l'absence de ligand Wnt, les β -caténines interagissent avec le complexe de destruction constitué de GSK3 β -Axine et Apc qui permet la phosphorylation des β -caténines. Cette phosphorylation induit la dégradation des β -caténines par le protéasome. En présence de Wnt, les ligands interagissent avec le récepteur Frizzled (FZD) et cette fixation induit l'interaction de FZD avec Lrp5/6 (« Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6 »). Cette interaction permet l'activation de Dishevelled qui inhibe via l'axine la destruction des β -caténines. L'absence de dégradation des β -caténines induit leur accumulation dans le cytosol puis une translocation dans le noyau. L'interaction nucléaire des β -caténines avec les facteurs de transcription (TCF/LEF) et active la transcription de gènes cibles.

En 2003, une étude sur le **zebrafish** a montré l'implication d'Apc, spécifiquement dans le **développement des coussins valvulaires** (Hurlstone et al. 2003). Les auteurs ont démontré que les zebrafish présentant des mutations invalidantes homozygotes pour le gène orthologue d'APC présentaient des malformations cardiaques, des œdèmes péricardiques et des **expansions des coussins valvulaires anormales tout au long du tube cardiaque**, suggérant que les cellules d'origines endocardiques du cœur entamaient un processus de **transition épithélio-mésenchymateuse non spécifique au territoire valvulaire** (Figure 39). De plus ils montrent qu'une **inhibition de la voie Wnt-βcaténine**, génère une **absence de ces coussins endocardiques**.

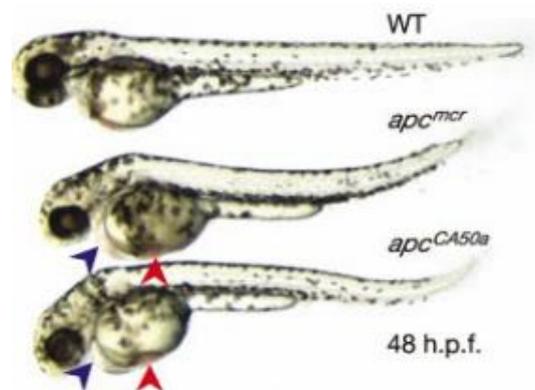


Figure 39: Morphologie des embryons zebrafish présentant des mutations invalidantes pour le gène orthologue d'Apc

*Les images sont issues de la publication (Hurlstone et al. 2003). Les embryons sauvages (wt), présentant des mutations tronquantes homozygotes en position 1318 (apc^{mcr}) ou en position 613 (apc^{CA50a}) de la protéine *apc*, sont visualisés 48 après fertilisation (h.p.f). Les flèches bleues indiquent les œdèmes péricardiques et les flèches rouges, les régurgitations de sang.*

L'hypothèse sous-jacente avancée, est que la voie **Wnt/β-caténines** permet une **expression génique nécessaire à la transition épithélio-mésenchymateuse** et qu'Apc est un acteur prépondérant de la **spécification territoriale de la valvulogénèse**. Le variant APC retrouvé dans la famille R substitue une Glycine en position 1412 en Alanine.

Cet acide aminé est situé entre deux domaines répétés d'interaction de 20 acides aminés avec les β-caténines. Il est possible que ce variant puisse perturber l'interaction d'Apc avec les β-Caténines par une modification de sa phosphorylation par GSK3β. Ces résultats seraient concordants avec le phénotype valvulaire des patients de la famille qui présentent des valves mitrales **remaniées et dystrophiques avec des excès tissulaires**.

Les souris invalidées de manière homozygote pour *Apc*, ne sont pas viables et meurent à l'état embryonnaire en raison de l'absence de gastrulation (Fodde et al. 1994)(Moser et al. 1995) suggérant un **rôle important d'*Apc* dans le développement embryonnaire**.

Des mutations d'*APC* dans les lignées germinales ont été largement associées au développement de polyposes adénomateuses familiales (Grodin et al. 1991)(Kinzler et al. 1991) ainsi que dans un grand nombre de cas de cancers (colorectaux, pancréatiques etc.). Plus de **98% des mutations d'*APC*** retrouvées dans le cadre de **cancers**, sont des mutations **non-sens ou de décalage du cadre de lecture** qui conduisent à la production d'une protéine tronquée (Laurent-Puig, Bérout, and Soussi 1998) et sont situées dans une région préférentielle (Mutation Cluster Region (Figure 37)). Le variant *APC* (p.Gly1412Ala) retrouvé dans la famille R n'est pas retrouvé au sein de ce site préférentiel, la mutation ne génère pas de troncature de la protéine, ce qui est concordant avec l'absence de phénotypes cancéreux au sein la famille R.

Enfin, les quatre patients atteints de bicuspidie aortique présentent le variant *APC*. Il serait pertinent d'évaluer la co-ségrégation de la mutation *APC* avec la présence de bicuspidie aortique sur l'ensemble de la famille. La présence de ces bicuspidies pose de nouvelles hypothèses sur le fonctionnement de la voie de signalisation impliquant *Apc* dans le développement valvulaire. En effet, la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans la prolifération et la migration des cellules de la crête neurale lors du développement embryonnaire. Ces cellules sont nécessaires à la septation des voies d'éjection cardiaques (tronc de l'artère pulmonaire et aorte ascendante) (Kirby, Gale, and Stewart 1983) (Gessert and Kühn 2010). La voie Wnt/ β -caténine permet la prolifération de ces cellules de la crête neurale (Brault et al. 2001). Les souris invalidées partiellement pour le gène *Lrp6* (co-récepteurs de Wnt), présentent des malformations des voies d'éjection cardiaques, dont une hypoplasie des coussins valvulaires aortiques (Song et al. 2010). Ces résultats confirment l'implication de la voie Wnt/ β -caténines dans les processus développementaux impliquant les cellules de la crête neurale, mais aussi que ces cellules sont nécessaires à la formation valvulaire aortique. Récemment, une étude de l'Université de Columbus, portant sur le séquençage de 97 gènes candidats chez 78 individus non apparentés atteints de bicuspidie aortique, a démontré un enrichissement de variants dans les gènes de la voie Wnt ($p=0,035$) (dont : *WNT4*, *NFATC1*, *APC*, *AXIN1* et *AXIN2*) (Bonachea et al. 2014).

II.2.4 Famille P

II.2.4.1 Résultats des investigations cliniques de la famille P

Le recrutement de la famille P a débuté suite à l'identification d'une patiente (II:5 - Figure 40) opérée à l'âge de 73 ans. Ses valvules mitrales étaient dystrophiques et épaissies, l'anneau mitral dilaté et la rupture de cordages tendineux a justifié une chirurgie qui a été réalisée par plastie. De plus, le frère et une sœur de ce cas index, (patients II:1 et II:3 (Figure 40)) ont aussi bénéficié de plasties mitrales, respectivement à l'âge de 58 et 75 ans sur un phénotype similaire au cas index (valves épaissies, dilatation annulaire, rupture de cordages). Par la suite, le recrutement familial a permis d'identifier six patients atteints sur 15 phénotypés à ce jour.

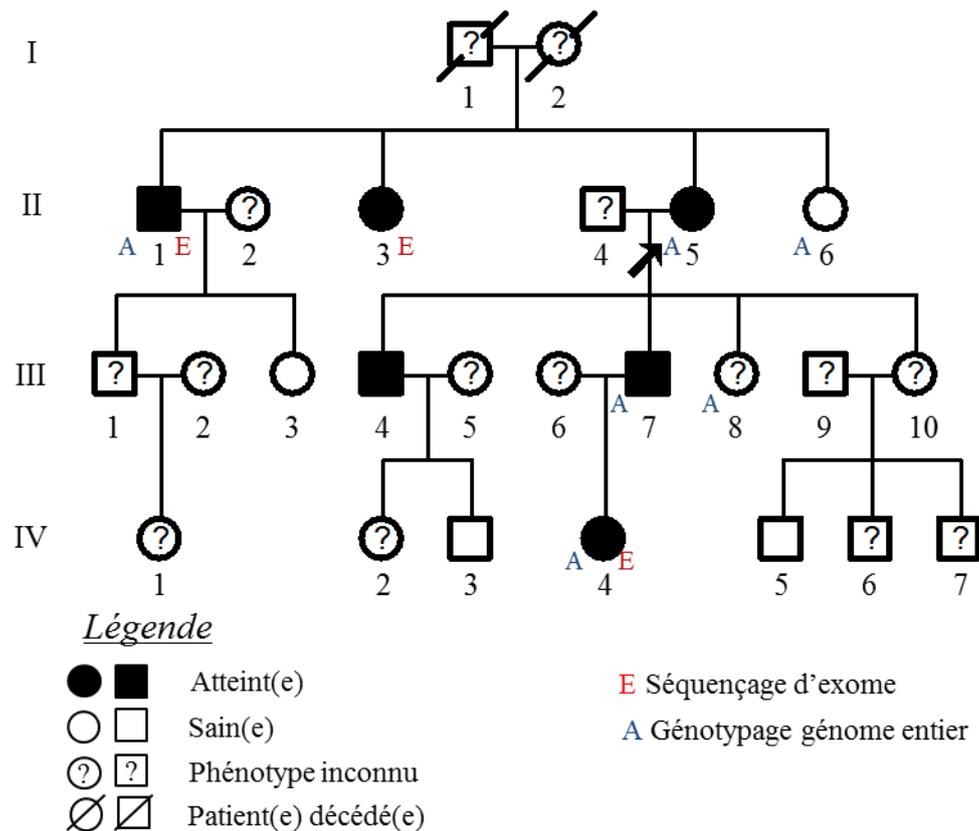


Figure 40: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille P

La moyenne d'âge des patients atteints est de 56,8 ans et la patiente atteinte la plus jeune est âgée de 22 ans (IV:4). Les prolapsus apparaissent plus marqués sur les valvules postérieures (moyenne -4,6 mm) que pour les valvules antérieures (moyenne -1,47 mm) qui pour les patients III:4 et III:7 ne sont pas prolabantes.

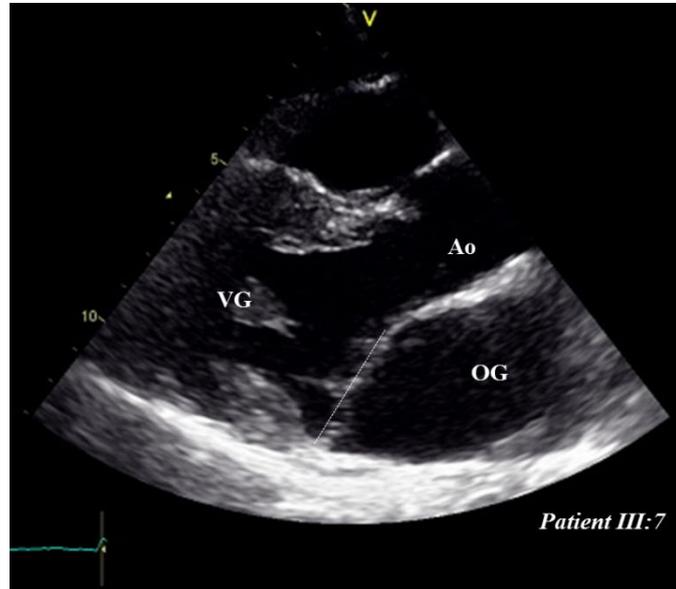


Figure 41: Examen échocardiographique du patient IV:16 de la famille P
 L'image permet de visualiser un prolapsus de la valvule postérieure lors de la systole ventriculaire gauche (prolapsus de la valvule postérieure = -2,6 mm)

Individu	Phénotype	Prolapsus V. Ant (mm)	Prolapsus V. Post (mm)	Age
II:1	Atteint	Plastie mitral/rupture cordages (58 ans)		69
II:3	Atteinte	Plastie mitral/rupture cordages (75 ans)		77
II:5	Atteinte	Plastie mitral/rupture cordages (73 ans)		79
III:4	Atteint	+0,5	-3,3	44
III:7	Atteint	+2,1	-2,6	50
IV:4	Atteinte	-4	-7,8	22

Tableau 11: Données cliniques des six patients atteints de la famille P

Les mesures de prolapsus des valvules mitrales, antérieure (V. Ant) et postérieure (V. Post) sont reportées en millimètres. Les mesures négatives correspondent aux mesures au-dessus du plan de l'anneau.

II.2.4.2 Résultats et discussion des investigations génétiques de la famille P

- **Régions génomiques partagées par les individus atteints**

A partir de données de génotypage haut débit (Affymetrix 250K), nous avons recherché les régions IBD partagées par les quatre individus atteints génotypés de la famille. Le nombre de paires d'atteints maximal partageant des régions génomiques IBD est de quatre ($\lfloor \frac{n(n-1)}{2} \rfloor - p^{p/e} = 4$) (Avec n le nombre d'individus atteints génotypés ($n=4$) et $p^{p/e}$ le nombre de paires parent/enfant ($p^{p/e}=2$) ; Les paires parents/enfants correspondent aux paires II:5/III:7 et III:7/IV:4)). L'identification des régions IBD partagées par les individus atteints sont présentées sur la Figure 42.

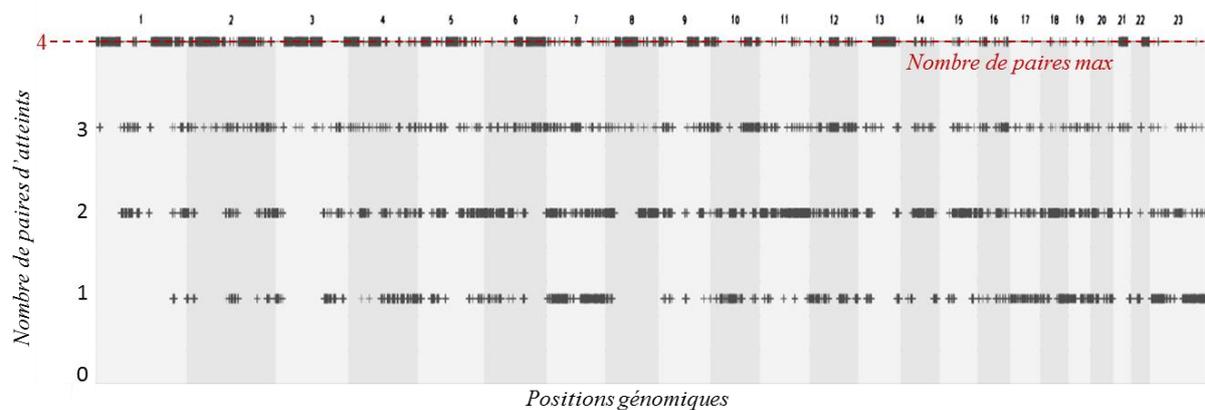


Figure 42: Représentation des régions IBD partagées par les individus atteints de la famille P

Chaque variant est représenté en fonction de sa position chromosomique (abscisse) et du nombre de paires d'individus atteints qui le partage (ordonnées). Le nombre de paires d'atteints maximal est de quatre.

- **Identification des variants rares au sein des régions IBD puis priorisation**

Le séquençage des trois exomes réalisés pour cette famille présente des données de couvertures moyennes supérieures à 40X nécessaires à l'analyse (II:1=63X; II:3=63X; IV:4=60X).

L'analyse des données de séquençage d'exome de ces trois patients a permis de **conserver huit variants** fonctionnels rares retrouvés dans les régions génomiques IBD partagées par les individus atteints génotypés.

		IV:4	II:3	II:1
Variants fonctionnels VEP	GATK	17095	17309	17143
	Samtools	14412	14501	14470
1000 Génomes EVS (MAF<1%)	GATK	3706	3916	3731
	Samtools	1457	1564	1495
UK10K, CG, GoNL	GATK	2282	2477	2283
	Samtools	663	749	664
BDD internes	GATK	775	767	755
	Samtools	473	480	481
ExAC_NFE 0.1%	GATK	393	387	365
	Samtools	295	300	286
2 algorithmes	GATK/samtools	228	226	215
Partagés par les 3 individus	GATK/samtools	15		
Régions IBD (4 paires max)	GATK/samtools	8		

Tableau 12: Analyses combinées des données de séquençage d'exome et des régions IBD identifiées pour la famille P.

Les filtres successifs d'analyse d'exome ont été réalisés avec l'outil Knime4bio et permettent de conserver les variants fonctionnels décrits par Variant Effect Predictor (VEP), rares (bases de données publiques et internes), retrouvés par les deux algorithmes de « calling » et partagés par les individus atteints au sein des régions IBD. (Les étapes de l'analyse et les bases de données utilisées sont décrites dans le matériel et méthodes chapitre IV.2.2.4)

Position génomique (GRCh37)	Position protéique	MAF	Nom du gène	Score GERP	Expression valve mitrale
chr12:g.62743096C>T	NA	2,70E-04	USP15	4,45	18,21
chr8:g.66534557C>T	p.Asn72Lys	NOVEL	ARMC1	3,85	10,70
chr10:g.95995871G>A	p.Arg805Gln	1,10E-04	PLCE1	3,55	8,33
chr4:g.81123305C>G	p.Ala230Gly	NOVEL	PRDM8	4,85	7,91
chr4:g.8217957A>C	p.Thr201Pro	2,60E-04	SH3TC1	3,98	3,32
Chr1:g.109793147A>T	p.Lys149Met	1,50E-05	CELSR2	-2,78	2,01
chr9:g.135702318A>C	p.Val227Gly	8,10E-04	AK8	1,13	0,69
chr7:g.4247792C>G	p.Pro1759Arg	2,30E-04	SDK1	4,52	0,53

Tableau 13: Variants fonctionnels rares retrouvés chez tous les patients atteints de la famille P au sein des régions IBD.

Les fréquences de l'allèle mineure (MAF) sont issues de la base de données Exome Aggregation Consortium (ExAC) pour la population européenne non finlandaise (NFE). Les données d'expression génique au sein de la valve mitrale sont exprimées en FPKM (pour « Fragment per Kilobase of exon per million reads mapped »)

Nous avons testé par séquençage capillaire la co-ségrégation des variants retrouvés dans les gènes *USP15*, *ARMC1*, *PLCE1*, *PRDM8*, *CELSR2*, et *SDK1*. Les variants des gènes *ARMC1*, *CELSR2* et *PLCE1* ne co-ségrègent pas avec le phénotype mitral au sein de la famille (présence d'au moins une phénocopie). En revanche, les six patients atteints de la

famille présentent les variants *USP15*, *PRDM8* et *SDK1*. Deux patients sains comportent les variants *PRDM8* et *USP15* et trois individus sains comportent le variant *SDK1*.

Nous avons ensuite priorisé ces variants à partir de données d'**expression génique au sein de la valve mitrale** et de la **conservation inter espèces des bases nucléotidiques substituées** (score GERP).

Les variants retrouvés dans les gènes *PRDM8* et *USP15* substituent des nucléotides très conservés (GERP 4,85 et 4,45 respectivement). *USP15* est plus fortement exprimé au sein de la valve mitrale que le gène *PRDM8* (18,21 vs. 7,91 FPKM). Cependant les analyses ne permettent pas d'affirmer l'implication de tel ou tel variant. Le recrutement ultérieur d'autres membres de la famille pourra permettre de discriminer ces deux variants.

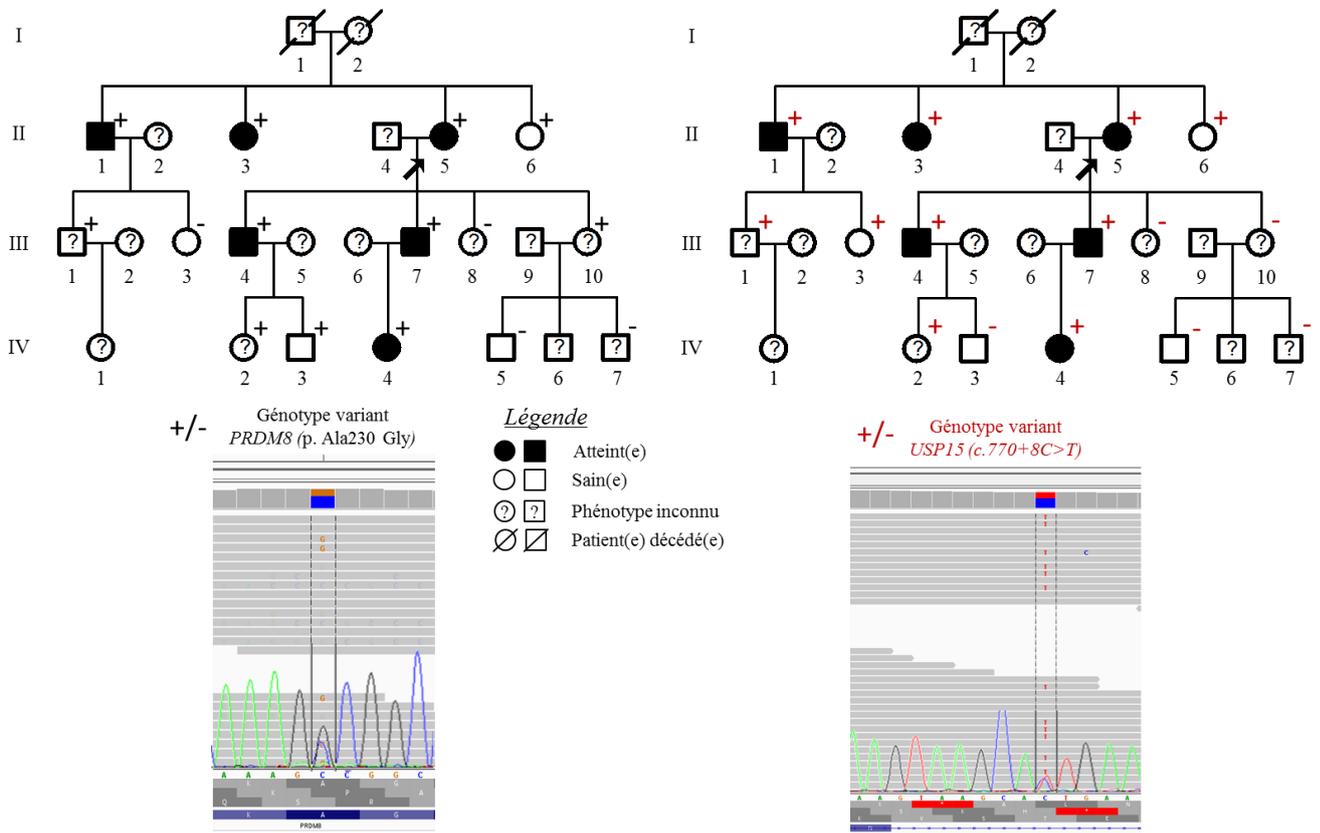


Figure 43: Analyse de co-ségrégation des variants *PRDM8*: p.Ala230Gly et *USP15*: c.770+8C>T au sein de la famille P

Visualisation de la co-ségrégation des variants *USP15* (chr12(GRCh37):g. 62743096C>T) (en rouge) et *PRDM8* (chr4(GRCh37):g.81123305C>G) (en noir). + correspond à la présence du variant à l'état hétérozygote, - à son absence. La présence des variants a été visualisée sur l'outil d'alignement IGV et permet de visualiser la présence de l'allèle alternatif pour environ la moitié des reads alignés. La présence de ce variant a été validée par séquençage capillaire (électrophorogramme correspondant superposé aux alignements IGV)

Le variant situé dans le gène *PRDM8* (chr4(GRCh37):g.81123305C>G), induit la substitution d'une Alanine en position 230 en Glycine (NM_020226.3 (*PRDM8*): p.Ala230Gly). Le second variant est situé dans le gène *USP15* (chr12(GRCh37):g.62743096C>T) et est situé dans un site d'épissage huit bases après l'exon 7 du gène *USP15*. NM_001252078.1 (*USP15*): c.770+8C>T).

- Hypothèses physiopathologiques de l'implication du variant *PRDM8* (p.Ala230Gly)

Le variant du gène *PRDM8* co-ségrège de manière intéressante avec la présence de PVM dans la famille P. La famille des PRDM (« pour **PRDI**-BF1 (Positive-regulatory domain I binding factor 1) and **RIZ** (Retinoblastoma interacting zinc finger) **Domain** and **Multiple** zinc finger domains ») comporte 17 membres très conservés au cours de l'évolution. Le gène *PRDM8* a été particulièrement étudié pour son implication dans le développement du système nerveux central et dans le développement rétinien (Di Zazzo et al. 2013). Prdm8 influe sur la régulation de l'expression génique grâce à son interaction avec son corépresseur bhlhb5 lors de l'assemblage neuronal. Une des cibles connue de ce complexe est le gène *CDH11* (codant pour la cadhérine 11) (Ross et al. 2012).

Enfin, des expérimentations sur des cellules interstitielles valvulaires de porc ont montré que l'inhibition de *CDH11* augmentait la différenciation des CIV en myofibroblastes (H. Wang, Leinwand, and Anseth 2014).

- **Hypothèses physiopathologiques de l'implication du variant *USP15* (c.770+8C>T)**

Le TGFβ active l'hétérodimérisation des récepteur I et II du TGFβ (TGFRI et II) qui provoque l'activation d'une cascade de signalisation impliquant les protéines Smads *via R-Smad* et régule l'expression génique. Cette voie de signalisation est finement régulée par des mécanismes d'ubiquitinylation réversibles qui conduisent à la dégradation des TGFβR par le protéasome (Wicks et al. 2006) (Kavsak et al. 2000).

Le gène *USP15* code pour un membre de la famille des « Ubiquitin Specific Protease » qui sont des enzymes de dé-ubiquitinylation.

En 2011, l'équipe de Stefano Piccolo a démontré que la protéine Usp15, dont les fonctions étaient méconnues jusqu'alors, était nécessaire à la régulation de l'activité transcriptionnelle des protéines Smad de la voie du TGFβ. De plus l'inhibition du gène orthologue d'*USP15*

chez le xénope provoque une forte diminution d'expression des gènes cibles de la voie du TGF β *via* une diminution de l'activité des protéines Smad (Inui et al. 2011).

En 2012, une étude menée sur l'implication d'Usp15 dans le glioblastome a identifié que ce dernier jouait un rôle majeur dans la régulation de la voie de signalisation induite par le TGF β . Les auteurs démontrent que Usp15 forme un complexe avec les protéines SMURF2 et SMAD7 et est recruté par le complexe des TGFBR. Usp15 permet ainsi la stabilisation du TGF β RI par dé-ubiquitinylation et ainsi fait perdurer l'activation de la cascade de signalisation induite par ce dernier (Eichhorn et al. 2012).

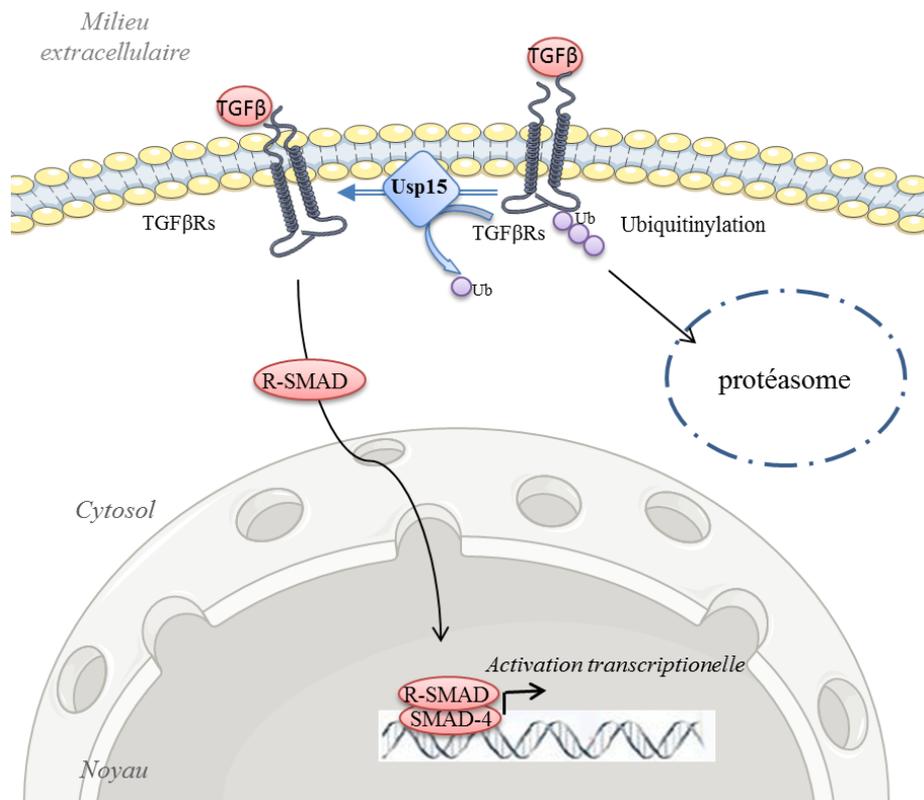


Figure 44: Représentation de l'activité de dé-ubiquitinylation d'Usp15 sur la voie de signalisation médiée par le TGF β
D'après (Aggarwal and Massagué 2012)

Les voies de signalisation dans lesquelles Usp15 est impliqué sont pertinentes notamment au regard de l'implication importante des voies de signalisation du TGF β dans les processus développementaux en particulier montré dans les formes syndromiques de PVM de type syndrome de Marfan. Cependant le variant identifié au sein de la famille P est retrouvé dans une région d'épissage 8 bases après la dernière base codante de l'exon 7 d'*USP15*. L'évaluation de l'implication fonctionnelle de ce variant nécessitera des expériences complémentaires afin d'évaluer sa capacité à modifier ce site d'épissage.

II.2.5 Famille S

II.2.5.1 Résultats des investigations cliniques de la famille S

Le premier cas de PVM au sein de cette famille a été **opéré à l'âge de 31 ans** (III:8, Figure 45). Il présentait une importante dilatation annulaire, une élongation des cordages tendineux et des valvules épaissies avec dégénérescence fibro-myxoïde justifiant l'implantation d'une valve mécanique. De plus, un autre patient de la famille (III:5, Figure 45) a bénéficié d'une plastie mitrale à l'âge de 53 ans. Le recrutement familial s'est étendu au reste de la famille et a permis d'identifier la **présence de 16 patients parmi cinquante individus apparentés phénotypés** à ce jour. L'âge moyen des individus atteints de PVM est de 51,9 ans et la patiente atteinte la plus jeune est âgée de 14 ans (Tableau 14). Les prolapsus mitraux apparaissent plus marqués pour les valvules postérieures (moyenne -3,48 mm) que pour les valvules antérieures (moyenne -1,26 mm).

De plus, des phénotypes malformatifs cardiaques sont observés. On retrouve quatre patients présentant des défauts valvulaires aortiques (bicuspidie ou pseudo-bicuspidie, insuffisance aortique (II:7, II:9, II:13, III:17)) et quatre patients atteints de non-compaction ventriculaire gauche (NCVG) (III:8, III:11, III:13 et IV:9).

La famille S est suivie depuis de nombreuses années par l'équipe clinique de cardiologie du CHU de Nantes et a fait l'objet d'une analyse génétique dans le cadre d'une forme particulière de syndrome du **QT-long associé à une dysfonction sinusale**. Lors de la première analyse, la famille était constituée de 56 membres vivants et 21 étaient atteints de dysfonction sinusale et d'un QT-long. Grâce à une approche de liaison par génotypage microsatellite un locus a été identifié sur le Chromosome 4 (4q25-4q27) avec un LOD score maximal de 7,05 (Schott et al. 1995). Dans un second temps, la **mutation responsable de la pathologie** a été identifiée au sein de ce locus dans le **gène ANK2** (codant pour l'ankyrine B) (NM_001127493_ANK2 (p. Glu1449Gly)) (Mohler et al. 2001). Cette découverte a permis de définir une nouvelle forme de QT-long, on parle de syndrome de QT-long de type 4.

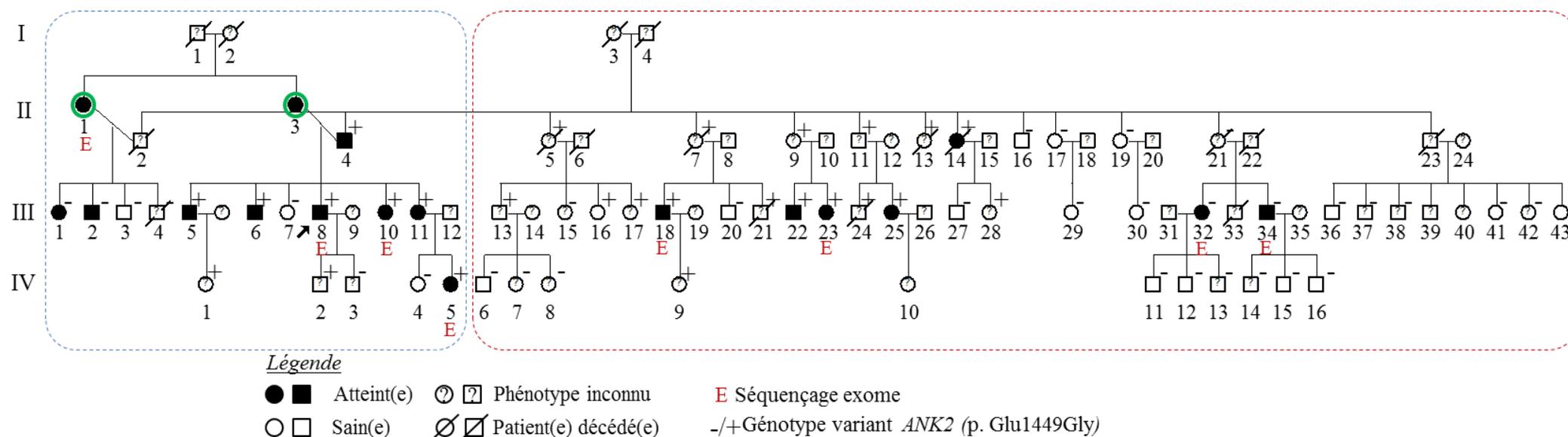


Figure 45: Arbre généalogique et représentation du phénotype PVM au sein de la famille S

La famille est composée de 16 individus atteints de PVM. Douze présentent le variant *ANK2* p.Glu1449Gly.

Les patientes II:1 et II:3 sont sœurs et sont les conjointes des patients II:2 et II:4 et sont atteintes de PVM

Quatre individus présentent des défauts valvulaires aortiques. La patiente II:7 présente une pseudo-bicuspidie aortique, la patiente II:13 a bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique, la patiente II:9 présente une insuffisance aortique et la patiente III:17 présente un bicuspidie aortique.

Les patients III:8, III:11, III:13 et IV:9 sont atteints de non-compaction ventriculaire gauche (NCVG).

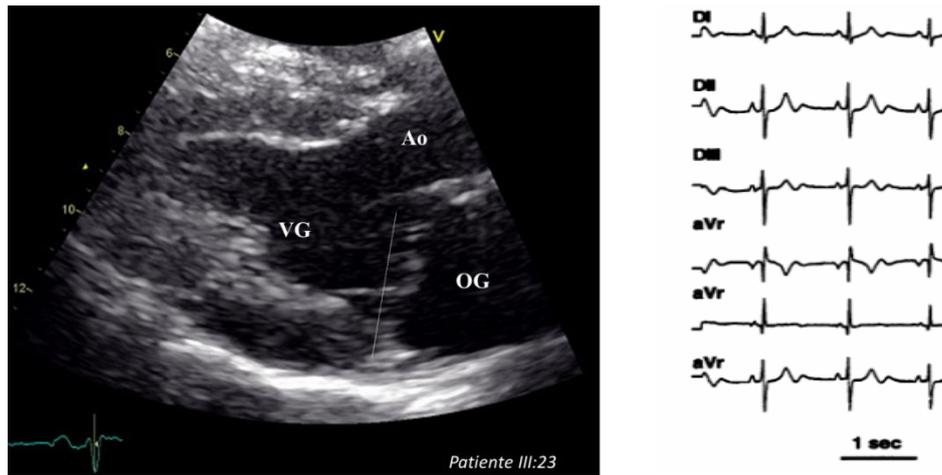


Figure 46: Examen échocardiographique de la patiente III:23 de la famille S et ECG d'un membre de la famille S porteur de la mutation ANK2 p.Glu1449Gly.

L'échocardiographie bidimensionnelle présentée permet d'observer un prolapsus bivalvulaire mitral.

L'image permet de visualiser un prolapsus bivalvulaire lors de la systole ventriculaire gauche (Prolapsus de la valvule antérieure = -2,3 mm et prolapsus de la valvule postérieure = -4,9 mm)

L'ECG présente une repolarisation caractérisée par une onde TU visible dans les dérivations DII et

DIII (QT-c = 450 ms et QTUc = 650 ms)

Individu	Âge	V. Ant (mm)	V. Post (en mm)	PVM	QTL4 / dysfonction sinusale	Génotype variant ANK2
II:4	87	0	-3,7	Atteint	Atteint	p.Glu1449Gly
III:1	44	-2,3	-1,8	Atteinte	Saine	WT
III:2	41	0,2	-4	Atteint	Sain	WT
III:5	59	Plastie mitrale à 53 ans		Atteint	Atteint	p.Glu1449Gly
III:6	56	-1,1	-3,9	Atteint	Atteint	p.Glu1449Gly
III:8	54	Implantation valve mécanique 31ans		Atteint	Atteint	p.Glu1449Gly
III:10	44	-2,3	-1,8	Atteinte	Atteinte	p.Glu1449Gly
III:11	47	-2,1	-3,9	Atteinte	Atteinte	p.Glu1449Gly
IV:5	14	0,3	-2,6	Atteinte	Atteinte	p.Glu1449Gly
II:14	76	-	-	Atteinte	Atteinte	p.Glu1449Gly
III:18	46	0	-3	Atteint	Atteint	p.Glu1449Gly
III:22	47	-3,8	-4	Atteint	Atteinte	p.Glu1449Gly
III:23	41	-2,3	-4,9	Atteinte	Atteinte	p.Glu1449Gly
III:25	43	0,5	-2,8	Atteinte	Atteinte	p.Glu1449Gly
III:32	65	-2,6	-4,7	Atteinte	Saine	WT
III:34	67	-0,9	-4,1	Atteint	Sain	WT

Tableau 14: Données phénotypiques des patients atteints de PVM de la famille S

Les mesures de prolapsus des valvules mitrales, antérieure (V. Ant) et postérieure (V. Post) sont reportées en millimètres. Les mesures négatives correspondent aux mesures au-dessus du plan de l'anneau. La moyenne d'âge des patients atteints est de 51,9 ans et la patiente atteinte la plus jeune est âgée de 14 ans. La présence de dysfonction sinusale et d'un QT-Long de type 4 au sein de cette famille est causée par la mutation ANK2 (p.Glu144Gly). WT correspond à l'absence du variant ANK2

II.2.5.2 Résultats et discussions des investigations génétiques de la famille S

Nous avons dans un premier temps émis l'hypothèse que le **PVM**, identifié au sein de cette famille, **était lié au variant ANK2** (p.Glu1449Gly) identifié dans le cadre de l'étude de la dysfonction sinusale et du syndrome du QT-Long pour cette famille. De plus le gène *ANK2* est fortement exprimé dans la valve mitrale (58,83 FPKM).

Le variant *ANK2* est retrouvé chez 12 patients sur 16 atteints de PVM. Les patients III:1 et III:2 ne présentent pas le variant *ANK2*, cependant, le phénotype mitral de leur père est inconnu et leur mère (II:1) est atteinte de PVM. De plus, les patient III:32 et III:34 sont atteints et ne présentent pas le variant *ANK2*.

A partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'un autre déterminant génétique responsable de PVM au sein de cette famille. Pour ce faire, nous avons réalisé le séquençage de sept exomes au sein de la famille. Le séquençage des exomes réalisé pour cette famille présente des données de couvertures moyennes supérieures à 40X (III:8=55X, III:10=73X, III:18=182X, III:23=114X, III:32=79X, III:34=101X, IV:5=53X).

La complexité de l'étude de l'origine génétique du PVM au sein de cette famille réside dans le fait que deux frères de la famille S (II:2 et II:4) ont épousé deux sœurs d'une autre famille (II:1 et II:3 en vert sur la Figure 45), elles aussi atteintes de PVM. L'origine génétique du PVM des descendants de ces deux couples peut être maternelle ou paternelle (encadré bleu - Figure 45).

Nous avons donc focalisé notre analyse sur la partie de la famille qui n'est pas affectée par cette « double entrée » de la pathologie (encadré rouge - Figure 45). Nous avons analysé les données des quatre patients atteints séquencés en exome dans cette partie de la famille (patients III:18, III:23, III:32 et III:34). L'analyse des données de séquençage d'exome de ces quatre patients a permis d'identifier 3 variants rares fonctionnels partagés par les quatre patients atteints (Annexe V.2 Tableau 23). Ces variants, retrouvés dans les gènes *MACF1* (chr1:39895535, G>A, p.Gly3580Asp), *RP1L1* (chr8:g.10480258, G>A, p.Arg152Trp) et *NKX2-6* (chr8:g.23559975T>C, p.Arg299Gly), **ne co-ségrègent pas avec le PVM au sein de la famille** (présence de plus de trois phénocopies pour chaque variant - *données non présentées*).

A partir de ces observations, il ne semble pas exister de déterminant génétique unique, y compris pour la branche familiale sans double entrée de la pathologie. Nous avons donc dans

un second temps inclus les données de séquençage des patients III:8, III:10, IV:5. Ces analyses ont permis d'identifier que neuf variants sont partagés par au moins cinq patients atteints de la famille. Les analyses d'exomes et les variants identifiés sont présentés dans les Tableau 24 et 25 (Annexes V.2).

Le variant *ANK2* (p.Glu1449Gly) apparaît comme étant le meilleur candidat pouvant être impliqué dans la survenue du PVM au sein de la famille S. Cependant, quatre patients atteints de PVM de deux fratries ne présentent pas le variant *ANK2* (III:1, III:2, III:33 et III:35).

Les patients atteints III:32 et III:34 sont frères et sœurs et ne présentent pas le variant *ANK2*. Cependant, les investigations sur la famille de leur père, font objets de cardiopathies valvulaires mitrales chez des apparentés au premier degré. Le phénotype mitral de leur père, n'a pas pu être investigué car ce dernier est décédé à l'âge de 32 ans (d'une leucémie).

Enfin, seule une femme saine (III:17) (sur 18 individus sains) de 56 ans présente le variant *ANK2*. Cependant, elle présente une bicuspidie aortique.

Il est intéressant de noter que les quatre patients présentant des affections aortiques (II:7, II:9, II:13, et III:17) présentent le variant *ANK2*, de la même manière que les quatre patients atteints de non compaction ventriculaire gauche (III:8, III:11, III:13 et IV:9).

- **Identification de nouveaux patients présentant le variant *ANK2* (p.Glu1449Gly)**

Dans le cadre de l'activité de diagnostic moléculaire du Centre de référence des Maladies rythmiques héréditaires et le Centre de prise en charge de la mort subite du sujet jeune de l'institut du thorax et dans le cadre de l'activité de recherche de l'institut sur le rétrécissement aortique calcifié, le variant *ANK2* (p.Glu1449Gly) a été identifié chez cinq autres patients.

Quatre de ces patients sont originaires du grand Ouest et un patient est originaire du centre de la France. Les phénotypes cardiaques de ces patients sont diverses.

Une patiente présentant la mutation *ANK2* (p.Glu1449Gly), a bénéficié de l'implantation d'un défibrillateur suite à un épisode de mort subite récupéré à l'âge de 23 ans (Cas index famille A, Tableau 15, Figure 47). Elle présente un aspect électrocardiographie de repolarisation précoce. De plus, cette patiente présente un PVM de type Barlow (phénotype à 26 ans). Le recrutement familial a permis d'identifier trois patients atteints (I:1, II:1 et II:2 -

Figure 47) de PVM au sein de cette famille et deux de ces patients présentent le variant *ANK2* (p.Glu1449Gly) (Tableau 15- famille F).

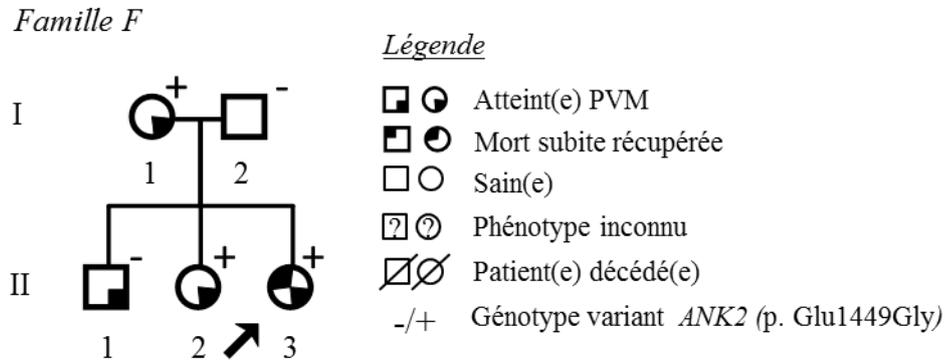


Figure 47: Arbre généalogique et phénotype PVM et Mort subite de la famille F

Un autre patient a bénéficié d'un remplacement de la valve aortique par une prothèse biologique à l'âge de 84 ans et présente le variant *ANK2* (p.Glu1449Gly). Ce patient présente une insuffisance mitrale et ses valvules mitrales apparaissent calcifiées (Famille V- Tableau 15 - Figure 47).

De plus trois autres patients présentent la mutation *ANK2* (p.Glu1449Gly) et sont atteints respectivement : du syndrome de Brugada (Famille Lem.- Tableau 15), de bloc atrio-ventriculaire dégénératif (Famille Fo.- Tableau 15) ou de dysplasie arythmogène du ventricule droit (Famille Pe.- Tableau 15).

Famille	Âge	Phénotypes des cas index	Mutation
F.	26	Mort subite (23 ans) Repolarisation précoce PVM de type Barlow	p.Glu1449Gly
V.	91	Rétrécissement aortique calcifié (op. 86 ans) Insuffisance mitrale (calcifiée)	p.Glu1449Gly
Lem.	68	Syndrome de Brugada	p.Glu1449Gly
Fo.	72	Bloc atrio-ventriculaire dégénératif	p.Glu1449Gly
Pe	39	Dysplasie arythmogène du ventricule droit	p.Glu1449Gly

Tableau 15: Phénotypes cardiaques des cas index présentant le variant *ANK2* p.Glu1449Gly

Le recrutement familial autour de ces cas index est en cours et permettra d'établir une relation phénotype/génotype du variant *ANK2* vis-à-vis des phénotypes cardiaques identifiés ainsi que les atteintes valvulaire mitrales et aortiques associées.

L'identification de ce variant au sein d'un large spectre de troubles cardiaques de dépolarisation et de repolarisation ventriculaires est concordante avec les observations faites dans des études de l'équipe de Peter Mohler. Ces études décrivent que des mutations du gène *ANK2* peuvent conduire à des phénotypes diverses comme des bradycardies, des arythmies sinusales, des blocs de conduction, des fibrillations ventriculaires idiopathiques suggérant ainsi par des études phénotypique chez l'Homme (P. J. Mohler et al. 2004) et sur des modèles cellulaires (P. J. Mohler et al. 2007) l'existence potentielle d'un syndrome d'arythmies cardiaques par des mutations perte de fonction du gène *ANK2*.

- **Hypothèses physiopathologiques de l'implication du variant *ANK2* (p.Glu1449Gly)**

Le gène *ANK2* code pour un membre de la famille des ankyrines, l'ankyrine-B. Cette famille de protéines permet un ancrage des protéines membranaires au cytosquelette impliquant la spectrine et l'actine. La famille des ankyrines joue un rôle dans les processus de motilité cellulaire, de prolifération et le maintien de protéines membranaires. La protéine Ankyrine-B est composée de cinq grands domaines. La partie N-terminale de la protéine est composée de 24 motifs ANK répétés qui permettent l'association avec les canaux ioniques, les transporteurs et les protéines d'adhésion cellulaire. Les deux domaines ZU5 sont impliqués dans l'interaction avec la spectrine β . L'ankyrine-B comporte deux domaines « death » impliqués dans les interactions avec l'obscurine et d'un domaine composé de 15 motifs répétés (Figure 48). Dans les cardiomyocytes, il a été démontré que l'ankyrine B

permettait l'assemblage de la pompe Na/K ATPase, de l'échangeur Na/Ca et du récepteur à l'IP3 au niveau des tubules transverses (P. J. Mohler, Davis, and Bennett 2005).

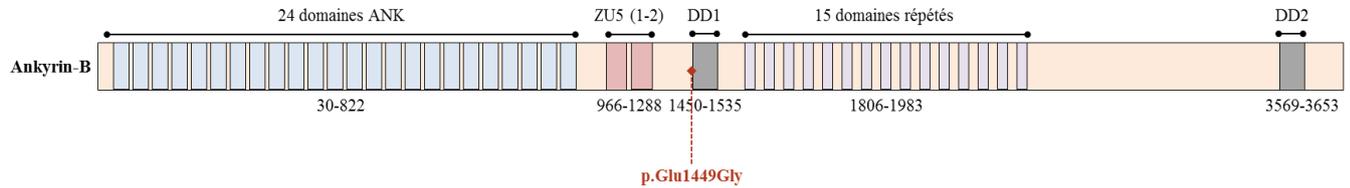


Figure 48: Représentation schématique de la protéine Ankyrine-B

L'ankyrine B est composée de 24 domaines répétés ANK de 33 acides aminés, de deux régions ZU5, deux « death domains » (DD) et 15 domaines répétés. Les variants ANK2 de la famille S sont localisés dans le death domain 1.

Le variant ANK2 de la famille S est retrouvé dans le domaine « death » de l'ankyrine-B. Ce domaine a été montré comme impliqué dans l'interaction avec l'obscurine (Cunha and Mohler 2008). L'obscurine est une protéine de la famille des Rho-GEF (Ras-Homolog Guanine nucléotide exchange factor). Des études chez le zebrafish ont démontré que l'inactivation du domaine GEF de l'obscurine générait des défauts de débit cardiaque et des œdèmes péricardiques, suggérant un rôle important de l'obscurine dans l'organogénèse cardiaque (Raeker and Russell 2011). De plus, la même équipe a démontré chez le zebrafish, que l'obscurine jouait un rôle dans la conformation de domaines spécifiques d'interaction avec la matrice extracellulaire (Raeker and Russell 2011). Il est possible que la mutation identifiée de l'ankyrine-B puisse modifier des fonctions natives de l'obscurine en particulier lors du développement cardiaque et dans ses propriétés d'interaction avec la matrice extracellulaire et ainsi influencer sur les mécanismes physiologiques de développement et de régulation des propriétés valvulaires.

Des dysfonctions sinusales primaires familiales ont été attribuées à des mutations dans les gènes *SCN5A* (Benson et al. 2003) (Smits et al. 2005) *ANK2* (Le Scouarnec et al. 2008) et *HCN4* (Milanesi et al. 2006) (Laish-Farkash et al. 2010) (Nof et al. 2007). Une étude publiée récemment a identifié une grande famille atteinte de dysfonction sinusale combinée à une non-compaction ventriculaire gauche. Les auteurs décrivent que les patients atteints présentent une mutation sur le gène *HCN4*. Ces résultats ont été validés par l'identification de nouveaux variants sur de petites familles présentant des phénotypes similaires, et par des

études fonctionnelles (Milano et al. 2014). Enfin, les auteurs décrivent que deux patients de la famille ont bénéficié d'un traitement chirurgical de la valve mitrale.

Les phénotypes décrits correspondent aux phénotypes observés chez les patients de la famille S. Cependant, aucun variant *HCN4* n'est identifié, il est possible que la présence de la mutation *ANK2* puisse provoquer l'apparition d'un phénotype similaire avec une expressivité variable sur le phénotype de PVM, de dysfonction sinusale et de non-compaction ventriculaire gauche. Dans ce sens, deux études posent l'hypothèse de l'existence d'un « ankyrin-B syndrome » (P. J. Mohler et al. 2007) (Robaei, Ford, and Ooi 2015).

Afin d'évaluer les répercussions du variant *ANK2* de la famille S sur le phénotype mitral, un modèle de souris présentant spécifiquement ce variant est en cours d'évaluation par échocardiographie dans le laboratoire de Peter Mohler (au sein du Dorothy M. Davis Heart & Lung Research Institute, Columbus, OH).

II.2.6 Étude des autres cas familiaux atteints de PVM

Le projet d'analyse familiale dans sa globalité comporte 18 familles atteintes de PVM ayant bénéficié de séquençage d'exome et font l'objet d'analyses génétiques similaires à celles des familles présentées précédemment.

II.2.6.1 Résultats et discussion des investigations cliniques et génétiques de 13 familles atteintes de PVM

Ces 13 familles ont été identifiées à partir de cas index qui ont bénéficié de chirurgies mitrales et sont âgés de 33 à 78 ans (Tableau 16). Le recrutement familial à partir de ces cas index a permis d'identifier de 1 à 9 individus apparentés atteints au sein de ces familles (Tableau 16) (Figure 49).

Familles	Âge cas index	Nb Atteints	Nb. exomes séquencés
D.	36	10	2
Lu.	33	5	2
J.	64	5	2
T.	58	5	4
Bo.	60	3	2
Le.	68	3	2
C.	59	3	2
Ro.	57	4	3
Pi.	58	3	2
Bi.	78	3	2
Li.	62	2	2
Mo.	63	2	2
Co.	71	2	2

Tableau 16: Caractéristiques des treize autres familles composées d'au moins deux patients atteints ayant bénéficié d'un séquençage d'exome.

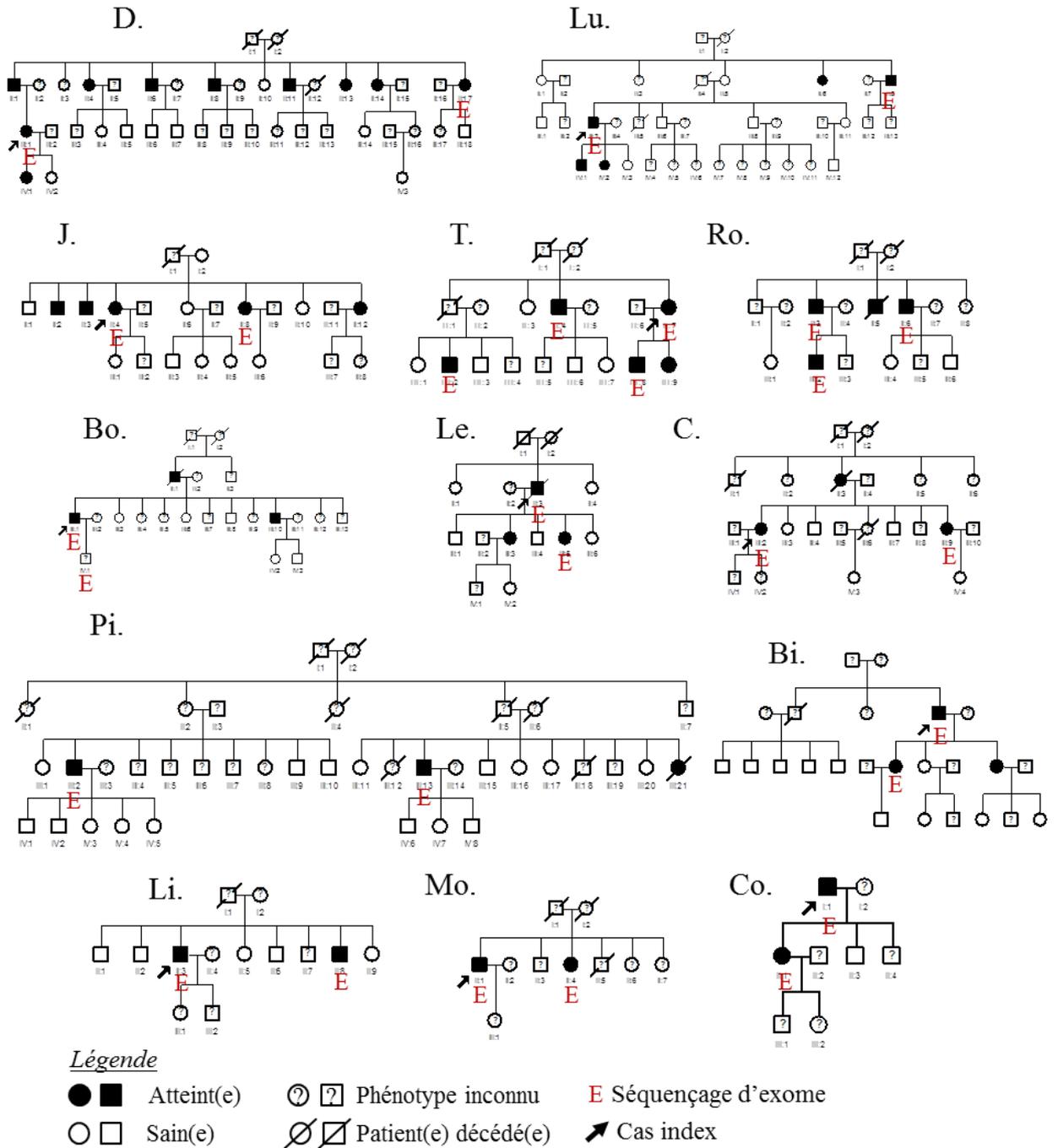


Figure 49: Arbres généalogiques et représentation du phénotype PVM pour les treize autres familles étudiées

Les familles étudiées sont composées de 2 à 10 individus atteints

Familles	Nb variants rares
D.	55
Lu.	49
J.	96
T.	12
Bo.	111
Le.	100
C.	48
Ro.	41
Pi.	19
Bi.	77
Li	62
Mo.	108
Co.	97

Tableau 17: Résultats des analyses de séquençage d'exome

Les filtres successifs d'analyse d'exome ont été réalisés avec l'outil Knime4bio et permettent de conserver les variants fonctionnels décrits par Variant Effect Predictor (VEP), rares (bases de données publiques et internes), retrouvés par les deux algorithmes de « calling » et partagés par les individus atteints séquencés. (Les étapes de l'analyse et les bases de données utilisées sont décrites dans le matériel et méthodes chapitre IV.2.2.4)

Pour chaque famille, nous avons recherché les variants rares fonctionnels partagés par les patients atteints d'une même famille ayant bénéficié d'un séquençage d'exome. Le nombre de variants identifié par famille, présenté dans le Tableau 17, est en phase avec l'informativité génétique des familles.

Dans un premier temps, ces analyses nous permettent d'identifier que ces familles ne présentent pas de variants dans un gène majeur qui serait responsable de la pathologie. De plus, aucune de ces familles ne comporte de variant rare dans les gènes précédemment décrits dans les analyses familiales.

Enfin, le recrutement de nouveaux patients au sein de ces familles ainsi que la poursuite des analyses de co-ségrégation des variants identifiés permettront à court terme d'identifier de nouveaux gènes candidats impliqués dans la pathogénèse du PVM.

II.2.7 Conclusions et perspectives (projet #2)

L'analyse génétique des 18 familles étudiées **n'a pas permis d'identifier de gènes majeurs** impliqués dans la pathogénèse du PVM suggérant une importante **hétérogénéité génétique**. De plus, nous observons une **pénétrance incomplète** des mutations identifiées au sein des familles étudiées **qui varie en fonction de l'âge des individus**.

Cependant, ces analyses ont permis d'identifier **cinq nouveaux gènes** potentiels responsables de PVM au sein de familles et permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives quant à la compréhension des bases génétiques du PVM.

II.2.7.1 Implication du remodelage du cytosquelette d'actine et de la mécano-transduction

Dans un premier temps, nous avons identifié le variant **p.Arg1549Gln** dans le gène *DOCK1* au sein de la famille B. *DOCK1* est impliqué dans des voies de structure du cytosquelette d'actine et de remodelage de ce dernier. L'implication du gène *DOCK1* dans l'apparition de dystrophies valvulaires mitrales avait été suggérée par l'étude de modèles murins, cependant, nous identifions pour la première fois chez l'Homme l'implication potentielle de ce gène. De plus l'identification de *DOCK1* renforce nos études précédentes démontrant le rôle manifeste du **remodelage du cytosquelette d'actine et de la mécano-transduction** dans la pathogénèse du PVM (Figure 50).

Nous avons démontré successivement l'implication des gènes *FLNA*, *ARHGAP24* et *DOCK1* dans la pathogénèse du PVM. Ces acteurs participent aux complexes impliquant les intégrines, le cytosquelette d'actine, la filamine et des protéines associées dont la tensine, FilGAP et Dock180 et jouent un rôle majeur dans la mécano-transduction, dite intrinsèque, et vont conduire à des modifications cellulaires structurelles par polymérisation du cytosquelette d'actine (Figure 50).

II.2.7.2 Implication des voies de la transition épithélio-mésenchymateuse

Dans un second temps, à partir de l'identification des mutations **p.Gly1412Ala** et **p.Ile328Met** dans les gènes *APC* et *PTPRF* respectivement, nous démontrons l'implication des **voies Wnt/ β -caténines** dans l'apparition du PVM chez l'Homme (Figure 50). L'implication de cette voie a été démontrée dans des études développementales chez le zebrafish et dans des modèles cellulaires, cependant l'impact de mutations dans des gènes impliqués dans cette voie de signalisation n'avait pas été identifié dans le cadre de valvulopathies chez l'Homme et suggère son importance dans des mécanismes pathogènes **à l'âge adulte**.

Nous avons ensuite identifié la présence d'un variant retrouvé dans un site d'épissage du gène *USP15* (c.770+8C>T) au sein de la famille P. *Usp15* est impliqué dans les **voies de**

signalisation médiées par le TGF β impliquées dans les formes familiales de PVM syndromiques apparentées au syndrome de Marfan (Figure 50). Cependant, les patients de la famille ne présentent pas de manifestations cliniques concordantes avec des affections syndromiques. L'identification de ce gène comme potentiellement impliqué dans les formes familiales de PVM non-syndromique suggère l'existence de **mécanismes physiopathologiques communs aux affections retrouvées dans le syndrome de Marfan**.

Les gènes identifiés sont impliqués dans des voies de signalisation de la transition épithélio-mésenchymateuse lors du développement valvulaire. De plus, une étude récente issue de l'équipe de Jordan Miller de la Mayo Clinic (Rochester) décrit des modifications importantes des profils d'expression de plus de 2000 gènes au sein de valves dystrophiques avec dégénérescence myxoïde. De manière intéressante, ils identifient une surexpression des gènes impliqués dans la valvulogénèse et plus particulièrement dans les processus d'EMT (Thalji et al. 2015). Ils observent une surexpression des ligands Wnt et de leurs récepteurs Fzd (Figure 50) mais aussi des facteurs de transcription (TCF) impliqués dans la voie Wnt/ β -caténines. De plus, ils décrivent une surexpression des acteurs de la voie du TGF β et des Bmps suggérant des mécanismes transcriptionnels réactivés lors de processus myxomateux valvulaires.

La réactivation de processus développementaux impliqués dans la valvulogénèse comme l'EMT dans les valves atteintes de formes dégénératives de PVM, apporte de nouvelles interrogations sur les mécanismes pathologiques impliqués.

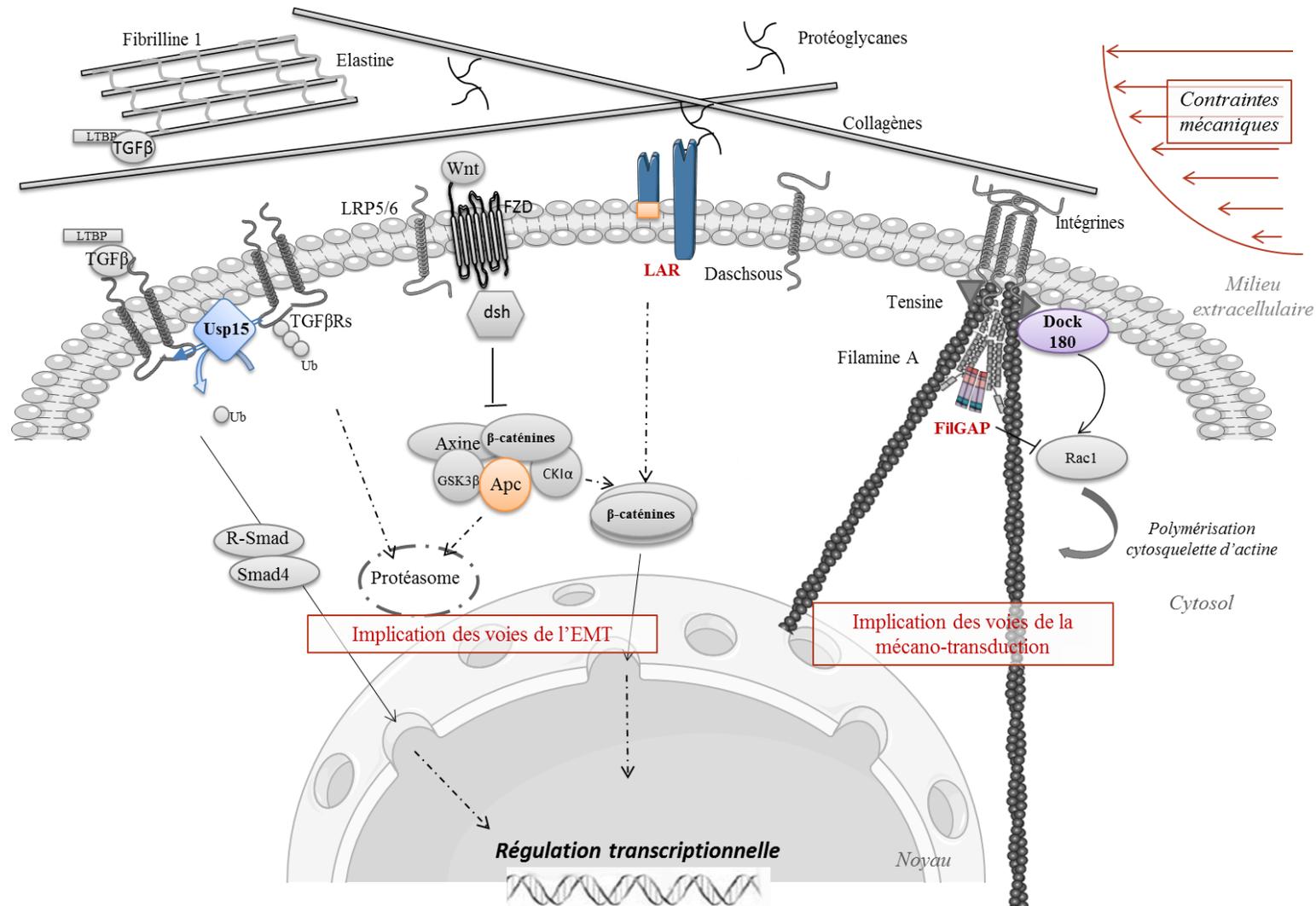


Figure 50: Représentation schématique de l'implication des voies de signalisations impliquées dans les mécanismes de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et dans les voies de la mécano-transduction

Implication potentielle du gène ANK2 dans un « syndrome Ankyrine-B »

Enfin, nous avons identifié le variant **p.Glu1449Gly** dans le gène *ANK2* comme potentiellement impliqué dans la pathogénèse du PVM. Ce variant a été retrouvé dans des contextes de cardiopathies rythmiques de différentes natures (syndrome de Brugada, bloc atrioventriculaire dégénératifs, Dysplasie arythmogène du ventricule droit, repolarisation précoce) et suggère **l'existence d'un syndrome plus complexe** lié à l'ankyrine-B qui inclut potentiellement la présence de PVM.

Limites des approches de séquençage haut débit utilisées

Les nouvelles technologies de séquençage sont des outils puissants de recherche en génétique mais les méthodes de capture utilisées, ne sont pas « infaillibles ». En effet, malgré l'application de seuils de qualité, basés sur la couverture de séquençage moyenne, il peut exister des régions géniques faiblement couvertes ponctuellement et ainsi les variants situés dans ces régions ne sont pas identifiés.

De plus, nous avons basé notre analyse sur le séquençage des régions codantes du génome (exome). Ces régions sont, dans leur grande majorité, bien décrites et de ce fait leur analyse est plus évidente. Cependant, nous ne pouvons pas exclure l'existence de variants retrouvés dans des régions non-codantes qui pourraient avoir un impact sur la présence de PVM au sein de familles.

Projet #3

Recherche de variants rares dans les gènes candidats et test d'enrichissement en variants rares

Les analyses génétiques des formes familiales de PVM d'origine syndromiques ou non syndromiques, ainsi qu'une étude très récente d'association génome entier, ont permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le PVM. Ces gènes sont retrouvés dans des voies de signalisation d'intérêt, cependant concernant les études familiales des formes non syndromiques, l'impact des gènes identifiés est restreint à une faible proportion des cas familiaux identifiés.

De plus, pour les 18 familles identifiées et analysées (projet#2) certaines analyses de co-ségrégation restent limitées en raison de la faible informativité génétique de certaines familles.

Le projet#3 a pour objectifs :

- 1- d'estimer la fréquence de variants dans les **gènes** précédemment identifiés par les analyses familiales dans une population **de patients atteints isolés** et de **prioriser le recrutement familial** autour de ces cas index.
- 2- de **tester l'enrichissement en variants rares** des gènes candidats ciblés dans notre série de cas PVM isolés en comparaison à une série d'individus contrôles.

Dans ce cadre, grâce au développement de technologies de séquençage ciblé de nouvelle génération, nous avons développé un **kit de re-séquençage haut-débit** destiné à séquencer en parallèle un set de **78 gènes candidats** sur un nombre important de patients à faible coût. Ainsi, nous avons séquencé une série de **273 patients isolés atteints de PVM**.

III.1 Caractéristiques cliniques des patients «isolés »

Les 273 patients sont issus d'un recrutement par les Centres Hospitaliers Universitaires de Nantes, Rennes et Angers. Les examens cliniques et les critères diagnostiques utilisés sont similaires à ceux du projet#2.

Parmi les 273 patients recrutés, on retrouve 44% de maladie de Barlow et 28% de formes de dégénérescence fibro-élastiques (FED) (Tableau 18). 78% des patients atteints de PVM de type Barlow ont été opérés à un âge moyen de 63,5 ans et 63% des patients atteints de PVM de type FED opérés à un âge moyen de 65,2 ans. L'âge moyen d'opération apparaît plus précocement chez les patients atteints de PVM-FED que chez les patients atteints de PVM Barlow. Ces données semblent concordantes avec les données de la littérature (Anyanwu and Adams 2007). Cependant des formes précoces sont retrouvées dans les deux groupes de patients.

Parmi les 273 patients, on retrouve 70% d'hommes et 30% de femmes (Tableau 18). 63% des patients recrutés ont été opérés à un âge moyen de 63,9 ans. Le PVM présente des répercussions plus importantes chez les hommes, en effet, 67,7 % des hommes atteints de PMV ont été opérés (92 sur 130) contre 54,3% chez les femmes (44 sur 81). Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature décrivant des affections plus importantes chez les hommes. Cependant, les études sur de grandes cohortes d'individus décrivent une plus forte prévalence de la pathologie chez les femmes (L. Freed et al. 1999).

	Nombre d'individus	Hommes	Femmes	Opérés	Age moyen d'opération
PVM	273	192 (70%)	81(30%)	172 (63%)	63,9 (26-86)
Barlow	121 (44%)	84 (69,4%)	37(30,6%)	93 (76.8%)	63,5 (26-86)
FED	77 (28%)	62 (80,6%)	15 (19,4%)	49 (63%)	65,2 (41-85)

Tableau 18: Données cliniques de la série de patients PVM ayant bénéficié d'un séquençage ciblé.

III.2 Conception du kit de re-séquençage (*HaloPlex, Agilent technologies*) et résultats

Nous avons développé un kit de re-séquençage de régions codantes de 78 gènes candidats. Ce kit a été développé en utilisant la technologie HaloPlex (Agilent Santa Clara, CA, États-Unis) (Matériel et Méthodes - IV.2.2.1) et permet la capture de 390 kb.

Les gènes inclus dans le kit sont issus :

- des gènes décrits dans les formes familiales de PVM non syndromiques (*DCHS1* et *FLNA*)
- des gènes identifiés (ou suspectés) précédemment dans 18 familles étudiées (40 gènes dont *PTPRF*, *APC*, *DOCK1* et *ANK2*)
- des gènes retrouvés au sein des loci d'association avec le PVM (15 gènes dont *TNSI* et *LMCD1*)
- des gènes de formes syndromiques de PVM (*FBNI*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD4*)
- des gènes candidats issus des analyses fonctionnelles impliqués dans des voies de signalisation importantes dans le développement et le maintien de l'homéostasie valvulaire ou issus d'analyse d'exome de cas isolés (18 gènes) (Tableau 19). La liste complète des gènes est présentée en annexes (V.2).

	Nombre de gènes
Issus des analyses familiales PVM non-syndromiques	42
Issus de l'étude d'association (GWAS)	15
Issus des analyses des formes syndromiques familiales majeures	4
Issu des analyses fonctionnelles et données de la littérature et issus d'analyses d'exomes sur cas isolés	17
Total	78

Tableau 19: Critères de choix et nombre de gènes inclus dans le design du kit de re-séquençage

Les sondes de capture sont générées afin de couvrir les exons des gènes décrits par les bases de données RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) et Ensembl

(<http://www.ensembl.org/index.html>) avec 10 au moins paires de bases (pb) capturées de part et d'autres des exons ciblés. La conception du kit a été réalisée grâce à l'outil du fournisseur (SureDesign <https://earray.chem.agilent.com/suredesign/index.htm> - Agilent Technologies) et comporte 390 927 pb. La préparation des bibliothèques et le séquençage haut débit des régions cibles sont décrites dans les matériels et méthodes (V.2.2.1).

Les 78 gènes du kit, ont été séquencés pour les 273 patients, avec une couverture moyenne de 280X. Seul un échantillon présentant une couverture moyenne inférieure à 100X a été exclu de l'analyse et sera re-séquencé lors de futures expériences. Les données de couvertures moyennes sont disponibles en annexe (V.3).

Sur l'ensemble des séquences obtenues, 97% des bases des régions ciblées sont couvertes au moins par dix « reads » et 95% sont couvertes par au moins 20 reads.

L'analyse des données de séquençage permet de conserver les variants **fonctionnels**, **rare**s (Fréquence de l'allèle mineur inférieure à 0.1%). Les étapes de l'analyse sont décrites dans les « matériels et méthodes » (IV.2.2.4).

III.3 Identification de nouveaux variants rares dans les gènes de susceptibilité

III.3.1 Identification de variants dans le gène ARHGAP24

Cette approche a permis d'identifier sept variants rares dans le gène *ARHGAP24*. Parmi ces sept variants, quatre (p.Arg95Gln, p.Pro417His, Thr481Met et p.Gln671*) co-ségrègent au sein de familles présentant des PVM de type FED. L'identification de ces variants a conduit aux investigations fonctionnelles : *in-vivo* (zebrafish); cellulaires et biochimiques présentées dans le projet#1.

III.3.2 Identification de nouveaux variants rares dans les gènes issus des analyses familiales

Nous avons focalisé notre analyse sur les variants retrouvés dans les gènes identifiés par les approches familiales précédemment présentées et publiées à ce jour pour les formes non syndromiques de PVM.

Au total, nous retrouvons 54 variants modifiant les séquences protéiques ou retrouvés dans des régions d'épissage chez 51 patients. Les variants sont considérés dans les régions d'épissage lorsqu'ils sont situés entre 1 à 3 bases dans l'exon ou entre 3 à 8 bases de l'intron. Ces variants ont été visualisés sur l'interface IGV.

Gène	Nombre de variants rares fonctionnels	Nombre de patients	Patients présentant plusieurs variants rares dans le même gène
<i>FLNA</i>	2	2	0
<i>DCHS1</i>	14	14	0
<i>PTPRF</i>	12	10	2
<i>APC</i>	5	5	0
<i>ANK2</i>	12	11	1
<i>DOCK1</i>	9	9	0
Total	54	51	3

Tableau 20: Nombre de variants retrouvés dans les gènes décrits ou suspectés dans les formes familiales non syndromiques de PVM.

III.3.3 Identification de variants dans le gène *PTPRF*

Nous retrouvons 12 variants rares dans le gène *PTPRF* dont un retrouvé dans les deux isoformes décrites précédemment (*PTPRF* (p. p.Arg77His)) (Tableau 28 - Figure 51) Annexes V.4). Cinq patients ont bénéficié d'actes chirurgicaux (entre 50 et 72 ans) et les formes de PVM observées sont de types Barlow ou FED.

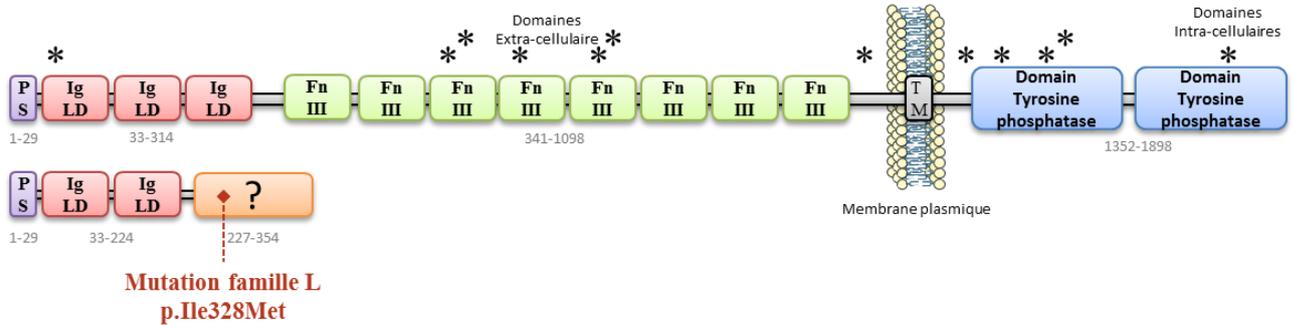


Figure 51: Représentation schématique de la protéine LAR codée par le gène *PTPRF* et variants rares détectés

Le variant identifié au sein de la famille L (*PTPRF* p.Ile328Met) est représenté en rouge et les variants identifiés sur les cas index par re-séquençage, sont représentés par les *.

III.3.3 Identification de variants dans le gène *APC*

Nous avons détecté cinq variants rares dans le gène *APC* (Tableau 28 – Annexes V.4). Quatre patients ont bénéficié d'actes chirurgicaux (entre 34 et 78 ans) et les formes de PVM observées sont préférentiellement de types Barlow. Le variant *APC* (p.Arg1153Cys) a été retrouvé chez deux patients. Ce variant est un variant très rare (MAF=3,07E-04), cependant, les deux patients identifiés ne semblent pas apparentés. Le recrutement familial permettra d'identifier de nouveaux membres et d'analyser leur apparentement lointain potentiel.

Un variant *APC* (p.Arg1153Cys) est retrouvé dans une région d'interaction avec les β -caténines et l'axine (Figure 52).

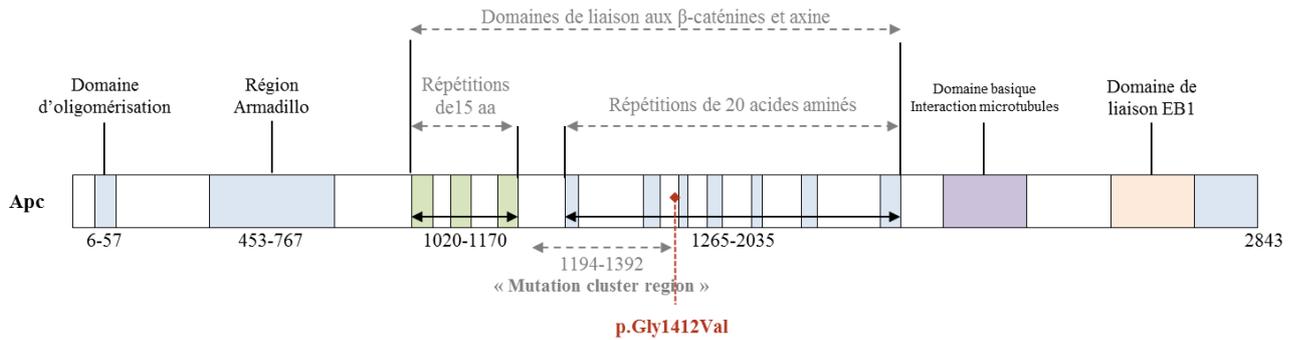


Figure 52: Représentation schématique de la protéine Apc et variants rares retrouvés

Le variant identifié au sein de la famille R (APC p.Gly1412Val) est représenté en rouge et les variants identifiés sur les cas index par re-séquençage, sont représentés par les *.

III.3.4 Identification de variants dans le gène *DOCK1*

Nous avons identifié neuf variants rares dans le gène *DOCK1* (Tableau 28 – Annexes V.4). Six patients ont bénéficié d'actes chirurgicaux (entre 62 et 80 ans). Deux variants retrouvés dans des sites d'épissage (chr10(GRCh37):g.129160479A>G, (c.3369+3A>G) et chr10(GRCh37):g.129216807T>C, (c.4629+2T>C) sont retrouvés respectivement chez deux patients qui ne semblent pas apparentés.

De plus, à partir de l'identification de ces variants trois noyaux familiaux ont été identifiés avec la présence d'au moins un apparenté atteint (Figure 53). Le variant *DOCK1* (p.Val1859Met) identifié dans une famille composée de cinq patients atteints ne co-ségrège pas avec le PVM au sein de la famille (présence d'une phénocopie chez la patiente II:1).

Les variants *DOCK1* apparaissent préférentiellement dans la partie C-terminale de la protéine et le recrutement familial permettra d'évaluer l'implication de ces variants au sein de nouveaux noyaux familiaux (Figure 53).

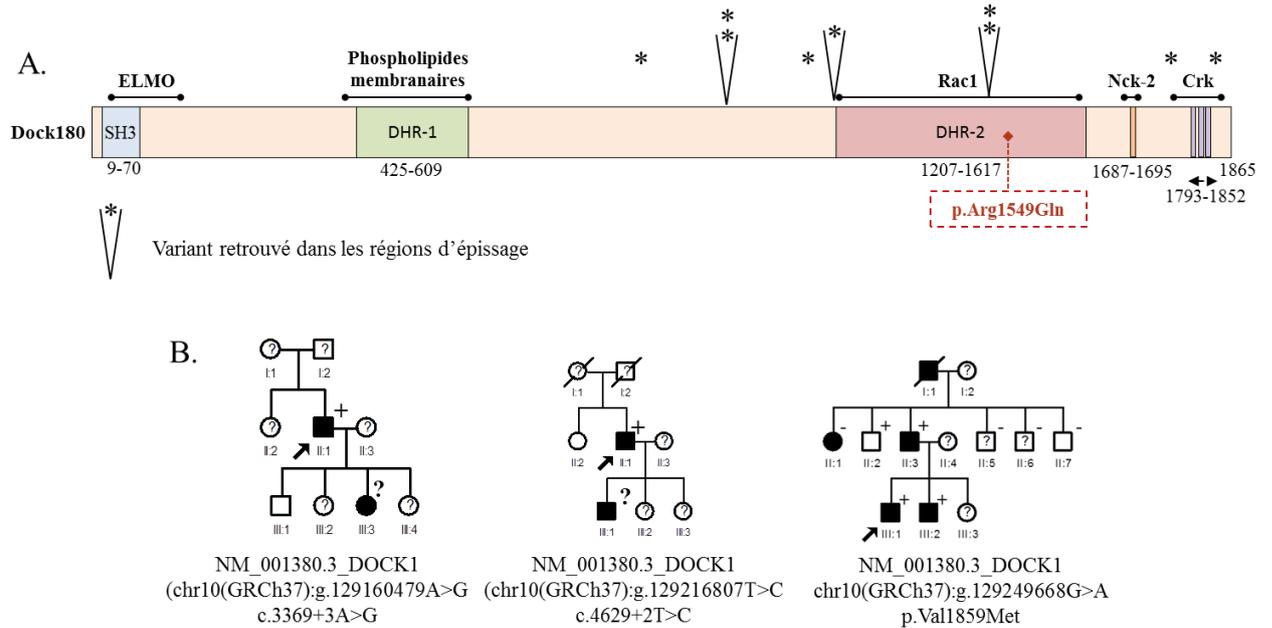


Figure 53: Représentation schématique de la protéine Dock180 et variants rares retrouvés

A. Le variant identifié au sein de la famille B est représenté en rouge et les variants identifiés sur les cas index par re-séquençage, sont représentés par les *.

B. Représentation de trois noyaux familiaux identifiés à partir du re-séquençage du gène DOCK1. Le signe + indique les patients porteurs du variant familial

III.3.5 Identification de variants dans le gène ANK2

Nous avons identifié 12 variants rares dans le gène ANK2 (Tableau 28 – Annexes V.4). Cinq patients ont bénéficié d'actes chirurgicaux (entre 49 et 82 ans). Deux variants ANK2 sont retrouvés chez un même patient (CD14349, Tableau 28 – Annexes V.4).

A partir de l'identification de ces variants trois noyaux familiaux ont été identifiés avec la présence d'au moins un apparenté atteint (Figure 54). Le variant p.Gly1430Cys est retrouvé chez le cas index d'une famille de 7 patients atteints, mais ne co-ségrége pas avec la pathologie (seul le cas index présente le variant - données non présentées).

De manière intéressante, les variants identifiés sont concentrés dans une région centrale de la protéine comprenant le domaine Death 1.

Enfin, deux patients présentent le même variant que la famille S (p.Glu1449Gly). Grâce aux premières investigations familiales ces patients ne semblent pas reliés généalogiquement posant l'hypothèse d'une mutation fondatrice au sein de la région du grand Ouest.

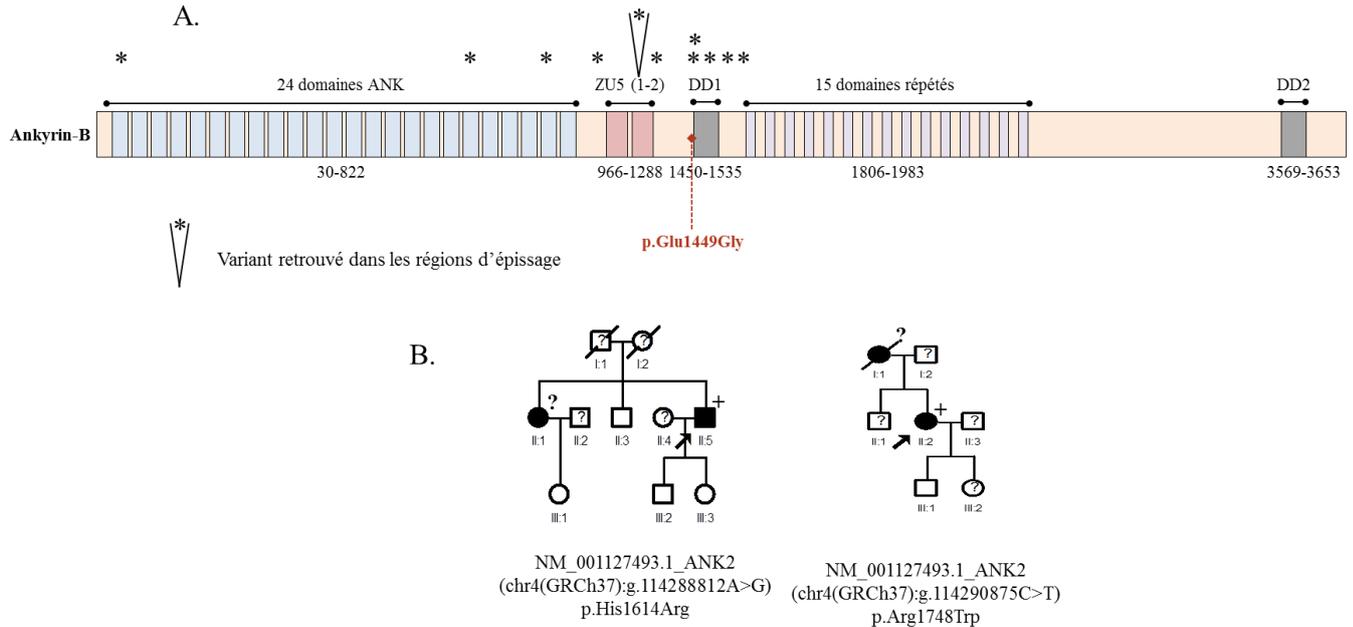


Figure 54: Représentation schématique de la protéine Ankyrine-B et variants rares retrouvés

A. Le variant identifié au sein de la famille S est représenté en rouge et les variants identifiés sur les cas index par re-séquençage, sont représentés par les *.

B. Représentation de deux noyaux familiaux identifiés à partir du re-séquençage du gène ANK2. Le signe + indique les patients porteurs du variant familial

III.3.6 Identification de variants dans le gène FLNA

Nous avons identifié 2 variants rares dans le gène *FLNA* (Tableau 28 – Annexes V.5). Le premier, *FLNA* (p.Ala2243Gly) a été identifié chez une patiente a bénéficié d'un acte chirurgical (à l'âge de 83 ans).

Le second, *FLNA* p.Gly844Cys, semble intéressant en raison de sa proximité avec les variants causaux identifiés précédemment et est retrouvé au sein d'un noyau familial de quatre patients atteints. Les parents du cas index sont tous les deux atteints, en revanche, le variant ne peut être hérité que de sa mère en raison de sa localisation sur le chromosome X.

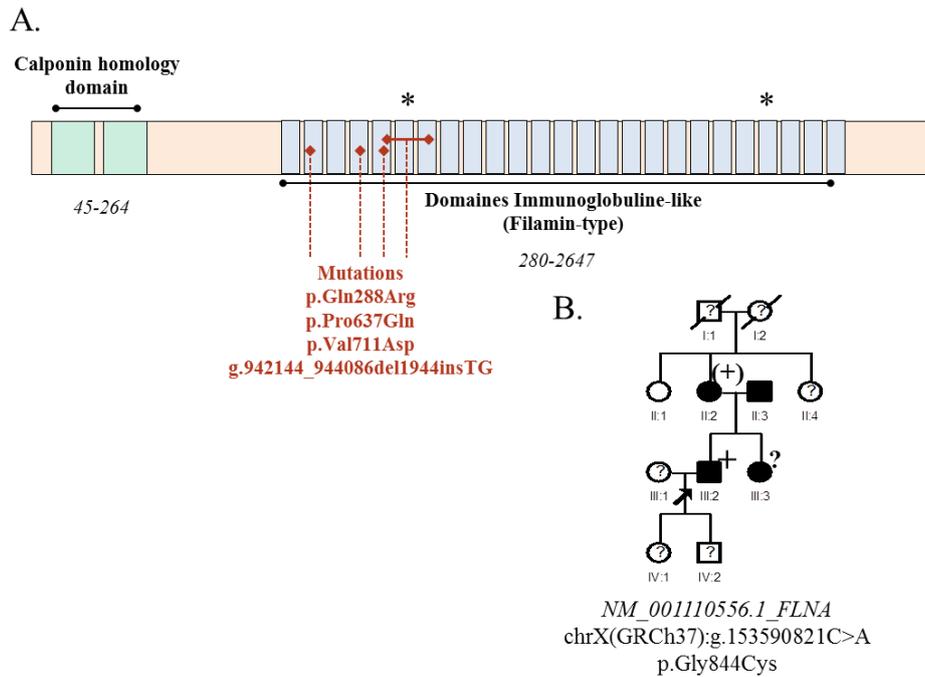


Figure 55: Représentation schématique de la protéine Dock180 et variants rares retrouvés

- A. Les variants identifiés initialement au sein des familles originales sont représentés en rouge et les variant identifiés sur les cas index par re-séquençage, sont représentés par les *.
- B. Représentation du noyau familial identifié à partir du re-séquençage du gène FLNA. Le signe + indique les patients porteurs du variant familial

III.3.7 Identification de variants dans le gène DCCHS1

Nous avons identifié 14 variants rares dans le gène *DCCHS1* (Tableau 28 – Annexes V.5). Huit patients ont bénéficié d'actes chirurgicaux à des âges relativement précoces (moyenne d'âge, 55,1 ans de 31 à 70 ans. Seul un noyau familial est pour le moment identifié (Figure 56).

Les 14 variants sont retrouvés dans les domaines de type cadhérine. De plus, parmi les 14 variants, neuf touchent des Arginines. Les mutations identifiées dans les familles initiales ayant permis la découverte de ce gène (Durst et al. 2015) substituent aussi des Arginines suggérant un rôle important de ces acides aminés plus particulièrement dans la fonction de la protéine Dachsous associé au PVM.

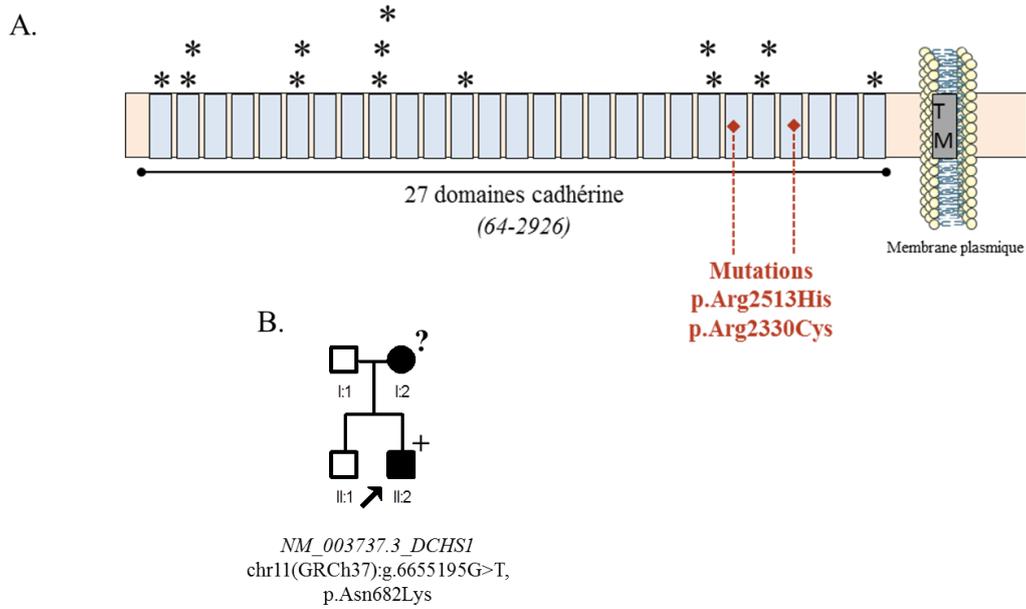


Figure 56: Représentation schématique de la protéine Dachsous et variants rares retrouvés

A. Les variants identifiés au sein des familles originales sont représentés en rouge et les variant identifiés sur les cas index par re-séquençage sont représentés par les *.

B. Représentation du noyau familial identifié à partir du re-séquençage du gène *DCHS1*. Le signe + indique les patients porteurs du variant familial

III.4 Test d'enrichissement en variants rares

Nous avons focalisé notre attention sur les variants rares ayant des fréquences de l'allèle mineur inférieures à 0,1% dans les populations européennes du projet 1000 Genomes et de la base de données Exome Variant Server. Les données de séquençage ont été filtrées afin de s'affranchir de variants faux-positifs (matériel et méthodes IV.2.8)

Le test d'enrichissement (CAST ('*cohort allelic sums test*') (Morgenthaler and Thilly 2007)) a permis de calculer un enrichissement en variants rares dans notre série de patients PVM (272 patients) comparé à une population contrôle (881 individus UK10K).

Les résultats préliminaires des tests réalisés sont présentés dans les tableaux 21 et 22. Tout gène ayant une p-valeur inférieure à 0,05 suggère une association possible au PVM.

Gènes	Cas PVM	Contrôles (UK10K)	p-valeurs	Odds Ratios
GATA6	2,21% (6)	0,11% (1)	0,00092647	19,7985
LRP12	3,68% (10)	0,68% (6)	0,00093096	5,5555
GATA4	2,21% (6)	0,23% (2)	0,00297251	9,8868
USP9X	1,84% (5)	0,23% (2)	0,00970834	8,2112
BMP1	3,68% (10)	1,14% (10)	0,01292111	3,3201
KLF2	1,1% (3)	0% (0)	0,01301802	Inf
GATA5	2,57% (7)	0,68% (6)	0,01716219	3,8462
FLNC	7,35% (20)	3,86% (34)	0,0214593	1,9759
GLIS1	3,31% (9)	1,25% (11)	0,03202575	2,7037
NKX2-6	1,84% (5)	0,45% (4)	0,03815176	4,099

Tableau 21: Présentation des résultats préliminaires des tests d'enrichissement pour les gènes significativement enrichis en variants rares (p -valeurs < 0.05)

%= pourcentage de cas ou contrôle présentant au moins un variant rare dans le gène.

Gènes	Cas PVM	Contrôles (UK10K)	p-valeurs	Odds Ratios
PTPRF	5,51 % (15)	2,95 % (26)	0,05939924	1,9182
ANK2	5,88 % (16)	4,88 % (43)	0,52939592	1,2178
FLNA	2,57 % (7)	2,04 % (18)	0,6340775	1,2662
ARHGAP24	1,47 % (4)	1,59 % (14)	1	0,9244
DCHS1	4,04 % (11)	5,45 % (48)	0,43229341	0,7316
DOCK1	1,84 % (5)	2,95 % (26)	0,39573729	0,6161
APC	1,84 % (5)	5,22 % (46)	0,01722889	0,3401

Tableau 22: Présentation des résultats préliminaires des tests d'enrichissement pour les gènes identifiés à partir d'analyses familiales présentées précédemment

%= pourcentage de cas ou contrôle présentant au moins un variant rare dans le gène.

Les résultats préliminaires présentés identifient dix gènes enrichis en variants rares dans la série de patients atteints comparés aux contrôles (Tableau 21). Ces gènes sont impliqués dans le développement cardiaque (*GATA4*, 5, 6, *NKX2-6*), dans les voies de signalisation Wnt/ β -caténines (*USP9X*, *GLIS1*) ou des Bmps (*BMP1*) impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse et dans la réponse au stress mécanique (*KLF2*, *FLNC*).

Les calculs réalisés pour les gènes identifiés précédemment par les approches familiales, ne permettent pas d'identifier d'enrichissement pour ces gènes.

Conclusion projet#3

- **Identification de nouveaux patients présentant des mutations dans les gènes issus des analyses familiales des formes non syndromiques de PVM**

L'approche de re-séquençage nous a permis d'identifier de nouveaux patients présentant des variants rares dans les gènes issus des analyses familiales de PVM non-syndromique et permet de prioriser le recrutement familial autour des cas index.

Cinquante des 51 patients chez qui sont retrouvés ces variations génétiques ne présentent pas de variants rares dans les gènes de formes syndromiques de PVM (*FBNI*, *TGFBR1*, 2, *SMAD4*). Seul un patient (CD11172) présente un variant *DOCK1* ainsi qu'un variant *FBNI*. Les deux variants identifiés ne co-ségrègent pas au sein de la famille présentée sur la *Figure 53*.

Cette étude nous permet de confirmer que le PVM, dans ces formes isolées, n'est pas dû à un gène majeur. En considérant l'hypothèse de l'implication de chacun des variants identifiés, les variants dans les gènes identifiés ne permettent d'expliquer que de faibles proportions (de 1 à 5%) des formes isolées de PVM (*Figure 57*).

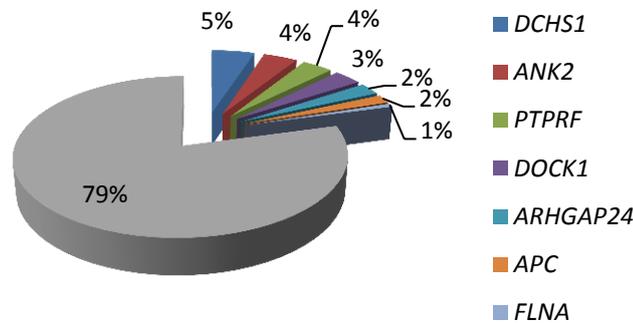


Figure 57: Diagramme du nombre de patients identifiés avec des variants rares fonctionnels dans les gènes candidats issus des analyses familiales.

Dans la série de patients étudiée 77 présentent des formes de PVM de type FED (soit 28%). Parmi les sept individus présentant des variants rares dans *ARHGAP24* six présentent des formes de PVM de type FED ce qui représente 7,8% des patients atteints de FED au sein de la série de patients étudiée.

L'identification de variants dans les gènes ciblés préalablement par les analyses génétiques familiales va permettre potentiellement d'identifier de nouvelles familles.

- **Test d'enrichissement en variants rares**

Les analyses réalisées pour les gènes identifiés précédemment par les approches familiales, ne permettent pas d'identifier d'enrichissement significatif pour ces gènes et renforce l'observation précédente de l'absence de gènes majeurs pour le PVM.

Cependant les résultats préliminaires des tests d'enrichissement en variants rares ont permis d'identifier des gènes impliqués dans le développement cardiaque (*GATA4*, 5, 6, *NKX2-6*) dans les voies de signalisation Wnt/ β -caténines (*USP9X*, *GLIS1*) ou des Bmps (*BMP1*) impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse et dans la réponse au stress mécanique (*KLF2*, *FLNC*).

Plusieurs limites peuvent être énoncées concernant ces approches d'enrichissement en variants rares.

Dans un premier temps les cas PVM ont suivi des étapes de capture utilisant la technologie HaloPlex alors que les contrôles UK10K ont suivi des étapes de capture d'exome. Ainsi, les méthodes de capture utilisées peuvent présenter des efficacités variables en fonction des régions.

De plus, les enrichissements sont calculés en comparant des patients du grand ouest avec des individus contrôles du Royaume Uni et des enrichissements inter-populations peuvent aussi exister et biaiser l'analyse. Afin de s'affranchir des variabilités génétiques inter-populations nous réalisons actuellement les tests d'enrichissements à partir des données du projet FrEX (« The French Exome Project » porté par Emmanuelle Genin (UMR 1078, Brest)). Ce projet a permis le séquençage d'exome de 600 individus contrôles dont 100 de la population du Grand Ouest recruté dans le cadre d'un projet porté par l'institut du thorax. A partir de ces données, nous pourrions focaliser notre analyse sur les gènes couverts de façon comparable par les deux techniques et comparer notre série de patients à des individus contrôles d'origine française.

Ensuite, il serait intéressant de calculer l'enrichissement éventuel en variants rares en sous-groupes, dans une série de patients atteints d'un PVM de type FED ou Barlow vis-à-vis de contrôles afin d'identifier si certains gènes sont spécifiques du PVM de type Barlow ou FED.

Enfin, la mise au point de tests statistiques d'enrichissements de variants retrouvés dans des domaines protéiques spécifiques est aussi en cours au laboratoire. Comme vu précédemment nous identifions une région préférentielle d'apparition de variants rares dans une région centrale du gène *ANK2*. En effet, il est envisageable que des enrichissements en variants rares dans une série de patients PVM par rapport à une série d'individus contrôles dans un gène dans sa globalité ne soit pas identifié mais qu'un enrichissement spécifique à un domaine précis de la protéine soit retrouvé, ciblant potentiellement des domaines fonctionnels impliqués dans la régulation de processus biologiques impliqués dans la pathogénèse du PVM.

Cette approche a été utilisée dans l'étude de clusters de mutations pour des gènes liés et associés aux désordres autistiques (Ionita-Laza, Makarov, and Buxbaum 2012). Il pourrait aussi être envisageable d'intégrer les scores de conservation afin de calculer un enrichissement en variant rares potentiellement plus délétères.

III - PERSPECTIVES

Longtemps considérées comme des pathologies acquises, l'identification de formes familiales de pathologies dystrophiques valvulaires a permis de suspecter une **origine génétique** de ces pathologies.

L'étude génétique des cardiopathies valvulaires a débuté par l'identification de déterminants génétiques dans le cadre de pathologies syndromiques monogéniques du tissu conjonctif. À partir de la compréhension des mécanismes impliqués dans ces formes syndromiques et de l'identification de formes familiales non syndromiques de dystrophies valvulaires mitrales, les chercheurs ont fait l'hypothèse de l'existence de déterminants génétiques dans les gènes impliqués dans la composition et la régulation du tissu conjonctif.

Des **études pangénomiques de liaison** ont ainsi identifié des *loci* impliqués dans la survenue de la pathologie. Grâce aux développements technologiques récents et aux progrès des connaissances, permis par l'aboutissement de projets génétiques internationaux, des **gènes responsables de dystrophies valvulaires mitrales non-syndromiques** ont pu être identifiés (Kyndt et al. 2007; Durst et al. 2015). La découverte de ces gènes a permis d'identifier de **nouveaux mécanismes** impliqués dans la pathogénèse du PVM et permet l'investigation de **nouvelles hypothèses de régulations physiopathologiques** sans implication directe du tissu conjonctif. Cependant, les gènes identifiés ne permettent d'expliquer qu'une **faible proportion** des cas familiaux de PVM.

Dans ce travail nous avons identifié de **nouveaux déterminants génétiques responsables de PVM au sein de familles** avec des **expressivités phénotypiques différentes** et des **pénétrances variables en fonction de l'âge** des individus.

Les mécanismes physiopathologiques associés aux mutations identifiées restent à être démontrés, cependant les gènes identifiés sont impliqués dans deux voies de signalisation principales de **mécano-transduction** et de **transition épithélio-mésenchymateuse** qui semblent être des régulateurs clés de la physiopathologie du PVM. Ces découvertes sont en accord avec l'hypothèse: « **the final common pathway** » proposée par Jeffrey Towbin. Il suggère que les concordances et l'hétérogénéité phénotypiques des pathologies cardiaques héréditaires sont dues à l'existence de mutations dans des gènes codants pour des protéines impliquées dans une **même voie de signalisation** (Towbin 1999).

L'identification de ces gènes peut être potentiellement utile au **diagnostic moléculaire** des affections valvulaires mitrales dans un cadre familial en considérant un **modèle de**

transmission monogénique. L'étude des formes familiales de PVM démontre, pour certaines familles, les limites de ces modèles monogéniques. En effet, l'étude de pathologies fréquentes au sein de familles se confronte à des « entrées multiples » de la pathologie, induisant ainsi l'apparition de **modèles digéniques**, voire de multigéniques.

De plus les études phénotypiques permettent d'identifier un large spectre d'affections valvulaires entre individus d'une même famille. Ces **hétérogénéités phénotypiques et génétiques** compliquent l'analyse des relations génotype-phénotype familiales.

Enfin, des travaux récents démontrent l'existence de **facteurs génétiques modulateurs** et suggèrent des modèles génétiques plus complexes impliqués dans le développement du PVM (Dina et al. 2015). Ces modulateurs influent de manière modérée sur le risque individuel, cependant, **l'addition de déterminants** génétiques fréquents et/ou rares pourrait être à l'origine du développement de la pathologie.

Le PVM est en majorité une pathologie asymptomatique et une absence de traitements peut provoquer l'apparition d'insuffisances cardiaques, de troubles du rythme et dans certains cas des morts subites. Dans ce cadre, les approches génétiques du PVM devront dans l'avenir permettre une **stratification** et le développement de **valeurs prédictives du risque par des méthodes diagnostiques cliniques et moléculaires** afin de proposer une **prise en charge adaptée et personnalisée.**

Cette prise en charge personnalisée nécessitera le développement de **thérapeutiques individualisées** en fonction des caractéristiques génétiques et phénotypiques des patients (pharmacogénomique). Le développement de tels outils thérapeutiques semble cependant limité par l'implication forte de facteurs environnementaux et par les fonctions pléiotropes des gènes identifiés.

IV - MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV.1 Investigations cliniques

L'examen clinique des patients, comprend un interrogatoire concernant les antécédents médicaux et un examen physique, en recherchant en particulier des anomalies cardiovasculaires et des anomalies du tissu conjonctif (cutanées, oculaires ou squelettiques) qui pourraient évoquer une maladie du tissu conjonctif.

Le diagnostic phénotypique cardiaque des membres des familles étudiées est basé sur un examen échocardiographique avec analyse Doppler avec un échographe (Vivid, GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) et le logiciel de mesures Echo PAC (GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA). Toutes les mesures ont été réalisées dans l'incidence parasternale grand axe et sur la moyenne de trois battements cardiaques. Les mesures des valvules antérieures et postérieures ont été réalisées sur images arrêtées en milieu de diastole ventriculaire gauche, leur épaisseur en fin de diastole et le déplacement des feuillets mitraux dans l'oreillette gauche, lors de la systole ventriculaire gauche. Le déplacement des feuillets, est évalué par rapport à la ligne joignant les points d'ancrage des deux feuillets valvulaires à l'anneau mitral, on parle du plan de l'anneau mitral.

IV.2 Investigations génétiques

IV.2.1 Bio-collections

Les ADNs utilisés font partie de bio-collections gérées par l'équipe Bio-collection de l'institut du thorax et par le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nantes. Plus de 2000 échantillons de patients atteints de PVM sont extraits, tracés et conservés. Les **prélèvements, sanguins ou salivaires**, ont été réalisés chez les patients ayant signé **un consentement éclairé** et validé par un comité d'éthique.

IV.2.2 Séquençage NGS et méthodes d'analyses

Le séquençage nouvelle génération (NGS) nécessite deux étapes distinctes. Dans un premier temps, le **séquençage d'exome complet** et le **séquençage d'un set spécifique de gènes** cibles **nécessite la préparation des librairies** spécifiques de la méthode de séquençage Illumina. Dans un second temps les librairies subissent des étapes successives de **séquençage haut débit**.

IV.2.2.1 Préparation de la librairie

Séquençage d'exome complet

Pour la capture des parties codantes du génome, nous avons utilisé le kit SureSelect Human All Exon commercialisé par Agilent Technologies. Au cours de cette thèse, plusieurs versions de ce kit ont été utilisées. Il permet de capturer **45 Mb** de séquences génomiques comprenant **21 522 gènes**.

Pour cette technique **3 µg d'ADN** sont nécessaires par échantillon. La fragmentation de l'ADN génomique est réalisée par **sonication** (Bioruptor- Diagenode, Denville, NJ, USA) afin d'obtenir des fragments compris entre **150 et 200 paires de bases**. L'efficacité de la sonication est vérifiée par migration électrophorétique (TapeStation 2200, Agilent).

Une fois fragmenté, l'ADN subit une première étape de **purification** sur billes magnétiques SPRI (Solide Phase Reversible Immobilisation). Ces fragments purifiés correspondent à la **librairie** de départ.

Les fragments d'ADN subissent ensuite plusieurs étapes successives qui permettent : - de **réparer les extrémités** des fragments, -de **phosphoryler les extrémités 5'**, -d'ajouter un **nucléotide A en 3'** de chaque brin et d'ajouter les **adaptateurs Illumina P5 P7** à chaque

extrémité des fragments. Chaque étape est suivie d'une phase de purification. La **librairie est ensuite amplifiée et quantifiée** à l'aide de la TapeStation 2200 Agilent. Les fragments obtenus doivent alors avoir une **taille entre 225 et 275 pb** (Figure 58).

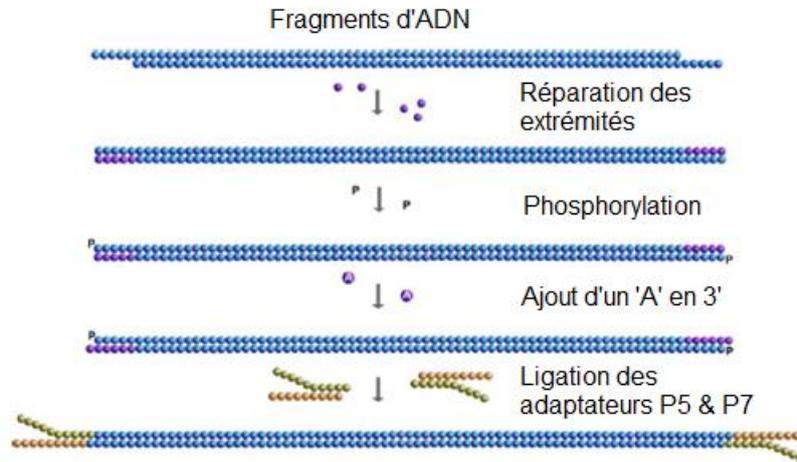


Figure 58: Schéma de la préparation de la librairie pour un séquençage d'exome

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

Les préparations d'ADNs sont ensuite lyophilisées puis re-suspendues dans de l'eau ultra pure afin d'obtenir 3.4 μL d'ADN à 221 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Les régions codantes vont alors être **capturées** (à 65°C pendant 24h) à l'aide de sondes **d'ARN biotinylées complémentaires des régions codantes** de l'ADN (SureSelect Human All Exon V5 Agilent). La **capture** est ensuite réalisée grâce à des billes magnétiques couplées à de la **streptavidine**. Une série de 3 lavages est ensuite réalisée puis les billes resuspendues dans 30 μL d'eau ultra pure.

Les étapes d'amplification suivantes vont permettre l'ajout des index. Ces index correspondent à des séquences nucléotidiques spécifiques de chaque échantillon afin de pouvoir multiplexer plusieurs échantillons pour le séquençage. A la fin du séquençage, chaque « read » sera attribué à l'échantillon correspondant.

Enfin, après une dernière purification, les librairies sont contrôlées par TapeStation 2200 (Agilent) pour vérifier que la **taille des fragments de la librairie** est comprise entre **300 et 400** paires de bases. La librairie est quantifiée par PCR quantitative à l'aide du LightCycler 480 (F. Hoffmann-La Roche, Bâle, Suisse).

Cette dernière étape de quantification est cruciale pour injecter, lors de l'étape de séquençage, une quantité équivalente de chaque échantillon et assurer l'obtention homogène des données de séquençage générées pour les différents échantillons.

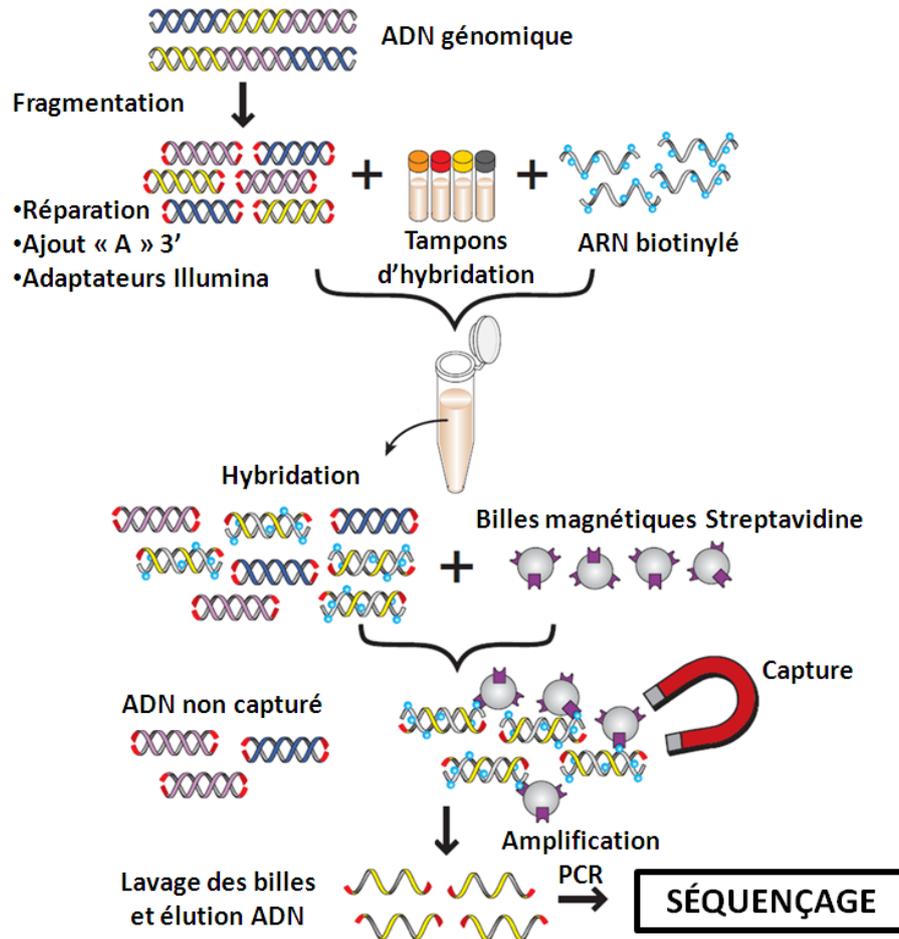


Figure 59: Représentation du principe de capture des régions codantes avant séquençage haut-débit.

Les sondes d'ARN biotinyllées permettent de capturer les fragments qui contiennent des séquences d'intérêt, ici les séquences codantes du génome. L'utilisation de billes magnétiques couplées à la streptavidine permet ensuite d'isoler les fragments d'intérêt. Des séries de lavages et une PCR finale permettent d'obtenir une librairie prête à être séquencée.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Agilent
(<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=3083>)

Préparation de la librairie pour du séquençage ciblé

Nous avons conçu un kit à façon de capture spécifique des régions codantes d'un set de 78 gènes candidats. Le design a été réalisé avec l'outil en ligne Suredesign d'Agilent

(<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/index.htm>). Le kit permet de séquencer en parallèle 78 gènes candidats.

Cette méthode permet de générer des fragments d'ADN génomique de taille connue, de capturer les régions d'intérêt et l'amplification de ces fragments par PCR va produire des amplicons des fragments d'intérêts qui seront par la suite séquencés.

Lors de la préparation des bibliothèques, les échantillons d'ADN génomique sont tout d'abord digérés par 8 cocktails différents d'enzymes de restriction pendant 30 minutes à 37°C. Une étape de vérification utilisant la TapeStation 2200 d'Agilent permet de vérifier sur un ADN contrôle l'efficacité des digestions enzymatiques.

Des sondes biotinylées complémentaires des régions d'intérêt du design sont ensuite utilisées. Ces sondes sont en réalité composées de deux extrémités complémentaires des extrémités des fragments digérés et comportent des séquences d'index spécifiques de chaque échantillon et ainsi permettent le séquençage de plusieurs échantillons en parallèle (multiplexage). Ainsi, la capture des séquences d'intérêt (3h à 54°C) induit la formation de molécules d'ADN circulaires (Figure 60).

L'ADN biotinylé est ensuite capturé et purifié par une série de lavages grâce à des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Ensuite, une étape de 10 minutes à 55°C permet la ligation des fragments et leur circularisation. Les fragments d'ADN circulaires, sont ensuite amplifiés par PCR afin de linéariser les fragments et d'ajouter les adaptateurs de séquençage (P5 P7). Ces derniers sont ensuite purifiés en utilisant des billes magnétiques SPRI (Solide Phase Reversible Immobilisation). Enfin, les bibliothèques sont purifiées, contrôlées par TapeStation 2200 (Agilent) pour vérifier que la taille des fragments, de la bibliothèque, sont bien compris entre 175 et 625 paires de bases. Enfin, les bibliothèques sont quantifiées par PCR quantitative à l'aide du LightCycler 480 (F. Hoffmann-La Roche, Bâle, Suisse). De la même manière, cette dernière étape est cruciale pour uniformiser la quantité d'ADN pour chaque échantillon.

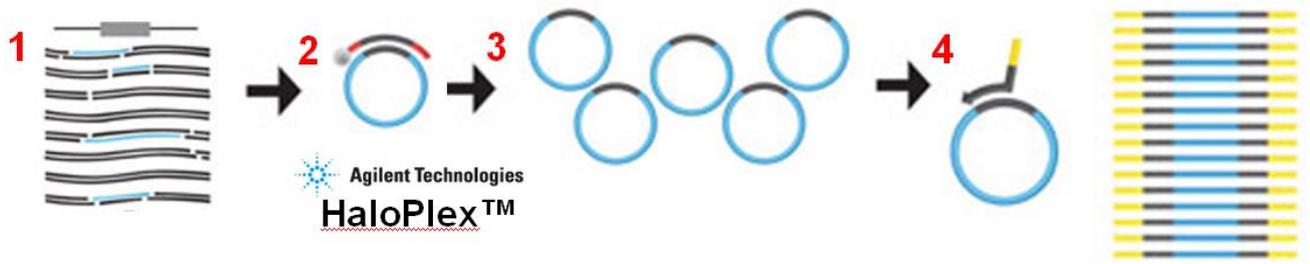


Figure 60: Représentation des étapes du système de capture et d'enrichissement HaloPlex
(Agilent technologies Santa Clara, CA)

Dans un premier temps, l'ADN est digéré par 8 cocktails d'enzymes de restriction, les fragments obtenus sont ensuite hybridés avec des sondes biotinylées spécifiques des extrémités des régions digérées. Ces sondes comprennent les index. Les complexes sondes/fragments d'ADN biotinylés sont ensuite capturés grâce à des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Enfin les complexes circulaires sont purifiés et amplifiés par PCR.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Agilent

(<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=308> / <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=3083>)

IV.2.2.2 Séquençage haut-débit – Illumina HiSeq 2500

Une fois les bibliothèques générées (pour le séquençage d'exome ou la capture de régions cibles) le séquençage est effectué sur la plateforme de séquençage HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, USA) disponible à la plateforme de séquençage de Nantes (Figure 61.B). Les bibliothèques produites sont injectées dans une « flow-cell », lame de verre sur laquelle va se dérouler le séquençage (Figure 61.A).

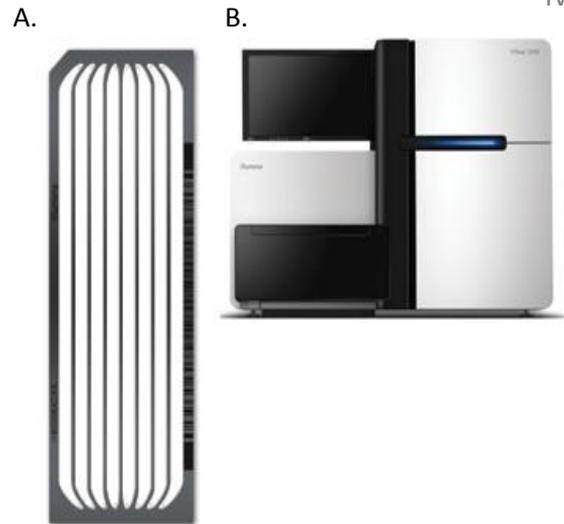


Figure 61: Matériel utilisé pour le séquençage haut-débit

La flow-cell (A) est composée de huit canaux dans lesquelles vont se dérouler les étapes d'amplification par ponts ainsi que les étapes de séquençage. Le séquenceur haut débit HiSeq 2500 (B) est commercialisé par Illumina (San Diego, California, USA)

<http://www.bioopticsworld.com/articles/print/volume-5/issue-06/features/dna-sequencing-technologies-the-next-generation-and-beyond.html>

La « flow-cell » est tout d'abord introduite dans une « cBot ». Cette étape permet l'amplification par ponts de 35 cycles. Cette amplification a lieu suite à une hybridation et permet la formation de « clusters » (groupes d'un seul et même fragment). Un cluster correspond à environ 1000 amplicons identiques regroupés. Cette multiplication clonale permet d'amplifier le signal qui sera nécessaire à sa détection. Lors de l'amplification par ponts, environ 800 000 clusters sont générés par mm² au sein de la « flow cell ».

Génération des « clusters »

L'injection des bibliothèques dans la « flow-cell » est réalisée en suivant un flux régulier qui permet une répartition homogène des fragments. La flow-cell est recouverte de sondes complémentaires des adaptateurs P5 P7 des bibliothèques. Une première étape d'amplification et de lavage permet d'obtenir des brins hybridés et répartis de manière homogène sur toute la flow-cell (Figure 62.A).

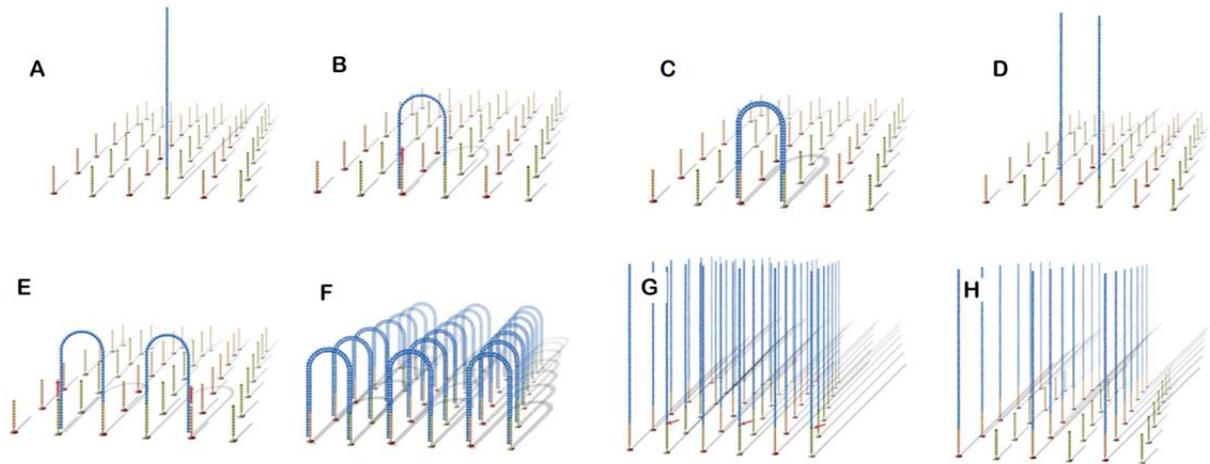


Figure 62: Génération des clusters lors du séquençage Illumina

La première étape permet la fixation des fragments de la librairie sur la « flow-cell » (A) Lors du premier cycle d'amplification, les sondes complémentaires des fragments P5 et P7, vont permettre la formation d'un pont. (B) Ainsi, un brin complémentaire est synthétisé (C). La fin du cycle permet de séparer les deux brins (sens et anti-sens) (D) Les étapes précédentes sont répétées 35 fois jusqu'à la formation de clusters d'environ 1000 brins identiques (E, F, G). Enfin, les fragments anti-sens sont clivés pour ne conserver que les brins sens pour le séquençage.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

Suite à la fixation des fragments de la librairie sur la flow-cell, les brins vont se courber et par complémentarité de leur extrémité libre avec les sondes fixées sur la flow-cell, elles forment un pont (Figure 62 B). Une étape d'amplification permet la génération d'un brin complémentaire à partir du brin original. Les deux brins sont ensuite séparés et ces étapes d'amplification par ponts se répètent 35 fois jusqu'à la formation complète d'un cluster d'environ 1000 copies des brins initiaux. La dernière étape consiste à ne garder que les brins sens et à cliver les brins anti-sens.

Séquençage haut débit

Le séquençage débute suite au retrait de la flow-cell de la cBot et à son insertion dans l'HiSeq2500. Chaque cycle de séquençage correspond à l'ajout d'un nucléotide. Pour cela, les quatre nucléotides bloquant couplés à des fluorochromes, sont injectés simultanément dans la flow-cell. A chaque cycle, chaque fragment va incorporer un nucléotide puis une étape de lavage permet d'éliminer l'excédent de nucléotides non incorporés (Figure 63). Plusieurs images de la flowcell sont prises à chaque fin de cycle et permettent la lecture de la base

incorporée pour chaque cluster. Une fois la lecture achevée, les fluorochromes sont clivés et vont permettre l'incorporation du nucléotide suivant. La succession de cent cycles, va ainsi avoir lieu et la séquence des clusters va être obtenue par l'acquisition d'images successives.

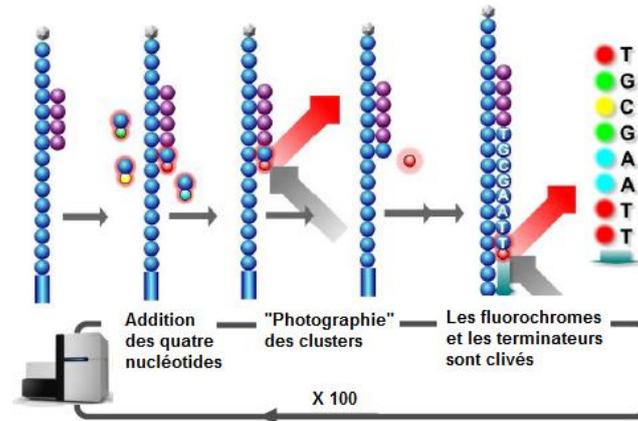


Figure 63: Réaction de séquençage de la technologie Illumina.

Lors d'un cycle, l'ADN polymérase incorpore un nucléotide marqué par un fluorochrome bloquant. La fluorescence est ensuite détectée puis le fluorochrome est clivé permettant ainsi la fixation du nucléotide suivant. Cent cycles sont ainsi effectués pour obtenir la lecture des séquences des fragments de 100 bases.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

Les séquences ont été réalisées en « paired-end ». Cela signifie que les fragments d'ADN constituant la librairie sont séquencés dans un sens lors des 100 premiers cycles puis dans l'autre sens. Ce changement nécessite une nouvelle étape d'amplification par ponts, ce qui permet de produire pour chaque brin sens, un brin anti-sens complémentaire (Figure 64). Les brins sens sont ensuite clivés. Cette étape, dite de « flip-flap », a pour conséquence d'inverser les brins. Ainsi, le séquençage de 100 nouveaux cycles reprend comme décrit précédemment. Cela permet, pour un fragment de 300 pb de séquencer 100 pb en 3' puis 100 pb en 5'.

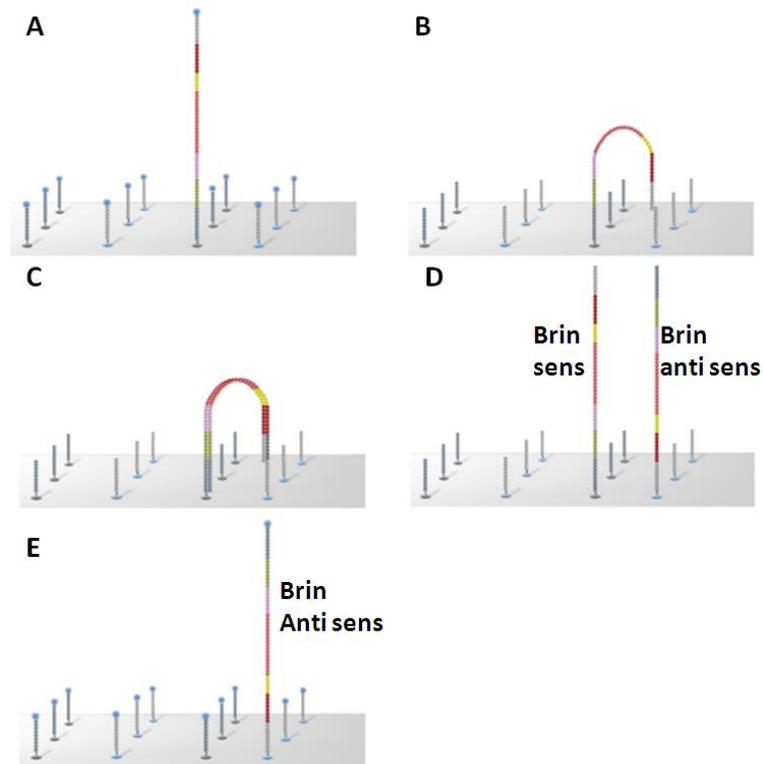


Figure 64: Étape de « flip-flap » qui permet le séquençage des brins anti-sens par la technologie Illumina.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

Chaque fichier image généré lors du séquençage va être converti à chaque cycle en fichier BCL permettant d'identifier la base ajoutée au niveau de chaque cluster en y associant un score de qualité. Par la suite, ces fichiers vont être convertis en fichiers FASTQ grâce au logiciel CASAVA (logiciel du fournisseur Illumina). Ces fichiers FASTQ comportent les séquences de tous les reads séquençés et un score qualité associé à chaque base.

Chaque séquence obtenue (« read ») est ensuite alignée sur le génome de référence humain hg19/GRCh37. Cet alignement est facilité par le fait que les reads soient couplés deux à deux grâce à la méthode de séquençage en « *paired-end* ».

IV.2.2.3 Alignement et annotations des séquences

Alignement

L'outil BWA-MEM permet d'aligner chaque read sur le génome humain de référence (hg19/HGRC37) et va générer des fichiers SAM qui colligent de nombreuses informations relatives à tous les reads appariés (identifiant, séquence, scores de qualité, position sur le

génomique etc.). Ces fichiers SAM sont volumineux et vont donc être compressés en fichier BAM (fichiers binaires).

Les reads sont ensuite triés et hiérarchisés sur le génome. Les reads issus d'un même fragment d'ADN sont ensuite annotés avec Picard / MarkDuplicates.

Dans le cas du séquençage de régions génomiques cibles par la technologie HaloPlex, décrite précédemment, la fragmentation de l'ADN par les enzymes de restriction n'est pas aléatoire. L'outil Picard/Mark Duplicates est donc désactivé lors de l'analyse de ces données.

Les reads sont ensuite réalignés autour des insertions / délétions spécifiquement dans les régions d'intérêt. Une re-calibration des reads BAM est ensuite effectuée grâce à GATK. Cela permet d'affiner les scores qualité.

Détection de variants (« calling »)

La détection des variants a été réalisée grâce à deux algorithmes : **GATK Unified Genotyper (version 2.8)** (McKenna et al. 2010) et **Samtools mpileup (Version 0.1.19)** (Li et al. 2009). Le calling permet la genèse de fichiers VCF (« Variant Call Format ») (Danecek et al. 2011). Les fichiers VCF sont des fichiers tabulaires listant l'ensemble des variations détectées par rapport à la séquence de référence du génome humain pour chaque patient séquençé et pour chaque algorithme. Chaque ligne correspond à un variant et chaque variant est annoté avec de nombreuses informations relatives à ce variant. On retrouve, la position génomique du variant, son identifiant « rs » (si ce variant est référencé dans la base de données dbSNP (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)), l'allèle de référence, l'allèle alternatif observé, la qualité de « calling » attribuée à ce variant, l'état du variant (hétéro-homozygote) et une grande quantité d'informations relatives à celui-ci (score de conservation, fréquence allélique etc.) regroupées dans une même colonne.

Annotation des variants

Les variants sont ensuite annotés en utilisant l'algorithme VEP (« Variant Effect Predictor »). Cette annotation, basée sur la base de données Ensembl (Cunningham et al. 2015), permet de connaître l'effet prédit du variant nucléotidique sur l'ensemble des transcrits référencés.

L'utilisation de bases de données publiques contenant des données de séquençage de nombreux individus contrôles et patients atteints de pathologies diverses de différentes populations, va permettre d'estimer la fréquence des variants recherchés.

Les bases de données utilisées sont :

- la base de données 1000 Genomes (phase 1) (379 individus d'origine européenne)
- la base «Exome Variant Server » (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) - 4300 individus d'origine européenne)
- la base de données « [Exome Aggregation Consortium](#) » (36 923 individus européens non finlandais)

De plus un score de conservation inter-espèces est attribué à chaque variant nucléotidique. Le score de conservation que nous avons utilisé est le score GERP (« Genomic Evolutionary Rate Profiling ») compris entre -12.3 et 6.17 à partir de comparaisons basées sur les génomes de 29 espèces de mammifères (Davydov et al. 2010) (Pollard et al. 2010).

IV.2.2.4 Filtrage des variants identifiés à partir de l'outil Knime4Bio

Suite aux étapes successives de séquençage, traitement des données de séquençage, alignement et annotation, l'analyse génétique des fichiers VCFs est réalisée grâce à l'outil Knime4bio développé au laboratoire (Lindenbaum et al. 2011). Cet outil permet de contourner la difficulté du code informatique (Lindenbaum et al. 2011) (Lindenbaum et al. 2011) (Lindenbaum et al. 2011) pour analyser ces fichiers contenant de nombreuses informations ne pouvant être gérées par des tableurs classiques.

L'ajout de commandes est visualisé à l'aide d'une interface et permet d'appliquer successivement des actions de formatage et de filtrage présentées dans la Figure 65. L'enchaînement de commandes est appelé « workflow ».

Filtre des variants fonctionnels

Dans un premier temps, les VCF générés par Samtools et GATK sont traités et introduits dans le workflow séparément. L'étape suivante consiste à **conserver les variants ayant un effet fonctionnel** potentiel sur la fonction de la protéine sur les bases des transcrits ENSEMBL et des annotations VEP (Variant Effect Predictor) (McLaren et al. 2010) (Figure 65-1.). Nous gardons ainsi les variants ayant des annotations **non-synonymes et/ou impliquées dans les sites d'épissage** des catégories suivantes (<http://www.sequenceontology.org/>) : splice_donor_variant (SO:0001575), splice_acceptor_variant (SO:0001574), stop_gained (SO:0001587), frameshift_variant (SO:0001589), stop_lost (SO:0001578), initiator_codon_variant (SO:0001582),

inframe_insertion (SO:0001821), inframe_deletion (SO:0001822), missense_variant (SO:0001583), transcript_amplification (SO:0001889), splice_region_variant (SO:0001630), transcript_ablation (SO:0001893), incomplete_terminal_codon_variant (SO:0001626) , coding_sequence_variant (SO:0001580).

Conservation des variants rares

Les variants sont considérés **rare**s de manière empirique si la fréquence de l'allèle mineur (MAF) est inférieure à 1%. Ainsi, nous utilisons successivement les **bases de données externes**: -1000 génomes phase 1 (379 individus européens (<http://www.1000genomes.org/>) – Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) (version ESP95000SI-V2) (4300 exomes d'individus d'origine européenne) (Figure 65-2).

Ensuite nous utilisons un set de 387 exomes issu du projet UK10K (<http://www.uk10k.org/>), un set de 69 génomes de la base de données Complete Genomics (<http://www.completegenomics.com/>) puis la base de données Genome of Netherlands (<http://www.nlgenome.nl/>) (499 génomes d'individus d'origine hollandaise) (Figure 65-3). Le seuil de fréquence choisi pour ces bases est de 5% car elles contiennent des individus apparentés.

Nous utilisons par la suite des bases de données «internes». Le but est de filtrer nos variants en excluant les erreurs de séquençage fréquentes (faux positifs récurrents). Ainsi cette base de données contient 100 exomes de patients nantais séquencés sur la plateforme de séquençage de Barcelone (Centre for Genomic Regulation) et 160 exomes de patients séquencés sur la plateforme génomique de Nantes (<http://www.pf-genomique.univ-nantes.fr/>) (Figure 65-4). Le seuil de fréquence choisi pour ces deux bases est de 20% car elles contiennent des individus apparentés ainsi que des individus atteints de pathologies cardiaques diverses.

Enfin nous utilisons la base de données de l'Exome Aggregation Consortium (ExAC) du Broad institute (<http://exac.broadinstitute.org>) qui constitue actuellement la plus grande base de données publique. Cette méta-base regroupe les données de 17 bases de données réanalysées. Ainsi, elle contient les données de séquençage d'exome de 60 706 individus non apparentés de différentes origines. Nous utilisons des seuils de 1% à 0,1% dans la sous-population européenne non finlandaise (33 300 individus) (Figure 65-5).

Variants identifiés par deux algorithmes chez les patients atteints de la famille

Afin de limiter le nombre de faux positifs, la dernière étape, consiste à ne conserver que les variants qui sont retrouvés par **GATK et Samtools** exclusivement.

Enfin, dans le cas **d'analyses familiales**, nous focalisons notre analyse sur les **variants partagés par les individus atteints** séquencés (Figure 65-6).

Filtrage des données de séquençage ciblé

Le filtrage des données de séquençage ciblé suit exactement les mêmes étapes d'analyse, à l'exception de la dernière étape car les patients séquencés ne sont pas apparentés.

Légende :

- 1 -Chargement et lecture des fichiers VCF
- extraction des informations de fréquence et de conservation des variants
-Conservation des variants fonctionnels et impliqués dans les sites d'épissage* (décrits par Variant effect predictor)
- 2 –Conservation des variants ayant des fréquences de l'allèle mineure (MAF) inférieure à 1% dans les bases de données européennes 1000 génomes et Exome Variant Server.
- 3-Conservation des variants ayant des MAF inférieures à 5% dans les bases de données UK10K, GoNL et Complete Genomics.
- 4-Conservation des variants ayant des MAF inférieures à 20% dans les bases de données internes (Plateforme du CRG de Barcelone et Plateforme de séquençage de Nantes)
- 5-Conservation des variants ayant des MAF inférieures à 0.1% dans la base de données de « Exome aggregation consortium » (européens non-finlandais)
- 6-Conservation des variants retrouvés par les deux algorithmes de « calling » (gatk et samtools) et retrouvés chez les X patients atteints séquencés de la famille.

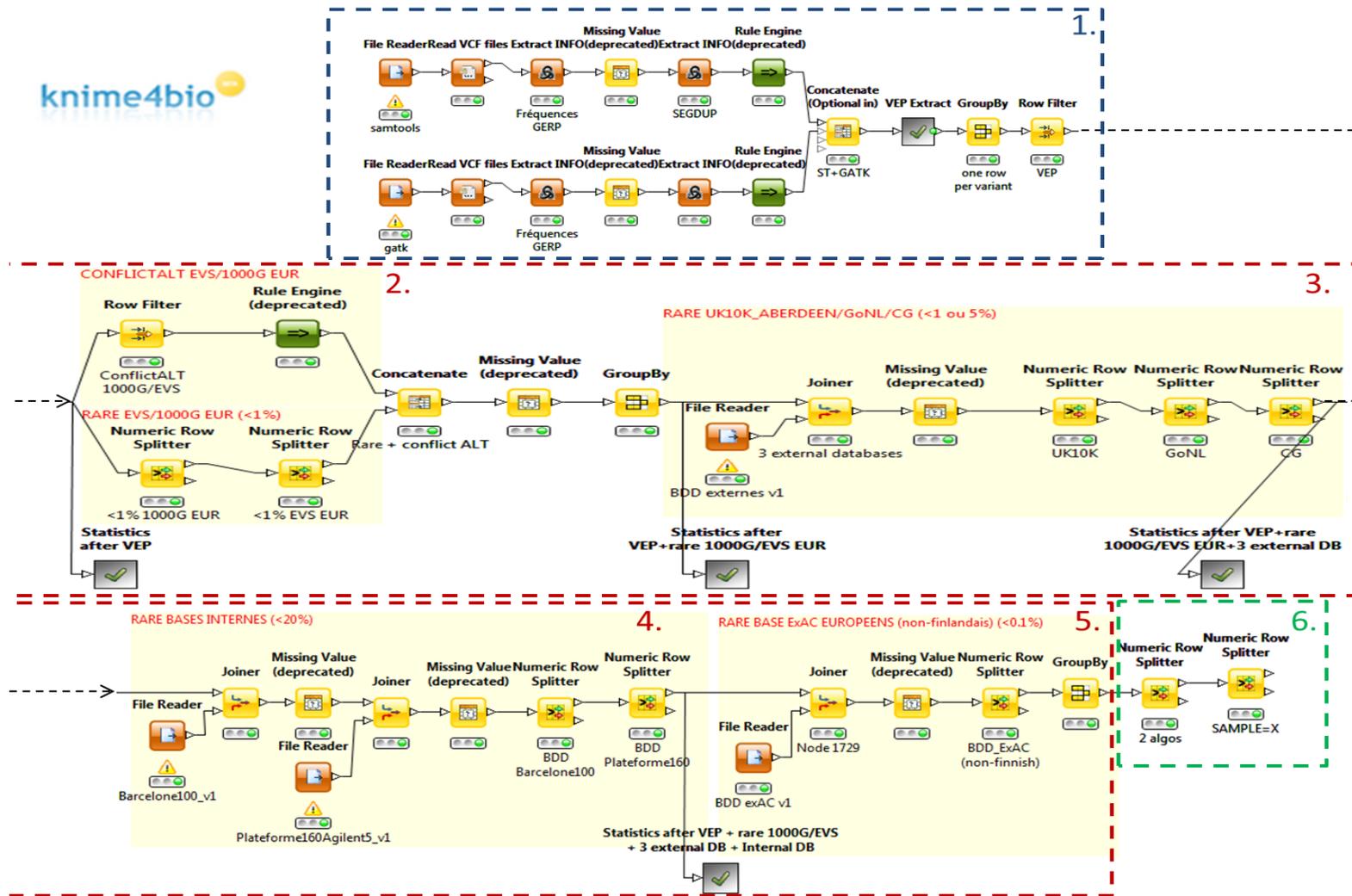


Figure 65: Visualisation du « workflow » d'analyse réalisé avec l'outil Knime4bio afin de filtrer les fichiers VCF

Les bases de données mentionnées dans la légende sont détaillées dans le chapitre IV.1.2.4 (Filtrage des variants identifiés)

Contrôle *in silico* par visualisation des alignements avec l'outil IGV

Suite aux analyses des données NGS les variants d'intérêts identifiés ont été vérifiés par alignements des reads grâce à l'outil IGV « Integrative Genome Viewer » (Thorvaldsdóttir, Robinson, and Mesirov 2013). Cette étape constitue une vérification visuelle de la qualité et de l'alignement des reads à partir des fichiers BAM, avant le séquençage capillaire qui validera définitivement la présence du variant.

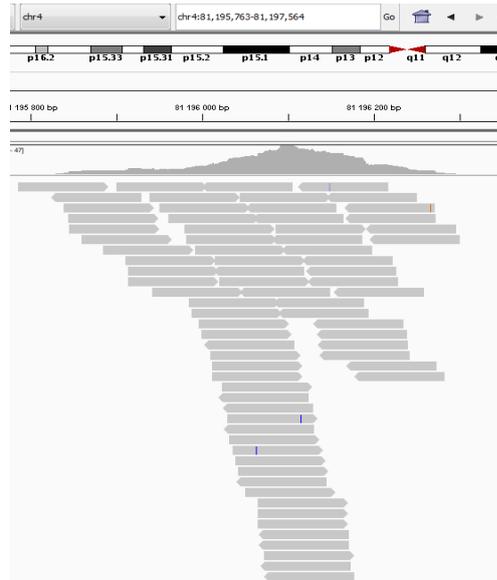


Figure 66: Exemple de visualisation de l'alignement des reads de séquençage haut-débit grâce à l'outil IGV.

IV.2.3 Séquençage capillaire

La validation des variants et les analyses de co-ségrégation ont été réalisées par séquençage capillaire (méthode de Sanger). Le choix des amorces de PCR et de séquençage a été réalisé grâce au logiciel Primer3web version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) en se basant sur les séquences génomiques obtenues sur l'outil « Genome Browser » Université de Californie, Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>). Le séquençage a été réalisé en utilisant le kit Big Dye Terminator v3.1, puis une migration électrophorétique sur séquenceur automatique 3730 DNA Analyzer 48-capillaires (Life technologies). Les séquences ont été analysées avec le logiciel SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) par une inspection visuelle.

IV.2.4 Génotypage Haut Débit

Le génotypage haut débit a été effectué sur les puces Axiom Genome-Wide CEU 1 commercialisées par Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) par la plateforme de génomique de Nantes (<http://www.pf-genomique.univ-nantes.fr/>) ou sur puces 250K par Affymetrix (Santa

Clara, CA, USA) en suivant les recommandations du fournisseur (<http://www.affymetrix.com/support/technical/>).

Les puces Axiom Genome-Wide CEU 1 permettent le génotypage de 567 097 variants fréquents (SNPs) (contre 250 000 pour les puces 250K) sur l'ensemble du génome grâce à des puces composées de 1,2 Millions de sondes.

Les signaux fluorescents ont été mesurés grâce au « Gene Titan Multi-channel » (Affymetrix) et l'analyse primaire a été réalisée à partir de l'outil « Affymetrix Power Tool » en suivant les recommandations du fournisseur.

Les échantillons ayant un pourcentage de génotypage inférieur à 97 % ont été éliminés de l'analyse ainsi que ceux présentant un taux d'hétérozygotie anormalement différent de la valeur attendue. Les SNP présentant une fréquence de l'allèle mineur (MAF) inférieure à 10 % ont été exclus tout comme ceux ayant un taux de génotypage inférieur à 95 % ou étant en déséquilibre de Hardy-Weinberg ($P < 10^{-5}$).

IV.2.5 Identité par descendance (IBD pour Identity By Descent)

Les analyses d'identité par descendance ont pour but d'identifier des blocs haplotypiques partagés par des paires d'individus apparentés hérités d'un ancêtre commun sans événement de recombinaison. Ces analyses ont été réalisées avec l'algorithme « Identity By Descent Linkage Disequilibrium » (Han and Abney 2011) qui permet le calcul de probabilités d'identité par descendance (IBD) à partir de données de génotypage haut-débit décrites ci-dessus sans incidence de la taille ou de la complexité de la famille étudiée en tenant compte du déséquilibre de liaison. Les probabilités d'IBD sont calculées pour chaque « état d'IBD ». En effet, trois états d'IBD sont définis : -l'état IBD 0 qui correspond à l'absence de partage d'un haplotype -l'état IBD1 qui correspond au partage d'un haplotype par une paire d'individus -l'état IBD2 qui correspond au partage de deux haplotypes par une paire d'individus.

Dans le cadre de nos analyses familiales, nous recherchons des zones haplotypiques partagées entre individus d'une même famille. Ainsi, nous allons rechercher les régions génomiques ayant une très faible probabilité d'être IBD0 (ne partageant aucun haplotype) et donc une plus forte probabilité d'être IBD 1 ou 2. Chaque paire d'individus a été comparée en utilisant le seuil de probabilité IBD0 de 0.2. Ainsi, chaque marqueur génotypé (SNP), est comparé en prenant en considération le déséquilibre de liaison au sein du bloc haplotypique, et le nombre

de paires d'individus partageant ces SNPs, est attribué. Les données sont représentées sous forme de graphique représentant en abscisse la position chromosomique et en ordonnée le nombre de paires d'individus partageant ce SNPs.

Ces analyses peuvent être réalisées pour l'identification de régions partagées par les individus atteints de la famille (paires concordantes) mais aussi en comparant les individus sains et atteints d'une même famille (paires discordantes). Si une région haplotypique est partagée par toutes les paires concordantes, mais aussi par les paires discordantes, la région ne semblera pas intéressante vis-à-vis du trait phénotypique étudié (dans le cadre d'une pathologie à pénétrance complète).

L'ensemble de ces analyses a été réalisé au sein de l'équipe « Génétique des maladies héréditaires » par les biostatisticiens (Floriane Simonet et Christian Dina).

IV.2.6 Génotypage par HRM

La technologie HRM (« High Resolution Melt » Courbe de Fusion à Haute-Résolution) est une technique post-PCR qui permet l'identification de variations génétiques dans la séquence d'acides nucléiques des amplicons de PCR.

Cette technique est basée sur l'analyse des courbes de fusion (dissociation) des produits de PCR qui ont préalablement intégré des agents intercalant fluorescents. Ainsi, grâce aux machines de PCR quantitative permettant un contrôle fin de la température, il est possible de discriminer des amplicons de PCR qui diffèrent d'une seule base.

Le génotypage a été réalisé par amplification en présence de l'agent intercalant Resolight (Roche, Basel, Suisse). Après amplification, les produits de PCR sont soumis à une augmentation de température graduelle réalisée sur le « LightCycler® 480 Real-Time PCR System » (Roche, Basel, Suisse) jusqu'à complète dénaturation. L'analyse des données a été réalisée sur le logiciel LightCycler® 480 Software, Version 1.5 (Roche, Basel, Suisse).

Pour chaque manipulation un contrôle interne présentant une mutation connue a été ajouté. Enfin, trois échantillons pris de manière aléatoire dans les amplicons sans variation ont été séquencés par séquençage capillaire afin de s'assurer de la véracité des résultats.

IV.2.7 Séquençage massif d'ARN

Le séquençage d'ARN (RNA-Seq) a été réalisé à partir d'extraction d'ARN de valves de neuf patients atteints de PVM ayant bénéficié de chirurgie valvulaire et de valve d'un individu sain de 77 ans (fournisseur AMS Bio Abingdon, UK).

Les ARN des valves pathologiques ont été extraits en suivant un protocole d'extraction au TRIzol. Chaque échantillon a été contrôlé sur LabChip Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Le séquençage de ces ARN a été réalisé en collaboration avec le « Centre for Genomic Regulation » de Barcelone (<http://www.crg.eu/>).

Les données d'expression obtenues à partir du séquençage sont exprimées en FPKM (pour "Fragment per Kilobase of exon per million reads mapped") (Mortazavi et al. 2008). Ces valeurs ont été générées à partir des données d'alignement de l'algorithme Tophat et calculées par l'algorithme Cufflinks (Trapnell et al. 2012) (<http://tophat.cbcb.umd.edu/> ; <http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>). Les valeurs d'FPKM sont normalisées et sont comparables entre les échantillons.

Les données FPKM sont calculées de la manière suivante :

$$\text{FPKM} = [\text{nombre de « reads » du gène X} / (\text{nombre total de reads} * \text{taille du gène X})] * 10^9$$

IV.2.8 Test d'enrichissement en variants rares

Nous avons utilisé un test d'enrichissement (Burden test) afin de comparer la proportion de patients (atteints de PVM) et d'individus contrôles porteurs de variants rares pour chaque gène ciblé par le kit de re-séquençage (Annexe V.2).

Ainsi, nous avons calculé l'enrichissement en variants rares dans les 78 gènes candidats chez 272 individus atteints de PVM comparativement à 881 patients contrôles du projet UK10K (comparaison 2). Ces contrôles ont été sélectionnés à partir de six populations de patients atteints de troubles neuro-développementaux dont les exomes ont été séquencés dans le cadre du projet UK10K (<http://www.uk10k.org/>) (SureSelect Human All Exon V3 Agilent).

Seuls les variant retrouvés dans les régions couvertes par les deux méthodes de capture ont été conservés.

Nous avons focalisé notre attention sur les variants rares de fréquences de l'allèle mineure (MAF) inférieure ou égale à 0,1% (dans les populations européennes du projet 1000 Genomes

(379 individus européens et/ou du projet Exome Variant Server (4300 individus européens)) avec des conséquences fonctionnelles décrites dans le chapitre IV.2.2.4.

Afin de discriminer les variants à utiliser dans le test statistique des probables faux-positifs, nous avons effectué le test exact de Fisher pour chaque variant, en comparant le nombre d'allèles mutés dans les deux populations (cas et contrôles). Ceci a permis de réaliser un premier filtre excluant les variants dont la p-valeur est inférieure à 0,01. Un tel variant est soit un faux-positif dû à un biais expérimental lors du séquençage ou un vrai variant qu'il convient d'analyser à part par validation capillaire directe. Ensuite, nous avons exclu les variants absents des populations européennes du projet 1000 Genomes et/ou du projet Exome Variant Server mais qui présentaient une MAF supérieure à 5 % chez les cas et/ou les contrôles.

Les variants restants ont tous été inclus dans le test statistique CAST ('*cohort allelic sums test*' basé sur le test exact de Fisher) (Morgenthaler and Thilly 2007), qui a été appliqué pour chacun des 78 gènes de notre kit de re-séquençage. Tout gène ayant une p-valeur inférieure à 0,05 a été considéré comme potentiellement associé à la pathologie.

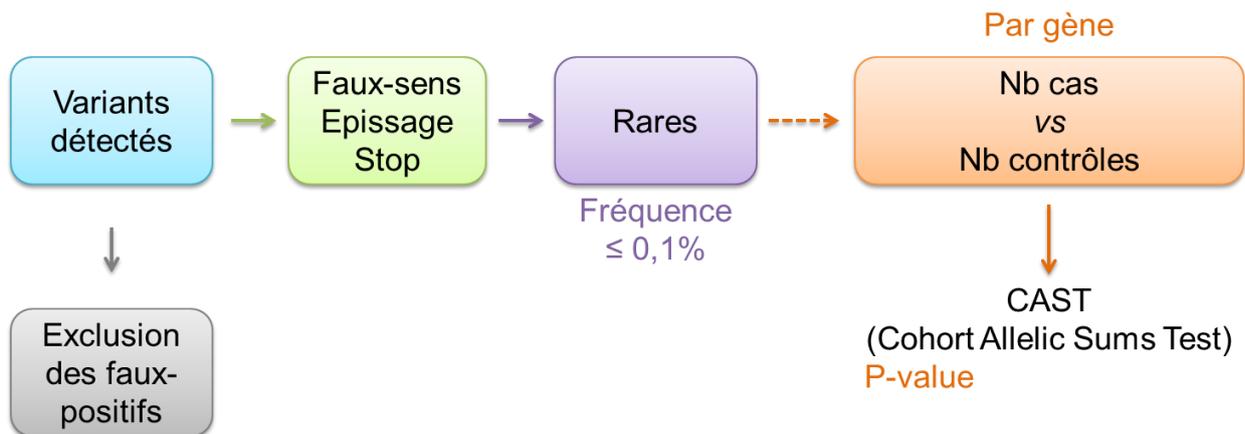


Figure 67: Représentation schématique des étapes d'analyses pour les tests d'enrichissement en variant rares

IV.3 Investigations cellulaires et fonctionnelles

IV.3.1 Lignées cellulaires

IV.3.1.1 Lignée HT-1080 (Fibrosarcome)

La lignée de cellules HT1080 a été obtenue à partir de cellules humaines issues d'un fibrosarcome d'un homme d'origine caucasienne âgé de 35 ans (Rasheed et al. 1974) n'ayant pas subi de chimio ou radiothérapie (ATCC Molsheim, France). Le milieu de culture est composé de DMEM (Gibco), 10% de SVF, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de streptomycine et 100 unité. ml^{-1} de pénicilline. Elles sont cultivées sous une atmosphère contenant 5% de CO_2 , une température de 37°C et ne nécessite pas de support particulier pour l'adhésion.

IV.3.1.2 Lignée de cellules HEK-293

Les cellules HEK-293 proviennent de cellules embryonnaires de rein humain qui ont été immortalisées par transfection de l'antigène T d'un mutant du virus SV40. Les conditions de culture sont identiques à celles des cellules HT-1080.

IV.3.2 Plasmides

Le plasmide pCAGGS-EGFP-DOCK1 a été obtenu auprès du professeur Yoshinori Fukui (Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Japan) par l'intermédiaire du Docteur Jean-François Côté (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Canada). Le clonage de la séquence codante de *DOCK1* a été réalisé dans un plasmide commercial pCAG-GFP résistant à l'ampicilline (Hara et al. 2008). Ce plasmide exprime sous l'influence d'un promoteur CMV la protéine Dock180 tagguée GFP en N-terminal.

L'amplification des plasmides a été réalisée dans des bactéries E.Coli BL21 électro-compétentes. Les bactéries sont placées avec 1 à 10 ng de plasmide dans une cuve à électroporation puis soumises à un courant de 1.8kV et une capacitance de 2.5 M Ω durant 4.3 ms.

Les bactéries sont ensuite re-suspendues dans 1 mL de milieu LB pendant une heure à 37°C sous agitation. La suspension est ensuite étalée sur boîte de LB-Agar contenant l'antibiotique de résistance (Ampicilline 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Après culture sur la nuit à 37°C la sélection clonale permet de prélever des clones résistants qui vont être cultivés individuellement dans 5 ou 100mL de LB-ampicilline (100mg/mL). L'amplification est réalisée sous agitation à 37°C sur la nuit. L'extraction d'ADN est réalisée avec les kits « Miniprep » ou « Midiprep »

(QIAGEN, Venlo, Pays-Bas) puis dosée par densité optique (Nanodrop, Waltham, Massachusetts (États-Unis)).

IV.3.3 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été réalisée à partir du plasmide pCAGGS-EGFP-DOCK1 afin de générer la mutation p.Arg1549Gln de la famille B. Nous avons utilisé le kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits (Santa Clara, CA, États-Unis) et suivi les recommandations du fournisseur. La présence de la mutation dans le plasmide obtenu a été vérifiée par séquençage capillaire.

IV.3.4 Conditions de transfection

Le transfectant utilisé pour la surexpression plasmidique est la GeneCellin (BioCellChallenge, Toulon, France). Le ratio de transfection utilisé est de 4 μ L de GeneCellin pour 1 μ g de plasmide dans 500 μ L d'optiMEM. Les complexes « GeneCellin-plasmide » sont formés pendant 15 minutes puis déposés sur les cellules. L'efficacité de transfection est estimée par microscopie à fluorescence. Les cellules sont utilisées après 24 heures de transfection.

IV.3.5 Mesure d'adhésion et d'étalement cellulaire

Ces mesures ont été réalisées grâce à la technologie xCELLigence® (Roche), qui permet de mesurer en temps réel les cinétiques d'adhésion, d'étalement et de prolifération cellulaire grâce à des mesures d'impédance (Keogh 2010) (Scrace et al. 2013). Nous déposons (en triplicata) dans chaque puit de la plaque de mesure, 10 000 cellules précisément (suite à un comptage cellulaire). Les puits de la plaque sont recouverts de microélectrodes qui permettent une mesure au cours du temps de l'impédance. La plaque est ensuite fixée sur un analyseur au sein d'un incubateur. Les mesures d'impédance sont traduites par un « Cell-index » en fonction du temps qui augmente au cours de l'adhésion de l'étalement ou de l'augmentation du nombre de cellules au cours du temps. Les valeurs sont ensuite reportées sur des courbes représentant la variation du Cell-Index en fonction du temps. Nos mesures ont été réalisées sur six heures et montrent que les cinétiques d'adhésion et d'étalement atteignent une phase de plateau au bout de 4h.

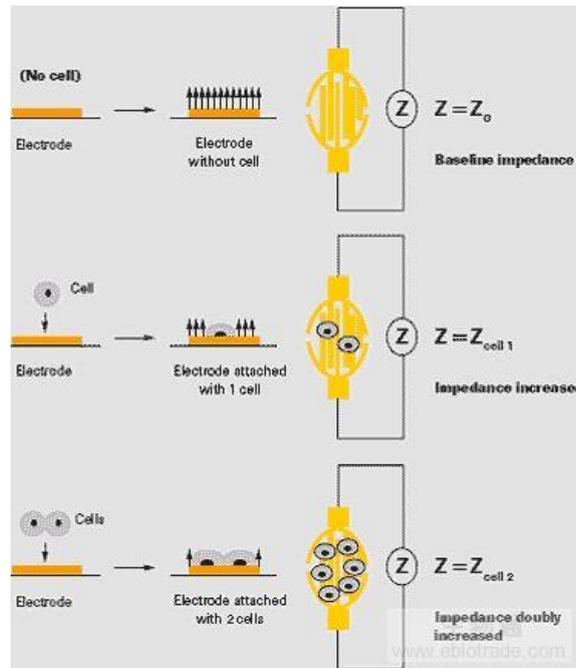


Figure 68: Représentation schématique des mesures d'adhésion cellulaire en fonction du temps par la technologie xCELLigence (Roche ®)

IV.3.6 Quantification de la migration cellulaire unidirectionnelle

La motilité cellulaire a été mesurée grâce à la technologie CYTOO (CytooPlates Motility, CYTOO, Grenoble, France). Ces mesures sont réalisées au sein de plaques 96 puits contenant des rails espacés d'un μm recouverts de fibronectine. Les espaces entre les rails sont recouverts d'un revêtement hydrophobe.

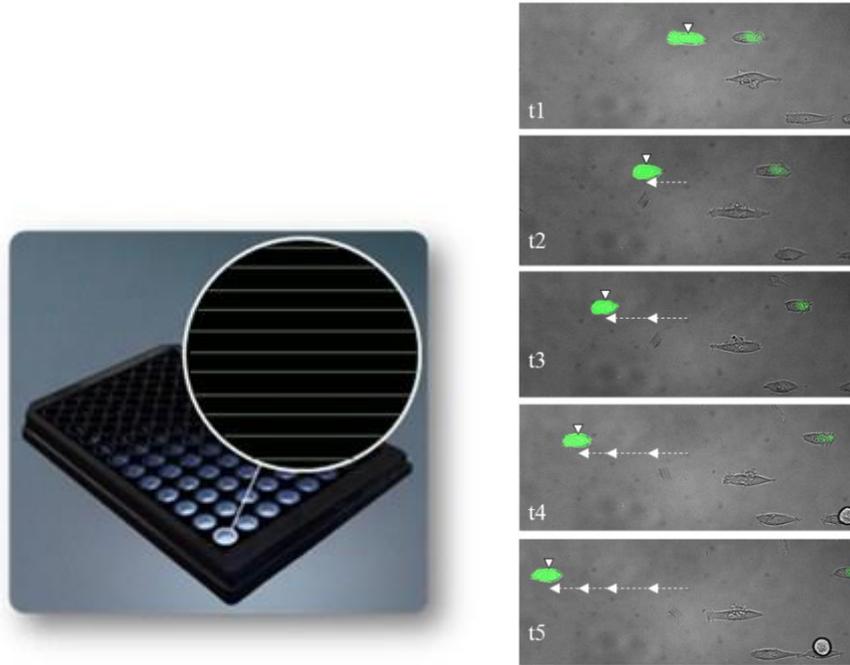


Figure 69: CytooPlates Motility, CYTOO et visualisation de la migration de cellules transfectées avec le plasmide pCAGGS-EGFP-DOCK1

Mille deux cent cellules HT1080 transfectées sont déposées dans les puits, en triplicata 4h avant les acquisitions afin de permettre l'adhésion des cellules. Lors de la phase d'adhésion les cellules sont placées dans un milieu contenant 10% de SVF. Lors de l'expérimentation les cellules sont placées dans un milieu contenant 1% de SVF afin de ne pas influencer sur le métabolisme cellulaire et de ne quantifier que les phénomènes migratoires. Les images sont prises à intervalles de temps réguliers ($\Delta t = 10\text{min}$) pendant 16h à l'aide d'un microscope Widefield Leica DMI 6000B piloté par le logiciel Metamorph (Plateforme cytoCell SFR-Bonamy- Nantes). Le suivi des cellules pour le calcul des vitesses de migration a été réalisé avec le logiciel ImageJ.

IV.3.7 Analyses statistiques

Les résultats d'xCELLigence sont présentés sous la forme de courbes avec l'erreur standard à la moyenne. Nous avons utilisé une analyse de variance deux voies grâce au logiciel GraphPad Prism®.

V - ANNEXES

V.1 Physiologie cardiaque générale

L'identification du cœur comme pompe du système circulatoire remonte au XVII^e siècle grâce aux descriptions de William Harvey. Le cœur est un organe musculaire, qui peut être assimilé à une pompe volumétrique, dont la fonction principale, est d'éjecter le sang dans l'ensemble de l'organisme. Il est composé de quatre cavités. Les deux cavités supérieures sont appelées oreillettes (Droite et Gauche) et les deux cavités inférieures, qui confèrent l'activité de pompe, sont appelées ventricules (Droit et Gauche) (Figure 70). En conditions physiologiques il n'y a pas de communication entre les cavités droites et gauches, on peut donc parler de « cœur droit » et de « cœur gauche », chacun composé d'une oreillette et d'un ventricule. Le sang pulsé par le cœur, circule dans un système clos formé par les vaisseaux sanguins (artères, capillaires, veines). Le sang suit un double circuit dans l'organisme: la circulation pulmonaire (ou petite circulation), issue du cœur droit et la circulation systémique (ou grande circulation) issue du cœur gauche (Figure 71). Le cœur droit et la circulation pulmonaire permettent d'oxygéner et de décarboxyler le sang au contact des alvéoles pulmonaires alors que le cœur gauche et la circulation systémique permettent la distribution de l'oxygène et des nutriments à l'ensemble de l'organisme.

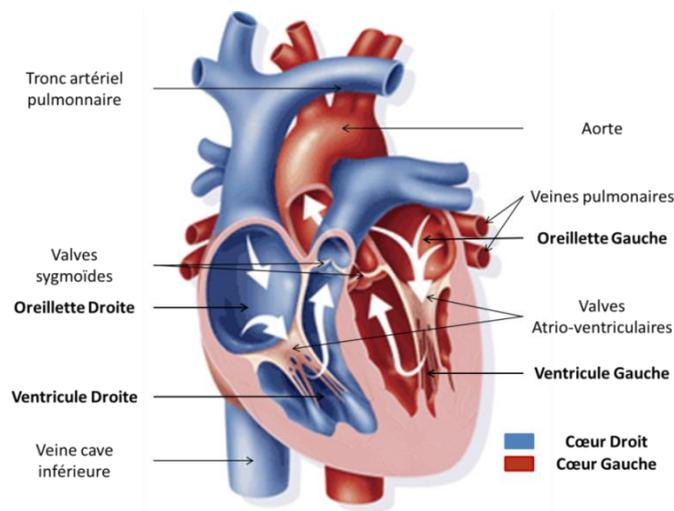


Figure 70: Schéma du cœur humain en coupe transversale

Issu et modifié à partir du site <http://drclaudevaislic.com/>

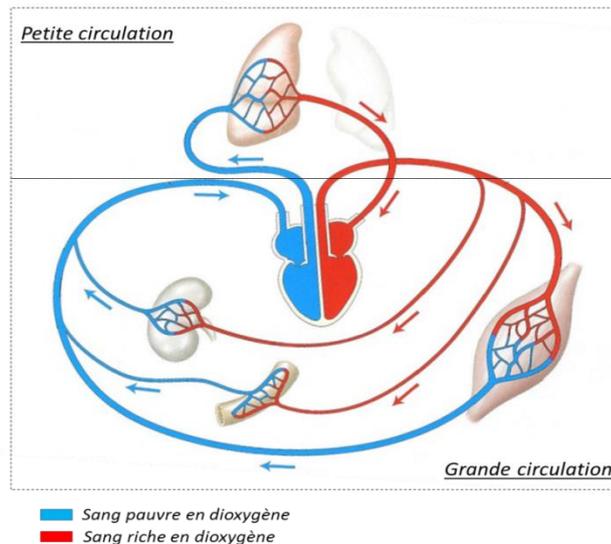


Figure 71: Représentation schématique de l'appareil circulatoire sanguin

Issu et modifié à partir du site <http://jeanvilarsciences.free.fr>

Le cycle de la mécanique cardiaque se décompose comme suit:

- Une diastole (ou relâchement) auriculaire permet le remplissage de l'oreillette à partir du retour veineux des veines caves, pour l'oreillette droite et des veines pulmonaires, pour l'oreillette gauche.
- Une systole (ou contraction) auriculaire provoquée par la contraction des oreillettes. Le sang est éjecté dans les ventricules.
- Une systole ventriculaire, correspond à la phase d'éjection du sang dans l'aorte (ventricule Gauche) et l'artère pulmonaire (Ventricule Droit). Le cœur droit et gauche se contractent et se relâchent en moyenne 70 fois par minute, on parle de rythme cardiaque.

Comme décrit précédemment, le rôle de la pompe cardiaque est d'assurer la distribution du sang dans l'organisme et d'en assurer la nutrition et l'oxygénation. Ce système est permis par l'établissement d'un flux sanguin pulsatile **unidirectionnel**. Cette dernière propriété n'est possible que par l'existence d'un **système valvulaire adapté**.

V.2 Analyse des données de séquençage d'exome pour la famille S

		III:18	III:23	III:32	III:34
Variants fonctionnels VEP	GATK	17924	18141	18002	18445
	Samtools	15638	15741	15662	15638
1000 Génomes EVS (MAF<1%)	GATK	3029	3174	3042	3396
	Samtools	1327	1358	1292	1344
UK10K, CG, GoNL	GATK	1670	1780	1699	1981
	Samtools	620	639	592	639
BDD internes	GATK	663	720	670	836
	Samtools	511	536	500	530
ExAC_NFE 0,1%	GATK	418	465	429	554
	Samtools	352	358	348	371
2 algorithmes	GATK/samtools	273	277	274	281
Partagés par les 3 patients atteints	GATK/samtools	3			

Tableau 23: Analyses des données de séquençage d'exome pour la famille S

Les filtres successifs d'analyse d'exome ont été réalisés avec l'outil Knime4bio et permettent de conserver les variants fonctionnels décrits par Variant Effect Predictor (VEP), rares (bases de données publiques et internes), retrouvés par les deux algorithmes de « calling » et partagés par les individus atteints séquencés. (Les étapes de l'analyse et les bases de données utilisées sont décrites dans le matériel et méthodes chapitre IV.2.2.4)

V.2 Analyse des données de séquençage d'exome pour la famille S

		IV:5	III:8	III:10	III:18	III:23	III:32	III:34
Variants fonctionnels VEP	GATK	17236	17094	17290	17924	18141	18002	18445
	Samtools	15588	15434	15379	15638	15741	15662	15638
1000 Génomes EVS (MAF<1%)	GATK	3988	3962	4007	3029	3174	3042	3396
	Samtools	2306	2291	2068	1327	1358	1292	1344
UK10K, CG, GoNL	GATK	2506	2506	2517	1670	1780	1699	1981
	Samtools	1301	1311	1110	620	639	592	639
BDD internes	GATK	802	796	798	663	720	670	836
	Samtools	826	852	774	511	536	500	530
ExAC_NFE 0,1%	GATK	444	466	432	418	465	429	554
	Samtools	590	637	551	352	358	348	371
2 algorithmes	GATK/samtools	291	279	270	273	277	274	281
Partagés par au moins 5 individus	GATK/samtools	9						

Tableau 24: Analyses des données de séquençage d'exome pour la famille S

Les filtres successifs d'analyse d'exome ont été réalisés avec l'outil Knime4bio et permettent de conserver les variants fonctionnels décrits par Variant Effect Predictor (VEP), rares (bases de données publiques et internes), retrouvés par les deux algorithmes de « calling » et partagés par les individus atteints séquencés. (Les étapes de l'analyse et les bases de données utilisées sont décrites dans le matériel et méthodes chapitre IV.2.2.4)

Position génomique (GRCh37)	Position protéique	MAF	Nom de gène	GERP	Expression valve mitrale
chr4:g.114269433A>G	p.Glu1449Gly	6,02E-04	ANK2	5,69	58,83
chrX:g.153716736C>T	p.Ala208Thr	6,30E-04	SLC10A3	-10,7	20,70
chr11:g.64428387C>T	p.Asp644Lys	NOVEL	NRXN2	4,52	7,82
chr6:g.43581512G>A	p.Val454Met	3,00E-05	POLH	1,27	5,22
chr15:g.44158492G>C	p.Val595Leu	4,50E-05	WDR76	6,17	1,36
chr10:g.83635880A>G	p.Thr262Ala	5,13E-04	NRG3	1,71	0,66
chr6:g.46656461G>C	p.Arg199Pro	NOVEL	TDRD6	-3,04	0,52
chr4:g.71503556G>A	p.Gly195Glu	4,50E-05	ENAM	4,81	0,03
chr11:g.63066440T>G	p.Asp293Glu	NOVEL	SLC22A10	-6,92	0,01
chr11:g.55433325C>T	p.Ser228Phe	NOVEL	OR4C6	4,07	0,00

Tableau 25: Variants fonctionnels rares retrouvés chez au moins cinq patients atteints de la de la famille S

Les fréquences de l'allèle mineure (MAF) sont issues de la base de données Exome Aggregation Consortium (ExAC) pour la population européenne non finlandaise (NFE). Les données d'expression génique au sein de la valve mitrale sont exprimées en FPKM (pour « Fragment per Kilobase of exon per million reads mapped »)

V.3 Liste des gènes inclus dans le « design » de re-séquençage ciblé

<i>Motifs de sélection</i>	<i>Nom des gènes</i>	<i>Taille des zones de capture (exons ± 10 pb)</i>
<i>Analyses familiales PVM non-syndromique (42 gènes)</i>	<i>AGAP2</i>	<i>4139</i>
	<i>ANGPTL5</i>	<i>1327</i>
	<i>ANK2</i>	<i>13973</i>
	<i>APC</i>	<i>9166</i>
	<i>ARHGAP24</i>	<i>2601</i>
	<i>ARMC1</i>	<i>969</i>
	<i>CHMP7</i>	<i>1816</i>
	<i>COL13A1</i>	<i>3201</i>
	<i>COL24A1</i>	<i>6476</i>
	<i>DAB2IP</i>	<i>3980</i>
	<i>DOCK1</i>	<i>6638</i>
	<i>EGFR</i>	<i>4734</i>
	<i>FLNA</i>	<i>9059</i>
	<i>FLNB</i>	<i>8990</i>
	<i>GIT2</i>	<i>2812</i>
	<i>IQGAP2</i>	<i>5625</i>
	<i>LRP12</i>	<i>2720</i>
	<i>LRP5</i>	<i>5308</i>
	<i>LRP6</i>	<i>5302</i>
	<i>LRRFIP1</i>	<i>4183</i>
	<i>MACF1</i>	<i>26205</i>
	<i>MAP3K1</i>	<i>4939</i>
	<i>MEGF8</i>	<i>9378</i>
	<i>MMP14</i>	<i>1949</i>
	<i>MMP2</i>	<i>2266</i>
	<i>MTOR</i>	<i>9217</i>
	<i>MYOM2</i>	<i>5118</i>
	<i>NKX2-6</i>	<i>946</i>
	<i>NOTCH2</i>	<i>9195</i>
	<i>PDLIM7</i>	<i>2105</i>
	<i>PLXNA1</i>	<i>6311</i>
	<i>PREX2</i>	<i>6348</i>
	<i>PTPN13</i>	<i>8611</i>
	<i>PTPRF</i>	<i>6820</i>
	<i>SDC4</i>	<i>697</i>
	<i>SDK1</i>	<i>7675</i>
	<i>SLC9A3R1</i>	<i>1320</i>
	<i>THSD7A</i>	<i>5543</i>
	<i>USP8</i>	<i>3871</i>
	<i>VAV2</i>	<i>3274</i>
	<i>DCHS1</i>	<i>10583</i>

V.3 Liste des gènes inclus dans le « design » de re-séquençage ciblé

	<i>MKL2</i>	4082
<i>Formes familiales de PVM syndromiques (4 gènes)</i>	<i>TGFBR1</i>	1722
	<i>TGFBR2</i>	2067
	<i>SMAD4</i>	1999
	<i>FBN1</i>	10024
<i>Retrouvé au sein des loci étude GWAS-PVM (15 gènes)</i>	<i>CAV3</i>	496
	<i>CBR1</i>	1451
	<i>CBR3</i>	894
	<i>DIRC3</i>	476
	<i>GLIS1</i>	2023
	<i>IGFBP2</i>	1174
	<i>IGFBP5</i>	1034
	<i>LMCD1</i>	1341
	<i>MNI</i>	4003
	<i>PAFAH1B1</i>	1433
	<i>PITPNB</i>	1379
	<i>SETD4</i>	1567
	<i>SMG6</i>	4750
	<i>TNP1</i>	208
<i>TNS1</i>	6958	
<i>Analyse d'exomes cas isolés (10 gènes)</i>	<i>ADAMTSL4</i>	3729
	<i>BMP1</i>	4199
	<i>FAT2</i>	13512
	<i>FLNC</i>	9138
	<i>HSPG2</i>	15687
	<i>KCNH3</i>	3552
	<i>LAMA1</i>	10692
	<i>LAMA5</i>	12964
	<i>MYOF</i>	7463
	<i>FILIP1</i>	3803
<i>Candidat fonctionnel (7 gènes)</i>	<i>DVL3</i>	2586
	<i>KLF2</i>	1128
	<i>USP9X</i>	8764
	<i>VCL</i>	3885
	<i>GATA4</i>	1452
	<i>GATA5</i>	1394
	<i>GATA6</i>	1908

Tableau 26: Liste des gènes inclus dans le design du kit de re-séquençage et critères de choix.

V.4 Données de couverture moyenne des échantillons séquencés avec le kit de re-séquençage ciblé

V.4 Données de couverture moyenne des échantillons séquencés avec le kit de re-séquençage ciblé

Échantillon	CM	Échantillon	CM	Échantillon	CM
CD02057	186,88	CD14192	171,2	CD02108	380,08
CD06738	178,97	CD02002	299,52	CD03184	326,61
CD07109	175,62	CD02029	229,46	CD03423	448,35
CD08045	202,94	CD05495	313,95	CD03499	284,28
CD08878	188,96	CD05496	244,53	CD03528	271,14
CD11172	163,36	CD05497	256,22	CD05505	299,04
CD11341	168,23	CD05500	295,89	CD05624	308,56
CD14174	238,43	CD05504	246,39	CD05672	316,1
H844	194,12	CD05511	263,66	CD06728	347,5
CD03505	221,32	CD05512	243,9	CD06729	307,18
CD05467	183,59	CD05517	265,03	CD06798	368,14
CD05551	257,39	CD05521	272,52	CD06841	265,96
CD05689	76,76	CD05614	202,01	CD06842	320,72
CD07017	244,93	CD05641	200,22	CD06853	348,69
CD07116	447,13	CD06732	311,44	CD07015	335,31
CD09131	231,72	CD08374	328,43	CD07025	343,89
CD09608	234,27	CD08836	231,99	CD07029	395,69
CD10057	320,7	CD08975	197,21	CD07031	257,41
CD10681	208,87	CD10438	217,77	CD07035	330,23
CD10842	212,71	CD11670	223,85	CD07036	334,32
CD10900	270,31	CD11771	328,28	CD07040	256
CD11095	153,17	CD11940	260,87	CD07041	394,4
CD11297	272,94	CD12065	210,9	CD07042	319,14
CD11330	263,95	CD12117	215,28	CD07046	1117,27
CD11444	214,82	CD12192	286,64	CD07053	383,91
CD11477	223,2	CD12301	261,54	CD07056	353,76
CD11478	225,54	CD12354	287,53	CD07057	297,71
CD11499	182,18	CD12374	230,53	CD07061	275,82
CD11523	238,2	CD12409	200,33	CD07064	351,31
CD11622	220,93	CD12446	228,64	CD07065	384,27
CD11680	344,72	CD12541	187,83	CD07070	303,62
CD11681	247,73	CD12639	150,49	CD07074	338,8
CD11686	308,12	CD12798	278,15	CD07076	315,96
CD11737	164,61	CD12897	304,14	CD07078	340,49
CD11879	333,4	CD12930	246,9	CD07084	328,79
CD11880	290,33	CD12980	220,21	CD07093	414,68
CD11889	374,07	CD12981	318,42	CD07095	297,82
CD11899	378,31	CD13145	247,71	CD07098	319,14
CD11900	287,99	CD13159	297,38	CD07101	370,5
CD11945	282,93	CD13259	260,2	CD07107	272,61
CD11953	199,71	CD13288	210,9	CD07112	409,19
CD11979	304,89	CD13365	243,95	CD07113	289,13
CD11980	325,68	CD13416	216,49	CD07117	331,89
CD12226	266,77	CD13425	257,69	CD07121	369,11
CD12227	144,8	CD13488	252,64	CD07124	321,19
CD12250	215,22	CD13543	286,83	CD07125	312,83
CD12305	201,94	CD13558	335,1	CD07127	316,59
CD12365	231,07	CD13562	269,11	CD07128	310,38
CD12460	227,8	CD13712	183,86	CD07133	329,54
CD12603	386,58	CD13730	324,75	CD07135	402,59

V.4 Données de couverture moyenne des échantillons séquencés avec le kit de re-séquençage ciblé

CD12721	307,85	CD13746	374,45	CD07137	318,36
CD12729	281,5	CD13770	255,7	CD07140	330,55
CD12730	181,09	CD13778	263,38	CD07162	397,93
CD12735	249,32	CD13799	239,98	CD07165	332,4
CD12757	332,02	CD13834	322,48	CD07170	331,56
CD12763	130,36	CD13959	208,85	CD07172	302,66
CD12788	128,87	CD13977	284,54	CD07175	183,27
CD12866	248,23	CD14042	232,68	CD07176	291,9
CD12877	128,3	CD14057	238,32	CD07179	620,67
CD12958	268,59	CD14075	238,98	CD07182	318,69
CD13009	216,81	CD14107	294,33	CD07186	281
CD13011	153,42	CD14121	389,31	CD07189	334,86
CD13013	143,59	CD14180	259,58	CD07190	478,13
CD13050	249,92	CD14191	218,33	CD07195	242,51
CD13051	235,27	CD14224	267,37	CD07198	347,26
CD13071	178,68	CD14234	216,1	CD07200	344,78
CD13082	320,72	CD14284	245,41	CD07313	296,97
CD13116	324,63	CD14342	244,06	CD07380	353,28
CD13151	315,15	CD14345	201,98	CD07422	286,35
CD13172	256,69	CD14349	240,75	CD07427	306,55
CD13214	164,85	CD14360	261,23	CD07437	322,4
CD13221	229,03	CD14388	289,77	CD07441	251,28
CD13245	256,63	CD14394	369,93	CD07453	438,01
CD13277	137,64	CD14407	250,67	CD07458	329,39
CD13312	349,75	CD14411	326,17	CD07459	428,65
CD13314	253,21	CD14414	219,41	CD07460	292,24
CD13339	216,57	CD14416	247,71	CD07515	246,38
CD13343	254,03	CD14477	225,77	CD07548	320,78
CD13568	266,2	CD14516	229,46	CD08048	305,9
CD13569	294,69	CD14525	256,34	CD08050	349,67
CD13608	270,93	CD14560	344,91	CD08052	216,69
CD13656	235,32	CD14565	251,98	CD08362	342,73
CD13658	235,47	CD14599	238,3	CD08364	409,26
CD13659	191,89	CD14600	244,97	CD08366	330,86
CD13731	269,09	CD14686	263,5	CD08370	389
CD13798	209,25	CD14707	283,65	CD08805	300,79
CD13838	237,98	CD14708	266,86	CD08806	341,2
CD13849	252,49	CD01935	294,51	CD08808	531,35
CD13889	146,23	CD01939	291,09	CD08830	294,47
CD13973	252,03	CD01982	294,25	CD08833	405,4
CD14083	227	CD01997	368,5	CD12426	348,89

Tableau 27: Données de couvertures moyennes en fonction des échantillons des 273 patients.

V.5 Variants identifiés par re-séquençage ciblé

Gènes	Positions génomiques (GRCh37) et protéiques	Patient	ID	Forme PVM	Âge opération	MAF	Apparentés atteints
<i>PTPRF</i>	chr1:g.44019301G>A, (p.Arg77His)	CD08806	rs367865707	Barlow	67	1,45E-04	0
	chr1:g.44057506C>A, (p.Gln519Lys)	CD13343		-	-	4,55E-05	0
	chr1:g.44057557C>G, (p.Pro536Ala)	CD14121	rs139284587	FED	-	7,62E-04	0
	chr1:g.44058264C>T, (p.Ala602Val)	CD13343		-	-	2,97E-05	0
	chr1:g.44064516G>T, (p.Val749Leu)	CD06842	rs201048136	Barlow	-	-	0
	chr1:g.44067763G>T, (p.Asp779Tyr)	CD07441		FED	68	-	0
	chr1:g.44072494G>A, (p.Ala1238Thr)	CD07046	rs199960147	Barlow	57	1,17E-04	0
	chr1:g.44079328C>T, (p.Ala1338Val)	CD07189	rs371752134	FED	50	4,36E-05	0
	chr1:g.44083200G>A, (p.Ala1386Tht)	CD12409	rs148741898	-	-	-	0
	chr1:g.44083427A>G, (p.Ile1406Val)	CD14057		Barlow	-	-	0
	chr1:g.44084391T>C, (p.Tyr1488His)	CD14121	rs371587895	FED	-	5,82E-05	0
chr1:g.44087627C>T, (p.Arg1893Cys)	CD08805		Barlow	72	-	0	
<i>APC</i>	chr5:g.112043533G>C, (p.Ser40Thr)	CD13011		-	63	2,41E-04	0
	chr5:g.112116562C>G, (p.Gln213Glu)	CD06738	rs141576417	-	72	9,05E-04	0
	chr5:g.112174802C>T, (p.Arg1153Cys)	CD13799	rs201830995	Barlow	-	3,07E-04	0
	chr5:g.112174146C>A, (p.Ala934Asp)	CD12541		Barlow	78	4,37E-05	0
	chr5:g.112174802C>T, (p.Arg1153Cys)	CD06798	rs201830995	Barlow	34	3,07E-04	0
<i>DOCK1</i>	chr10:g.128925964T>C, (p.Met907Thr)	CD07117	rs199604643	Barlow	56	3,96E-04	0
	chr10:g.129160479A>G, (c.3369+3A>G)	CD07460		Barlow	50		1
	chr10:g.129160479A>G, (c.3369+3A>G)	CD12301		FED	53		0
	chr10:g.129172393G>A, (p.Arg1176His)	CD07107	rs138926927	Barlow	82	4,90E-04	0
	chr10:g.129172482A>G, (c.3612+4A>G)	CD07061		Barlow	49		0
	chr10:g.129216807T>C, (c.4629+2T>C)	CD02108	rs189743657	FED	60	2,24E-04	1
	chr10:g.129216807T>C, (c.4629+2T>C)	CD13159	rs189743657	Barlow	-	2,24E-04	0
	chr10:g.129242462G>T, (p.Val1757Leu)	CD13798		-	-	4,29E-05	0
chr10:g.129249668G>A, (p.Val1859Met)	CD11172		-	-		4	
<i>ANK2</i>	chr4:g.114095663C>T, (p.Thr59Ile)	CD13712		FED	-	-	0
	chr4:g.114203891C>T, (p.Leu648Phe)	CD13116		FED	80	-	0
	chr4:g.114213639A>G, (p.Gln782Arg)	CD14407		FED	-	1,97E-05	0
	chr4:g.114244919G>A, (p.Ala948Thr)	CD14349	rs368551890	Barlow	65	-	0
	chr4:g.114260483C>T, (c.3893+5C>T)	CD14349		Barlow	65	1,45E-05	0
	chr4:g.114262866C>A, (p.Gln1297Lys)	CD07313		Barlow	74	-	0
	chr4:g.114267122G>T, (p.Gly1430Cys)	CD12730	rs34591340	FED	-	4,94E-04	7
	chr4:g.114269433A>G, (p.Glu1449Gly)	CD13730	rs72544141	Barlow	-	6,12E-04	0
	chr4:g.114269433A>G, (p.Glu1449Gly)	CD14416	rs72544141	Barlow	-	6,12E-04	0
	chr4:g.114269440G>T, (p.Glu1451Asp)	CD13562		FED	-	-	0
	chr4:g.114288812A>G, (p.His1614Arg)	CD03499		Barlow	62	-	1
chr4:g.114290875C>T, (p.Arg1748Trp)	CD07427	rs139797180	Barlow	63	1,46E-05	1	
<i>DCHS1</i>	chr11:g.6644220C>T, (p.Arg2896Gln)	CD08374	rs138323776	Barlow	57	6,18E-05	0
	chr11:g.6645472C>T, (p.Ala2479Thr)	CD07101	rs200993350	FED	-	6,26E-04	0
	chr11:g.6646039G>A, (p.Arg2403Trp)	CD13009	rs141901540	FED	41	9,32E-04	0
	chr11:g.6647232C>T, (p.Arg2217His)	CD07046	rs149822394	Barlow	57	-	0
	chr11:g.6647244G>T, (p.Ser2213Tyr)	CD07031		Barlow	31	-	0
	chr11:g.6652427G>A, (p.Leu1263Phe)	CD14224		FED	70	-	0
	chr11:g.6653789C>T, (p.Arg985Gln)	CD12866		-	-	5,32E-05	0
	chr11:g.6653810C>G, (p.Arg978Pro)	CD11979		-	-	9,14E-04	0
	chr11:g.6653910G>C, (p.Pro945Ala)	CD07017		Barlow	77	-	0
	chr11:g.6655195G>T, (p.Asn682Lys)	CD13214		-	42	-	1
	chr11:g.6655399G>A, (p.Arg646Cys)	CD13770	rs199875933	FED	68	1,47E-05	0
	chr11:g.6662141C>T, (p.Arg235Gln)	CD14057	rs143767864	Barlow	-	-	0
	chr11:g.6662343G>A, (p.Arg168Cys)	CD13731		Barlow	-	-	0
chr11:g.6662520G>A, (p.Arg109Cys)	CD12798	rs371390544	FED	53	2,08E-04	0	
<i>FLNA</i>	chrX:g.153590821C>A, (p.Gly844Cys)	CD11889		-	-	-	2

chrX:g.153580590G>C, (p.Ala2243Gly)	CD07186	Barlow	83	-	0
-------------------------------------	---------	--------	----	---	---

Tableau 28: Description des variants rares fonctionnels retrouvés dans les gènes de formes non syndromiques de PVM

Les variations protéiques sont basées sur les isoformes NM_002840.3_PTPRF, NM_001127511.2_APC, NM_001380.3_DOCK1, NM_001127493.1_ANK2, NM_003737.3_DCHS1 et NM_001110556.1_FLNA. Les fréquences de l'allèle mineur (MAF) sont issues de la base de données ExAC pour la population européenne non finlandaise.

VI - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, David H, Raphael Rosenhek, and Volkmar Falk. 2010. “Degenerative Mitral Valve Regurgitation: Best Practice Revolution.” *European Heart Journal* 31 (16): 1958–66. doi:10.1093/eurheartj/ehq222.
- Aggarwal, Kamna, and Joan Massagué. 2012. “Ubiquitin Removal in the TGF-B Pathway.” *Nature Cell Biology* 14 (7) (July): 656–7. doi:10.1038/ncb2534.
- Albert, M L, J I Kim, and R B Birge. 2000. “ α 5 β 1 Integrin Recruits the CrkII-Dock180-rac1 Complex for Phagocytosis of Apoptotic Cells.” *Nature Cell Biology* 2 (12) (December 5): 899–905. doi:10.1038/35046549.
- Andrabi, Sara, Mir R Bekheirnia, Patricia Robbins-Furman, Richard A Lewis, Thomas W Prior, and Lorraine Potocki. 2011. “SMAD4 Mutation Segregating in a Family with Juvenile Polyposis, Aortopathy, and Mitral Valve Dysfunction.” *American Journal of Medical Genetics. Part A* 155A (5): 1165–9. doi:10.1002/ajmg.a.33968.
- Andrejak, Michel, and Christophe Tribouilloy. 2013. “Drug-Induced Valvular Heart Disease: An Update.” *Archives of Cardiovascular Diseases* 106 (5) (May 3): 333–9. doi:10.1016/j.acvd.2013.02.003.
- Anyanwu, Ani C, and David H Adams. 2007. “Etiologic Classification of Degenerative Mitral Valve Disease: Barlow’s Disease and Fibroelastic Deficiency.” *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 19 (2) (Summer): 90–6. doi:10.1053/j.semtcvs.2007.04.002.
- Aoki, Koji, and Makoto Taketo. 2007. “Adenomatous Polyposis Coli (APC): A Multi-Functional Tumor Suppressor Gene.” *Journal of Cell Science* 120 (19): 3327–3335. doi:10.1242/jcs.03485.
- Armstrong, Ehrin, and Joyce Bischoff. 2004. “Heart Valve Development Endothelial Cell Signaling and Differentiation.” *Circulation Research* 95 (5): 459–470. doi:10.1161/01.RES.0000141146.95728.da.
- Arthur, Helen, and Simon Bamforth. 2011. “TGF β Signaling and Congenital Heart Disease: Insights from Mouse Studies.” *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 91 (6): 423–34. doi:10.1002/bdra.20794.
- Asnani, Aarti, and Randall T Peterson. 2014. “The Zebrafish as a Tool to Identify Novel Therapies for Human Cardiovascular Disease.” *Disease Models & Mechanisms* 7 (7): 763–7. doi:10.1242/dmm.016170.
- Attias, David, Chantal Stheneur, Carine Roy, Gwenaëlle Collod-Bérout, Delphine Detaint, Laurence Faivre, Marie-Ange A Delrue, et al. 2010. “Comparison of Clinical Presentations and Outcomes between Patients with TGFBR2 and FBN1 Mutations in Marfan Syndrome and Related Disorders.” *Circulation* 120 (25): 2541–9. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.887042.
- Atzinger, Carrie L, Richard A Meyer, Philip R Khoury, Zhiqian Gao, and Brad T Tinkle. 2011. “Cross-Sectional and Longitudinal Assessment of Aortic Root Dilation and Valvular Anomalies in Hypermobility and Classic Ehlers-Danlos Syndrome.” *The Journal of Pediatrics* 158 (5): 826–830.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2010.11.023.

Avierinos, Jean-François F, Bernard J Gersh, L J Melton, Kent R Bailey, Clarence Shub, Rick A Nishimura, A J Tajik, and Maurice Enriquez-Sarano. 2002. “Natural History of Asymptomatic Mitral Valve Prolapse in the Community.” *Circulation* 106 (11) (September 2): 1355–61.

Baasanjav, Sevjidmaa, Lihadh Al-Gazali, Taishi Hashiguchi, Shuji Mizumoto, Bjoern Fischer, Denise Horn, Dominik Seelow, et al. 2011. “Faulty Initiation of Proteoglycan Synthesis Causes Cardiac and Joint Defects.” *The American Journal of Human Genetics* 89 (1). doi:10.1016/j.ajhg.2011.05.021.

Benson, D W, Dao W Wang, Macaira Dymont, Timothy K Knilans, Frank A Fish, Margaret J Strieper, Thomas H Rhodes, and Alfred L George. 2003. “Congenital Sick Sinus Syndrome Caused by Recessive Mutations in the Cardiac Sodium Channel Gene (SCN5A).” *The Journal of Clinical Investigation* 112 (7) (October 3): 1019–28. doi:10.1172/JCI18062.

Bezzina, Connie, Julien Barc, Yuka Mizusawa, Carol Remme, Jean-Baptiste Gourraud, Floriane Simonet, Arie Verkerk, et al. 2013. “Common Variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 Are Associated with Brugada Syndrome, a Rare Disease with High Risk of Sudden Cardiac Death.” *Nature Genetics* 45 (9): 1044–1049. doi:10.1038/ng.2712.

Bischoff, Joyce, and Elena Aikawa. 2011. “Progenitor Cells Confer Plasticity to Cardiac Valve Endothelium.” *Journal of Cardiovascular Translational Research* 4 (6): 710–719. doi:10.1007/s12265-011-9312-0.

Bonachea, Elizabeth M, Gloria Zender, Peter White, Don Corsmeier, David Newsom, Sara Fitzgerald-Butt, Vidu Garg, and Kim L McBride. 2014. “Use of a Targeted, Combinatorial next-Generation Sequencing Approach for the Study of Bicuspid Aortic Valve.” *BMC Medical Genomics* 7 (January 3): 56. doi:10.1186/1755-8794-7-56.

Botstein, D, R L White, M Skolnick, and R W Davis. 1980. “Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms.” *American Journal of Human Genetics* 32 (3) (May 4): 314–31.

Braga, Vania. 2002. “GEF without a Dbl Domain?” *Nature Cell Biology* 4 (8): E188–E190. doi:10.1038/ncb0802-e188.

Brault, V, R Moore, S Kutsch, M Ishibashi, D H Rowitch, A P McMahon, L Sommer, O Boussadia, and R Kemler. 2001. “Inactivation of the Beta-Catenin Gene by Wnt1-Cre-Mediated Deletion Results in Dramatic Brain Malformation and Failure of Craniofacial Development.” *Development (Cambridge, England)* 128 (8) (April): 1253–64.

Brugnera, Enrico, Lisa Haney, Cynthia Grimsley, Mingjian Lu, Scott Walk, Annie-Carole Tosello-Tramont, Ian Macara, Hiten Madhani, Gerald Fink, and Kodimangalam Ravichandran. 2002. “Unconventional Rac-GEF Activity Is Mediated through the Dock180–ELMO Complex.” *Nature Cell Biology* 4 (8): 574–582. doi:10.1038/ncb824.

Butcher, Jonathan T, and Robert M Nerem. 2006. “Valvular Endothelial Cells Regulate the Phenotype of Interstitial Cells in Co-Culture: Effects of Steady Shear Stress.” *Tissue Engineering* 12 (4): 905–15. doi:10.1089/ten.2006.12.905.

- Butcher, Jonathan T, Andrea M Penrod, Andrés J J García, and Robert M Nerem. 2004. "Unique Morphology and Focal Adhesion Development of Valvular Endothelial Cells in Static and Fluid Flow Environments." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (8) (August): 1429–34. doi:10.1161/01.ATV.0000130462.50769.5a.
- Butcher, Jonathan T, Sarah Tressel, Tiffany Johnson, Debi Turner, George Sorescu, Hanjoong Jo, and Robert M Nerem. 2006. "Transcriptional Profiles of Valvular and Vascular Endothelial Cells Reveal Phenotypic Differences: Influence of Shear Stress." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (1) (January): 69–77. doi:10.1161/01.ATV.0000196624.70507.0d.
- Butcher, and Markwald. 2007. "Valvulogenesis: The Moving Target." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362 (1484): 14891503. doi:10.1098/rstb.2007.2130.
- Calderwood, D A, A Huttenlocher, W B Kiosses, D M Rose, D G Woodside, M A Schwartz, and M H Ginsberg. 2001. "Increased Filamin Binding to Beta-Integrin Cytoplasmic Domains Inhibits Cell Migration." *Nature Cell Biology* 3 (12) (December 6): 1060–8. doi:10.1038/ncb1201-1060.
- Cappello, Silvia, Mary Gray, Caroline Badouel, Simona Lange, Melanie Einsiedler, Myriam Srouf, David Chitayat, et al. 2013. "Mutations in Genes Encoding the Cadherin Receptor-Ligand Pair DCHS1 and FAT4 Disrupt Cerebral Cortical Development." *Nature Genetics* 45 (11): 1300–1308. doi:10.1038/ng.2765.
- Chakravarti, A. 1999. "Population Genetics--Making Sense out of Sequence." *Nature Genetics* 21 (1 Suppl) (January 5): 56–60. doi:10.1038/4482.
- Chandra, Sonal, Ivan S Salgo, Lissa Sugeng, Lynn Weinert, Wendy Tsang, Masaaki Takeuchi, Kirk T Spencer, et al. 2011. "Characterization of Degenerative Mitral Valve Disease Using Morphologic Analysis of Real-Time Three-Dimensional Echocardiographic Images: Objective Insight into Complexity and Planning of Mitral Valve Repair." *Circulation. Cardiovascular Imaging* 4 (1) (January 6): 24–32. doi:10.1161/circimaging.109.924332.
- Chang, Ching-Pin, Joel Neilson, J.Henri Bayle, Jason Gestwicki, Ann Kuo, Kryn Stankunas, Isabella Graef, and Gerald Crabtree. 2004. "A Field of Myocardial-Endocardial NFAT Signaling Underlies Heart Valve Morphogenesis." *Cell* 118 (5). doi:10.1016/j.cell.2004.08.010.
- Chen, Huaiyang, Ian C Duncan, Hormozd Bozorgchami, and Su H Lo. 2002. "Tensin1 and a Previously Undocumented Family Member, tensin2, Positively Regulate Cell Migration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2) (January 2): 733–8. doi:10.1073/pnas.022518699.
- Chen, Huaiyang, and Su H Lo. 2003. "Regulation of Tensin-Promoted Cell Migration by Its Focal Adhesion Binding and Src Homology Domain 2." *The Biochemical Journal* 370 (Pt 3) (March 6): 1039–45. doi:10.1042/BJ20021308.
- Chen, I-Hui H, Hsueh-Hsiao H Wang, Yi-Shan S Hsieh, Wei-Chang C Huang, Hung-I I Yeh, and Yung-Jen J Chuang. 2013. "PRSS23 Is Essential for the Snail-Dependent Endothelial-to-

Mesenchymal Transition during Valvulogenesis in Zebrafish.” *Cardiovascular Research* 97 (3): 443–53. doi:10.1093/cvr/cvs355.

Cheresh, D A, J Leng, and R L Klemke. 1999. “Regulation of Cell Contraction and Membrane Ruffling by Distinct Signals in Migratory Cells.” *The Journal of Cell Biology* 146 (5) (September 1): 1107–16.

Clavel, Marie-Annick A, Francesca Mantovani, Joseph Malouf, Hector I Michelena, Ori Vatury, Mothilal S Jain, Sunil V Mankad, Rakesh M Suri, and Maurice Enriquez-Sarano. 2015. “Dynamic Phenotypes of Degenerative Myxomatous Mitral Valve Disease: Quantitative 3-Dimensional Echocardiographic Study.” *Circulation. Cardiovascular Imaging* 8 (5) (May 5). doi:10.1161/CIRCIMAGING.114.002989.

Cole, W G, D Chan, A J Hickey, and D E Wilcken. 1984. “Collagen Composition of Normal and Myxomatous Human Mitral Heart Valves.” *The Biochemical Journal* 219 (2) (April): 451–60.

Collod, G, M C Babron, G Jondeau, M Coulon, J Weissenbach, O Dubourg, J P Bourdarias, C Bonaiti-Pellié, C Junien, and C Boileau. 1994. “A Second Locus for Marfan Syndrome Maps to Chromosome 3p24.2-p25.” *Nature Genetics* 8 (3) (November 2): 264–8. doi:10.1038/ng1194-264.

Combs, and Yutzey. 2009. “Heart Valve Development: Regulatory Networks in Development and Disease.” *Circulation Research* 105 (5): 408421. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201566.

CRISCITIELLO, M G, J A RONAN, E M BESTERMAN, and W SCHOEHWETTER. 1965. “CARDIOVASCULAR ABNORMALITIES IN OSTEOGENESIS IMPERFECTA.” *Circulation* 31: 255–62.

Cunha, Shane R, and Peter J Mohler. 2008. “Obscurin Targets Ankyrin-B and Protein Phosphatase 2A to the Cardiac M-Line.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (46) (November 5): 31968–80. doi:10.1074/jbc.M806050200.

Cunningham, Fiona, M R Amode, Daniel Barrell, Kathryn Beal, Konstantinos Billis, Simon Brent, Denise Carvalho-Silva, et al. 2015. “Ensembl 2015.” *Nucleic Acids Research* 43 (Database issue) (January 4): D662–9. doi:10.1093/nar/gku1010.

Côté, Jean-François F, and Kristiina Vuori. 2006. “In Vitro Guanine Nucleotide Exchange Activity of DHR-2/DOCKER/CZH2 Domains.” *Methods in Enzymology* 406 (January): 41–57. doi:10.1016/S0076-6879(06)06004-6.

Côté, Jean-François, and Kristiina Vuori. 2002. “Identification of an Evolutionarily Conserved Superfamily of DOCK180-Related Proteins with Guanine Nucleotide Exchange Activity.” *Journal of Cell Science* 115 (24): 4901–4913. doi:10.1242/jcs.00219.

Danecek, Petr, Adam Auton, Goncalo Abecasis, Cornelis A Albers, Eric Banks, Mark A DePristo, Robert E Handsaker, et al. 2011. “The Variant Call Format and VCFtools.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (15): 2156–8. doi:10.1093/bioinformatics/btr330.

- De Lange, Frederik J, Antoon F Moorman, Robert H Anderson, Jörg Männer, Alexandre T Soufan, Corrie de Gier-de Vries, Michael D Schneider, Sandra Webb, Maurice J van den Hoff, and Vincent M Christoffels. 2004. "Lineage and Morphogenetic Analysis of the Cardiac Valves." *Circulation Research* 95 (6) (September 5): 645–54. doi:10.1161/01.RES.0000141429.13560.cb.
- De Vlaming, Annemarieke, Kimberly Sauls, Zoltan Hajdu, Richard Visconti, Agnes Mehesz, Robert Levine, Susan Slaugenhaupt, et al. 2012. "Atrioventricular Valve Development: New Perspectives on an Old Theme." *Differentiation* 84 (1): 103116. doi:10.1016/j.diff.2012.04.001.
- Delling, Francesca N, Jian Rong, Martin G Larson, Birgitta Lehman, Ewa Osypiuk, Plamen Stantchev, Susan A Slaugenhaupt, Emelia J Benjamin, Robert A Levine, and Ramachandran S Vasan. 2015. "Familial Clustering of Mitral Valve Prolapse in the Community." *Circulation* 131 (3) (January 2): 263–8. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012594.
- Delling, Francesca N, and Ramachandran S Vasan. 2014. "Epidemiology and Pathophysiology of Mitral Valve Prolapse: New Insights into Disease Progression, Genetics, and Molecular Basis." *Circulation* 129 (21) (May 2): 2158–70. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006702.
- Detweiler, D K, and D F Patterson. 1965. "The Prevalence and Types of Cardiovascular Disease in Dogs." *Annals of the New York Academy of Sciences* 127 (1): 481–516.
- Devereux, R B, W T Brown, R Kramer-Fox, and I Sachs. 1983. "Inheritance of Mitral Valve Prolapse: Effect of Age and Sex on Gene Expression." *Annals of Internal Medicine* 97 (6): 826–32.
- Devereux, R B, R Kramer-Fox, M K Shear, P Kligfield, R Pini, and D D Savage. 1987. "Diagnosis and Classification of Severity of Mitral Valve Prolapse: Methodologic, Biologic, and Prognostic Considerations." *American Heart Journal* 113 (5) (May 5): 1265–80.
- Di Zazzo, Erika, Caterina De Rosa, Ciro Abbondanza, and Bruno Moncharmont. 2013. "PRDM Proteins: Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Transcriptional Regulation." *Biology* 2 (1) (January 2): 107–41. doi:10.3390/biology2010107.
- Dickson, Samuel P, Kai Wang, Ian Krantz, Hakon Hakonarson, and David B Goldstein. 2010. "Rare Variants Create Synthetic Genome-Wide Associations." *PLoS Biology* 8 (1) (January 5): e1000294. doi:10.1371/journal.pbio.1000294.
- Dietz, H C, G R Cutting, R E Pyeritz, C L Maslen, L Y Sakai, G M Corson, E G Puffenberger, A Hamosh, E J Nanthakumar, and S M Curristin. 1991. "Marfan Syndrome Caused by a Recurrent de Novo Missense Mutation in the Fibrillin Gene." *Nature* 352 (6333): 337–9. doi:10.1038/352337a0.
- Digilio, Maria, Francesca Lepri, Maria Dentici, Alex Henderson, Anwar Baban, Maria Roberti, Rossella Capolino, et al. 2012. "Atrioventricular Canal Defect in Patients with RASopathies." *European Journal of Human Genetics* 21 (2): 200–204. doi:10.1038/ejhg.2012.145.

- Dina, Christian, Nabila Bouatia-Naji, Nathan Tucker, Francesca N Delling, Katelynn Toomer, Ronen Durst, Maelle Perrocheau, et al. 2015. “Genetic Association Analyses Highlight Biological Pathways Underlying Mitral Valve Prolapse.” *Nature Genetics* (August 1). doi:10.1038/ng.3383.
- Disse, S, E Abergel, A Berrebi, A M Houot, J Y Le Heuzey, B Diebold, L Guize, A Carpentier, P Corvol, and X Jeunemaitre. 1999. “Mapping of a First Locus for Autosomal Dominant Myxomatous Mitral-Valve Prolapse to Chromosome 16p11.2-p12.1.” *American Journal of Human Genetics* 65 (5): 1242–51. doi:10.1086/302624.
- Dor, Y, T D Camenisch, A Itin, G I Fishman, J A McDonald, P Carmeliet, and E Keshet. 2001. “A Novel Role for VEGF in Endocardial Cushion Formation and Its Potential Contribution to Congenital Heart Defects.” *Development (Cambridge, England)* 128 (9) (May 2): 1531–8.
- Dreger, Sally A, Patricia M Taylor, Sean P Allen, and Magdi H Yacoub. 2002. “Profile and Localization of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Their Tissue Inhibitors (TIMPs) in Human Heart Valves.” *The Journal of Heart Valve Disease* 11 (6): 875–80; discussion 880.
- Droogmans, Steven, Bram Roosens, Bernard Cosyns, Céline Degallier, Sophie Hernot, Caroline Weytjens, Christian Garbar, et al. 2009. “Dose Dependency and Reversibility of Serotonin-Induced Valvular Heart Disease in Rats.” *Cardiovascular Toxicology* 9 (3) (September 2): 134–41. doi:10.1007/s12012-009-9046-2.
- Du, Cheng, Chuanyou Zhang, Sazzad Hassan, Md H Biswas, and K C Balaji. 2010. “Protein Kinase D1 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Phosphorylation of Snail.” *Cancer Research* 70 (20) (October 5): 7810–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4481.
- Du, William W, Ling Fang, Minhui Li, Xiangling Yang, Yaoyun Liang, Chun Peng, Wei Qian, et al. 2013. “MicroRNA miR-24 Enhances Tumor Invasion and Metastasis by Targeting PTPN9 and PTPRF to Promote EGF Signaling.” *Journal of Cell Science* 126 (Pt 6) (March 5): 1440–53. doi:10.1242/jcs.118299.
- Dubé, Joseph B, Christopher T Johansen, John F Robinson, Joan Lindsay, Vladimir Hachinski, and Robert A Hegele. 2013. “Genetic Determinants of ‘Cognitive Impairment, No Dementia’.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 33 (3) (January 2): 831–40. doi:10.3233/JAD-2012-121477.
- Durbin, Adam D, and Avrum I Gotlieb. 2002. “Advances towards Understanding Heart Valve Response to Injury.” *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 11 (2): 69–77.
- Durst, Ronen, Kimberly Sauls, David Peal, Annemarieke deVlaming, Katelynn Toomer, Maire Leyne, Monica Salani, et al. 2015. “Mutations in DCHS1 Cause Mitral Valve Prolapse.” *Nature*. doi:10.1038/nature14670.
- Duval, D, A Lardeux, T Le Tourneau, R A Norris, R R Markwald, V Sauzeau, V Probst, et al. 2014. “Valvular Dystrophy Associated Filamin A Mutations Reveal a New Role of Its First Repeats in Small-GTPase Regulation.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1843 (2) (February 6): 234–44. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.022.

- Düren, D R, A E Becker, and A J Dunning. 1988. "Long-Term Follow-up of Idiopathic Mitral Valve Prolapse in 300 Patients: A Prospective Study." *Journal of the American College of Cardiology* 11 (1) (January 5): 42–7.
- Ehrlicher, Nakamura, Hartwig, Weitz, and Stossel. 2011. "Mechanical Strain in Actin Networks Regulates FilGAP and Integrin Binding to Filamin A." *Nature* 478 (7368): 260–263. doi:10.1038/nature10430.
- Eichhorn, Pieter, Laura Rodón, Alba González-Juncà, Annette Dirac, Magüi Gili, Elena Martínez-Sáez, Claudia Aura, et al. 2012. "USP15 Stabilizes TGF- β Receptor I and Promotes Oncogenesis through the Activation of TGF- β Signaling in Glioblastoma." *Nature Medicine* 18 (3): 429–435. doi:10.1038/nm.2619.
- Eisenberg, L M, and R R Markwald. 1995. "Molecular Regulation of Atrioventricular Valvuloseptal Morphogenesis." *Circulation Research* 77 (1): 1–6.
- Enriquez-Sarano, Maurice, Jean-François F Avierinos, David Messika-Zeitoun, Delphine Detaint, Maryann Capps, Vuyisile Nkomo, Christopher Scott, Hartzell V Schaff, and A J Tajik. 2005. "Quantitative Determinants of the Outcome of Asymptomatic Mitral Regurgitation." *The New England Journal of Medicine* 352 (9) (March 4): 875–83. doi:10.1056/NEJMoa041451.
- Erickson, M R, B J Galletta, and S M Abmayr. 1997. "Drosophila Myoblast City Encodes a Conserved Protein That Is Essential for Myoblast Fusion, Dorsal Closure, and Cytoskeletal Organization." *The Journal of Cell Biology* 138 (3) (August 1): 589–603.
- Fayet, Cristina, Michelle P Bendeck, and Avrum I Gotlieb. 2007. "Cardiac Valve Interstitial Cells Secrete Fibronectin and Form Fibrillar Adhesions in Response to Injury." *Cardiovascular Pathology : The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 16 (4): 203–11. doi:10.1016/j.carpath.2007.02.008.
- Flanagan, Thomas C, Brendan Wilkins, Alexander Black, Stefan Jockenhoevel, Terence J Smith, and Abhay S Pandit. 2006. "A Collagen-Glycosaminoglycan Co-Culture Model for Heart Valve Tissue Engineering Applications." *Biomaterials* 27 (10): 2233–46. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.10.031.
- Fodde, R, W Edelmann, K Yang, C van Leeuwen, C Carlson, B Renault, C Breukel, E Alt, M Lipkin, and P M Khan. 1994. "A Targeted Chain-Termination Mutation in the Mouse Apc Gene Results in Multiple Intestinal Tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (19) (September 2): 8969–73.
- Fondard, Olivier, Delphine Detaint, Bernard Iung, Christine Choqueux, Homa Adle-Biassette, Mohamed Jarraya, Ulrich Hvass, et al. 2005. "Extracellular Matrix Remodelling in Human Aortic Valve Disease: The Role of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors." *European Heart Journal* 26 (13) (July 5): 1333–41. doi:10.1093/eurheartj/ehi248.
- Fornes, P, D Heudes, J F Fuzellier, D Tixier, P Bruneval, and A Carpentier. 1999. "Correlation between Clinical and Histologic Patterns of Degenerative Mitral Valve Insufficiency: A Histomorphometric Study of 130 Excised Segments." *Cardiovascular*

Pathology : The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology 8 (2) (January 5): 81–92.

Freed, Lisa A, James S Acierno, Daisy Dai, Maire Leyne, Jane E Marshall, Francesca Nesta, Robert A Levine, and Susan A Slaugenhaupt. 2003. “A Locus for Autosomal Dominant Mitral Valve Prolapse on Chromosome 11p15.4.” *American Journal of Human Genetics* 72 (6): 1551–9. doi:10.1086/375452.

Freed, Lisa, Daniel Levy, Robert Levine, Martin Larson, Jane Evans, Deborah Fuller, Birgitta Lehman, and Emelia Benjamin. 1999. “Prevalence and Clinical Outcome of Mitral-Valve Prolapse.” *The New England Journal of Medicine*. doi:10.1056/NEJM199907013410101.

García, Encarna, and Nine Knoers. 2009. “Gardner’s Syndrome (familial Adenomatous Polyposis): A Cilia-Related Disorder.” *The Lancet. Oncology* 10 (7): 727–35. doi:10.1016/s1470-2045(09)70167-6.

Gebbink, M F, G C Zondag, R W Wubbolts, R L Beijersbergen, I van Etten, and W H Moolenaar. 1993. “Cell-Cell Adhesion Mediated by a Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (22) (August 4): 16101–4.

Germain, Marine, Mélanie Eyries, David Montani, Odette Poirier, Barbara Girerd, Peter Dorfmüller, Florence Coulet, et al. 2013. “Genome-Wide Association Analysis Identifies a Susceptibility Locus for Pulmonary Arterial Hypertension.” *Nature Genetics* 45 (5) (May 3): 518–21. doi:10.1038/ng.2581.

Gessert, Susanne, and Michael Kühl. 2010. “The Multiple Phases and Faces of Wnt Signaling During Cardiac Differentiation and Development.” *Circulation Research* 107 (2): 186–199. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.221531.

Gitler, Aaron D, Min M Lu, Yue Q Jiang, Jonathan A Epstein, and Peter J Gruber. 2003. “Molecular Markers of Cardiac Endocardial Cushion Development.” *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 228 (4) (December 1): 643–50. doi:10.1002/dvdy.10418.

Glower, Donald D, Saibal Kar, Alfredo Trento, D S Lim, Tanvir Bajwa, Ramon Quesada, Patrick L Whitlow, et al. 2014. “Percutaneous Mitral Valve Repair for Mitral Regurgitation in High-Risk Patients: Results of the EVEREST II Study.” *Journal of the American College of Cardiology* 64 (2) (July 2): 172–81. doi:10.1016/j.jacc.2013.12.062.

Goff, Carine, Fanny Morice-Picard, Nathalie Dagonneau, Lauren Wang, Claire Perrot, Yanick Crow, Florence Bauer, et al. 2008. “ADAMTSL2 Mutations in Geleophysic Dysplasia Demonstrate a Role for ADAMTS-like Proteins in TGF-² Bioavailability Regulation.” *Nature Genetics* 40 (9): 1119–1123. doi:10.1038/ng.199.

Gonzalez, David M, and Damian Medici. 2014. “Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Science Signaling* 7 (344) (September 2): re8. doi:10.1126/scisignal.2005189.

Groden, Joanna, Andrew Thliveris, Wade Samowitz, Mary Carlson, Lawrence Gelbert, Hans Albertsen, Geoff Joslyn, et al. 1991. “Identification and Characterization of the Familial

Adenomatous Polyposis Coli Gene.” *Cell* 66 (3): 589600. doi:10.1016/0092-8674(81)90021-0.

Groenink, Maarten, Alexander den Hartog, Romy Franken, Teodora Radonic, Vivian de Waard, Janneke Timmermans, Arthur Scholte, et al. 2013. “Losartan Reduces Aortic Dilatation Rate in Adults with Marfan Syndrome: A Randomized Controlled Trial.” *European Heart Journal* 34 (45): 3491–3500. doi:10.1093/eurheartj/eh334.

Gross, L, and M A Kugel. 1931. “Topographic Anatomy and Histology of the Valves in the Human Heart.” *The American Journal of Pathology* 7 (5) (September 2): 445–474.7.

Gumienny, T L, E Brugnera, A C Tosello-Trampont, J M Kinchen, L B Haney, K Nishiwaki, S F Walk, et al. 2001. “CED-12/ELMO, a Novel Member of the CrkII/Dock180/Rac Pathway, Is Required for Phagocytosis and Cell Migration.” *Cell* 107 (1) (October 5): 27–41.

Haapasalo, Annakaisa, Doo Y Kim, Bryce W Carey, Mari K Turunen, Warren H Pettingell, and Dora M Kovacs. 2007. “Presenilin/gamma-Secretase-Mediated Cleavage Regulates Association of Leukocyte-Common Antigen-Related (LAR) Receptor Tyrosine Phosphatase with Beta-Catenin.” *The Journal of Biological Chemistry* 282 (12) (March 5): 9063–72. doi:10.1074/jbc.M611324200.

Habashi, Jennifer P, Daniel P Judge, Tammy M Holm, Ronald D Cohn, Bart L Loeys, Timothy K Cooper, Loretha Myers, et al. 2006. “Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome.” *Science (New York, N.Y.)* 312 (5770): 117–21. doi:10.1126/science.1124287.

Haines, Jonathan L, Michael A Hauser, Silke Schmidt, William K Scott, Lana M Olson, Paul Gallins, Kylee L Spencer, et al. 2005. “Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration.” *Science (New York, N.Y.)* 308 (5720) (April 5): 419–21. doi:10.1126/science.1110359.

Hall, Emily H, Abbi E Daugherty, Colin K Choi, Alan F Horwitz, and David L Brautigan. 2009. “Tensin1 Requires Protein Phosphatase-1alpha in Addition to RhoGAP DLC-1 to Control Cell Polarization, Migration, and Invasion.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (50) (December 5): 34713–22. doi:10.1074/jbc.M109.059592.

Han, Lide, and Mark Abney. 2011. “Identity by Descent Estimation with Dense Genome-Wide Genotype Data.” *Genetic Epidemiology* 35 (6) (September 4): 557–67. doi:10.1002/gepi.20606.

Hara, Shigeo, Etsuko Kiyokawa, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Thomas Wassmer, Peter J Cullen, Hiroshi Hiai, and Michiyuki Matsuda. 2008. “The DHR1 Domain of DOCK180 Binds to SNX5 and Regulates Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor Transport.” *Molecular Biology of the Cell* 19 (9) (September 1): 3823–35. doi:10.1091/mbc.E08-11-1136.

Hasegawa, H, E Kiyokawa, S Tanaka, K Nagashima, N Gotoh, M Shibuya, T Kurata, and M Matsuda. 1996. “DOCK180, a Major CRK-Binding Protein, Alters Cell Morphology upon Translocation to the Cell Membrane.” *Molecular and Cellular Biology* 16 (4) (April 1): 1770–6.

- Hinton, Robert, and Katherine Yutzey. 2011. "Heart Valve Structure and Function in Development and Disease." *Physiology* 73 (1): 29–46. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142145.
- Huang, Peng, Zuoyan Zhu, Shuo Lin, and Bo Zhang. 2012. "Reverse Genetic Approaches in Zebrafish." *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 39 (9): 421–33. doi:10.1016/j.jgg.2012.07.004.
- Hubmacher, Dirk, Lauren W Wang, Robert P Mecham, Dieter P Reinhardt, and Suneel S Apte. 2015. "Adamts12 Deletion Results in Bronchial Fibrillin Microfibril Accumulation and Bronchial Epithelial Dysplasia - a Novel Mouse Model Providing Insights into Geleophysic Dysplasia." *Disease Models & Mechanisms* 8 (5) (May 5): 487–99. doi:10.1242/dmm.017046.
- Hurlstone, Adam F, Anna-Pavlina G P Haramis, Erno Wienholds, Harry Begthel, Jeroen Korving, Fredericus Van Eeden, Edwin Cuppen, Danica Zivkovic, Ronald H Plasterk, and Hans Clevers. 2003. "The Wnt/beta-Catenin Pathway Regulates Cardiac Valve Formation." *Nature* 425 (6958) (October 4): 633–7. doi:10.1038/nature02028.
- International HapMap Consortium. 2004. "The International HapMap Project." *Nature* 426 (6968): 789–96. doi:10.1038/nature02168.
- International Human Genome Sequencing Consortium Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431:931–45.
- Inui, Masafumi, Andrea Manfrin, Anant Mamidi, Graziano Martello, Leonardo Morsut, Sandra Soligo, Elena Enzo, et al. 2011. "USP15 Is a Deubiquitylating Enzyme for Receptor-Activated SMADs." *Nature Cell Biology* 13 (11): 1368–1375. doi:10.1038/ncb2346.
- Ionita-Laza, Iuliana, Vlad Makarov, and Joseph D Buxbaum. 2012. "Scan-Statistic Approach Identifies Clusters of Rare Disease Variants in LRP2, a Gene Linked and Associated with Autism Spectrum Disorders, in Three Datasets." *American Journal of Human Genetics* 90 (6) (June 5): 1002–13. doi:10.1016/j.ajhg.2012.04.010.
- Istrail, Sorin, Granger G Sutton, Liliana Florea, Aaron L Halpern, Clark M Mobarry, Ross Lippert, Brian Walenz, et al. 2004. "Whole-Genome Shotgun Assembly and Comparison of Human Genome Assemblies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7) (February 2): 1916–21. doi:10.1073/pnas.0307971100.
- Iung, Bernard, Gabriel Baron, Eric Butchart, François Delahaye, Christa Gohlke-Bärwolf, Olaf Levang, Pilar Tornos, et al. 2003. "A Prospective Survey of Patients with Valvular Heart Disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease." *European Heart Journal* 24 (13): 1231–43. doi:10.1016/S0195-668X(03)00201-X.
- Johnson, Karl G, Alan P Tenney, Aurnab Ghose, April M Duckworth, Misao E Higashi, Karen Parfitt, Oana Marcu, et al. 2006. "The HSPGs Syndecan and Dallylike Bind the Receptor Phosphatase LAR and Exert Distinct Effects on Synaptic Development." *Neuron* 49 (4) (February 4): 517–31. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.026.

- Kaartinen, Vesa, and David Warburton. 2003. "Fibrillin Controls TGF-Beta Activation." *Nature Genetics* 33 (3) (March 6): 331–2. doi:10.1038/ng0303-331.
- Kalluri, Raghu, and Robert A Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6) (June 1): 1420–8. doi:10.1172/JCI39104.
- Karolchik, D, R Baertsch, M Diekhans, T S Furey, A Hinrichs, Y T Lu, K M Roskin, et al. 2003. "The UCSC Genome Browser Database." *Nucleic Acids Research* 31 (1) (January 3): 51–4.
- Kavsak, P, R K Rasmussen, C G Causing, S Bonni, H Zhu, G H Thomsen, and J L Wrana. 2000. "Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase That Targets the TGF Beta Receptor for Degradation." *Molecular Cell* 6 (6) (December 5): 1365–75.
- Kent, W J, Charles W Sugnet, Terrence S Furey, Krishna M Roskin, Tom H Pringle, Alan M Zahler, and David Haussler. 2002. "The Human Genome Browser at UCSC." *Genome Research* 12 (6) (June 6): 996–1006. doi:10.1101/gr.229102. Article published online before print in May 2002.
- Keogh, R J. 2010. "New Technology for Investigating Trophoblast Function." *Placenta* 31 (4) (April 4): 347–50. doi:10.1016/j.placenta.2010.02.008.
- Kinzler, K W, M C Nilbert, L K Su, B Vogelstein, T M Bryan, D B Levy, K J Smith, A C Preisinger, P Hedge, and D McKechnie. 1991. "Identification of FAP Locus Genes from Chromosome 5q21." *Science (New York, N.Y.)* 253 (5020): 661–5.
- Kirby, M L, T F Gale, and D E Stewart. 1983. "Neural Crest Cells Contribute to Normal Aorticopulmonary Septation." *Science (New York, N.Y.)* 220 (4601) (June 5): 1059–61.
- Klein, Robert J, Caroline Zeiss, Emily Y Chew, Jen-Yue Y Tsai, Richard S Sackler, Chad Haynes, Alice K Henning, et al. 2005. "Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration." *Science (New York, N.Y.)* 308 (5720) (April 5): 385–9. doi:10.1126/science.1109557.
- Kolpa, Heather J, David S Peal, Stacey N Lynch, Andrea C Giokas, Shibnath Ghatak, Suniti Misra, Russell A Norris, et al. 2013. "miR-21 Represses Pcd4 during Cardiac Valvulogenesis." *Development (Cambridge, England)* 140 (10): 2172–80. doi:10.1242/dev.084475.
- Kruithof, Boudewijn, Sjoerd Duim, Asja Moerkamp, and Marie-José Goumans. 2012. "TGF² and BMP Signaling in Cardiac Cushion Formation: Lessons from Mice and Chicken." *Differentiation* 84 (1): 89102. doi:10.1016/j.diff.2012.04.003.
- Kumar, R K, and R Tandon. 2013. "Rheumatic Fever & Rheumatic Heart Disease: The Last 50 Years." *The Indian Journal of Medical Research* 137 (4) (April 1): 643–58.
- Kyndt, F, J J Schott, J N Trochu, F Baranger, O Herbert, V Scott, E Fressinaud, et al. 1998. "Mapping of X-Linked Myxomatous Valvular Dystrophy to Chromosome Xq28." *American Journal of Human Genetics* 62 (3): 627–32. doi:10.1086/301747.

- Kyndt, Florence, Jean-Pierre Gueffet, Vincent Probst, Philippe Jaafar, Antoine Legendre, Françoise Bouffant, Claire Toquet, et al. 2007. “Mutations in the Gene Encoding Filamin A as a Cause for Familial Cardiac Valvular Dystrophy.” *Circulation* 115 (1): 40–49. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.622621.
- Laish-Farkash, Avishag, Michael Glikson, Dovrat Brass, Dina Marek-Yagel, Elon Pras, Nathan Dascal, Charles Antzelevitch, et al. 2010. “A Novel Mutation in the HCN4 Gene Causes Symptomatic Sinus Bradycardia in Moroccan Jews.” *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 21 (12) (December 3): 1365–72. doi:10.1111/j.1540-8167.2010.01844.x.
- Lander, E S, L M Linton, B Birren, C Nusbaum, M C Zody, J Baldwin, K Devon, et al. 2001. “Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome.” *Nature* 409 (6822): 860–921. doi:10.1038/35057062.
- Latif, N, P Sarathchandra, P M Taylor, J Antoniow, N Brand, and M H Yacoub. 2006. “Characterization of Molecules Mediating Cell-Cell Communication in Human Cardiac Valve Interstitial Cells.” *Cell Biochemistry and Biophysics* 45 (3): 255–64. doi:10.1385/CBB:45:3:255.
- Latif, Najma, Padmini Sarathchandra, Patricia M Taylor, Joseph Antoniow, and Magdi H Yacoub. 2005. “Localization and Pattern of Expression of Extracellular Matrix Components in Human Heart Valves.” *The Journal of Heart Valve Disease* 14 (2): 218–27.
- Laurent-Puig, P, C Bérout, and T Soussi. 1998. “APC Gene: Database of Germline and Somatic Mutations in Human Tumors and Cell Lines.” *Nucleic Acids Research* 26 (1): 269–70.
- Laurin, Mélanie, Nadine Fradet, Anne Blangy, Alan Hall, Kristiina Vuori, and Jean-François F Côté. 2008. “The Atypical Rac Activator Dock180 (Dock1) Regulates Myoblast Fusion in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (40) (October 2): 15446–51. doi:10.1073/pnas.0805546105.
- Lauriol, Jessica, Fabrice Jaffré, and Maria I Kontaridis. 2015. “The Role of the Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 in Cardiac Development and Disease.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 37 (January 4): 73–81. doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.013.
- Le Scouarnec, Solena, Naina Bhasin, Claude Vieyres, Thomas J Hund, Shane R Cunha, Olha Koval, Celine Marionneau, et al. 2008. “Dysfunction in Ankyrin-B-Dependent Ion Channel and Transporter Targeting Causes Human Sinus Node Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (40) (October 2): 15617–22. doi:10.1073/pnas.0805500105.
- Lencinas, Alejandro, André Tavares, Joey Barnett, and Raymond Runyan. 2011. “Collagen Gel Analysis of Epithelial Mesenchymal Transition in the Embryo Heart: An in Vitro Model System for the Analysis of Tissue Interaction, Signal Transduction, and Environmental Effects.” *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 93 (4): 298–311. doi:10.1002/bdrc.20222.

- Levine, R A, E Stathogiannis, J B Newell, P Harrigan, and A E Weyman. 1988. “Reconsideration of Echocardiographic Standards for Mitral Valve Prolapse: Lack of Association between Leaflet Displacement Isolated to the Apical Four Chamber View and Independent Echocardiographic Evidence of Abnormality.” *Journal of the American College of Cardiology* 11 (5) (May): 1010–9.
- Levine, Robert, and Susan Slaughaupt. 2007. “Molecular Genetics of Mitral Valve Prolapse.” *Current Opinion in Cardiology* 22 (3): 171. doi:10.1097/HCO.0b013e3280f3bfcd.
- Lewis, Tom, Simon Swift, John A Woolliams, and Sarah Blott. 2011. “Heritability of Premature Mitral Valve Disease in Cavalier King Charles Spaniels.” *Veterinary Journal (London, England : 1997)* 188 (1) (April 5): 73–6. doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.016.
- Li, Heng, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, and Richard Durbin. 2009. “The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (16) (August 6): 2078–9. doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
- Lindenbaum, Pierre, Solena Scouarnec, Vincent Portero, and Richard Redon. 2011. “Kntime4Bio: A Set of Custom Nodes for the Interpretation of next-Generation Sequencing Data with KNIME.” *Bioinformatics* 27 (22): 3200–3201. doi:10.1093/bioinformatics/btr554.
- Lindroos, M, M Kupari, J Heikkilä, and R Tilvis. 1993. “Prevalence of Aortic Valve Abnormalities in the Elderly: An Echocardiographic Study of a Random Population Sample.” *Journal of the American College of Cardiology* 21 (5) (April 4): 1220–5.
- Lindsey, Stephanie E, Jonathan T Butcher, and Huseyin C Yalcin. 2014. “Mechanical Regulation of Cardiac Development.” *Frontiers in Physiology* 5: 318. doi:10.3389/fphys.2014.00318.
- Liu, A C, and A I Gotlieb. 2007a. “Characterization of Cell Motility in Single Heart Valve Interstitial Cells in Vitro.” *Histology and Histopathology* 22 (8): 873–82.
- Loeys, Bart L, Junji Chen, Enid R Neptune, Daniel P Judge, Megan Podowski, Tammy Holm, Jennifer Meyers, et al. 2005. “A Syndrome of Altered Cardiovascular, Craniofacial, Neurocognitive and Skeletal Development Caused by Mutations in TGFBR1 or TGFBR2.” *Nature Genetics* 37 (3): 275–81. doi:10.1038/ng1511.
- Loirand, Gervaise, Vincent Sauzeau, and Pierre Pacaud. 2013. “Small G Proteins in the Cardiovascular System: Physiological and Pathological Aspects.” *Physiological Reviews* 93 (4) (October 2): 1659–720. doi:10.1152/physrev.00021.2012.
- Lumiaho, A, R Ikäheimo, R Miettinen, L Niemitukia, T Laitinen, A Rantala, E Lampainen, M Laakso, and J Hartikainen. 2002. “Mitral Valve Prolapse and Mitral Regurgitation Are Common in Patients with Polycystic Kidney Disease Type 1.” *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation* 38 (6): 1208–16. doi:10.1053/ajkd.2001.29216.
- Luna-Zurita, Luis, Belén Prados, Joaquim Grego-Bessa, Guillermo Luxán, Gonzalo Monte, Alberto Benguría, Ralf Adams, José Pérez-Pomares, and José Pompa. 2010. “Integration of a Notch-Dependent Mesenchymal Gene Program and Bmp2-Driven Cell Invasiveness

Regulates Murine Cardiac Valve Formation.” *Journal of Clinical Investigation* 120 (10): 34933507. doi:10.1172/JCI42666.

Ma, Lijiang, Mei-Fang Lu, Robert Schwartz, and James Martin. 2005. “Bmp2 Is Essential for Cardiac Cushion Epithelial-Mesenchymal Transition and Myocardial Patterning.” *Development* 132 (24): 5601–5611. doi:10.1242/dev.02156.

MacGrogan, Donal, Guillermo Luxán, Anita Driessen-Mol, Carlijn Bouten, Frank Baaijens, and José de la Pompa. 2014. “How to Make a Heart Valve: From Embryonic Development to Bioengineering of Living Valve Substitutes.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4 (11): a013912. doi:10.1101/cshperspect.a013912.

MacPherson, Matthew, and Susanna C Fagerholm. 2010. “Filamin and Filamin-Binding Proteins in Integrin-Regulation and Adhesion. Focus on: ‘FilaminA Is Required for Vimentin-Mediated Cell Adhesion and Spreading’.” *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 298 (2) (February 1): C206–8. doi:10.1152/ajpcell.00505.2009.

Madsen, Majbritt B, Lisbeth H Olsen, Jens Häggström, Katja Höglund, Ingrid Ljungvall, Torkel Falk, Gerhard Wess, et al. 2011. “Identification of 2 Loci Associated with Development of Myxomatous Mitral Valve Disease in Cavalier King Charles Spaniels.” *The Journal of Heredity* 102 Suppl 1 (January 6): S62–7. doi:10.1093/jhered/esr041.

Maher, Brendan. 2008. “Personal Genomes: The Case of the Missing Heritability.” *Nature* 456 (7218) (November 4): 18–21. doi:10.1038/456018a.

Malhotra, Gautam K, Xiangshan Zhao, Hamid Band, and Vimla Band. 2011. “Shared Signaling Pathways in Normal and Breast Cancer Stem Cells.” *Journal of Carcinogenesis* 10 (January 6): 38. doi:10.4103/1477-3163.91413.

Manolio, Teri, Francis Collins, Nancy Cox, David Goldstein, Lucia Hindorff, David Hunter, Mark McCarthy, et al. 2009. “Finding the Missing Heritability of Complex Diseases.” *Nature* 461 (7265): 747–753. doi:10.1038/nature08494.

Mao, Yaopan, Joanna Mulvaney, Sana Zakaria, Tian Yu, Katherine M Morgan, Steve Allen, M A Basson, Philippa Francis-West, and Kenneth D Irvine. 2011. “Characterization of a Dchs1 Mutant Mouse Reveals Requirements for Dchs1-Fat4 Signaling during Mammalian Development.” *Development (Cambridge, England)* 138 (5) (March 2): 947–57. doi:10.1242/dev.057166.

Margulies, Marcel, Michael Egholm, William E Altman, Said Attiya, Joel S Bader, Lisa A Bembien, Jan Berka, et al. 2005. “Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors.” *Nature* 437 (7057): 376–80. doi:10.1038/nature03959.

Markwald, Roger, Russell Norris, Ricardo Moreno-Rodriguez, and Robert Levine. 2010. “Developmental Basis of Adult Cardiovascular Diseases.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1188 (1): 177–183. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05098.x.

Matt, Peter, Jennifer Habashi, Thierry Carrel, Duke Cameron, Jennifer Eyk, and Harry Dietz. 2008. “Recent Advances in Understanding Marfan Syndrome: Should We Now Treat Surgical

Patients with Losartan?" *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 135 (2): 389394. doi:10.1016/j.jtcvs.2007.08.047.

McKenna, Aaron, Matthew Hanna, Eric Banks, Andrey Sivachenko, Kristian Cibulskis, Andrew Kernytsky, Kiran Garimella, et al. 2010. "The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce Framework for Analyzing next-Generation DNA Sequencing Data." *Genome Research* 20 (9) (September 3): 1297–303. doi:10.1101/gr.107524.110.

McLaren, William, Bethan Pritchard, Daniel Rios, Yuan Chen, Paul Flicek, and Fiona Cunningham. 2010. "Deriving the Consequences of Genomic Variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor." *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (16): 2069–70. doi:10.1093/bioinformatics/btq330.

Mebazaa, A, E Mayoux, K Maeda, L D Martin, E G Lakatta, J L Robotham, and A M Shah. 1993. "Paracrine Effects of Endocardial Endothelial Cells on Myocyte Contraction Mediated via Endothelin." *The American Journal of Physiology* 265 (5 Pt 2): H1841–6.

Mercado-Pimentel, Melania E, and Raymond B Runyan. 2007. "Multiple Transforming Growth Factor-Beta Isoforms and Receptors Function during Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart." *Cells, Tissues, Organs* 185 (1-3) (January 1): 146–56. doi:10.1159/000101315.

Merryman, W D, Inchan Youn, Howard D Lukoff, Paula M Krueger, Farshid Guilak, Richard A Hopkins, and Michael S Sacks. 2006. "Correlation between Heart Valve Interstitial Cell Stiffness and Transvalvular Pressure: Implications for Collagen Biosynthesis." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 290 (1): H224–31. doi:10.1152/ajpheart.00521.2005.

Metzker, Michael L. 2010. "Sequencing Technologies - the next Generation." *Nature Reviews. Genetics* 11 (1) (January 5): 31–46. doi:10.1038/nrg2626.

Milanesi, Raffaella, Mirko Baruscotti, Tomaso Gneccchi-Ruscione, and Dario DiFrancesco. 2006. "Familial Sinus Bradycardia Associated with a Mutation in the Cardiac Pacemaker Channel." *The New England Journal of Medicine* 354 (2) (January 4): 151–7. doi:10.1056/NEJMoa052475.

Milano, Annalisa, Alexa M Vermeer, Elisabeth M Lodder, Julien Barc, Arie O Verkerk, Alex V Postma, Ivo A van der Bilt, et al. 2014. "HCN4 Mutations in Multiple Families with Bradycardia and Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy." *Journal of the American College of Cardiology* 64 (8) (August 2): 745–56. doi:10.1016/j.jacc.2014.05.045.

Miller, A B, E E Salcedo, and R C Bahler. 1975. "Prolapsed Mitral Valve Associated with the Holt-Oram Syndrome." *Chest* 67 (2): 230–2.

Mizuguchi, Takeshi, Gwenaëlle Collod-Beroud, Takushi Akiyama, Marianne Abifadel, Naoki Harada, Takayuki Morisaki, Delphine Allard, et al. 2004. "Heterozygous TGFB2 Mutations in Marfan Syndrome." *Nature Genetics* 36 (8) (August): 855–60. doi:10.1038/ng1392.

Mohler, E R, F Gannon, C Reynolds, R Zimmerman, M G Keane, and F S Kaplan. 2001. "Bone Formation and Inflammation in Cardiac Valves." *Circulation* 103 (11): 1522–8.

- Mohler, Peter J, Jonathan Q Davis, and Vann Bennett. 2005. "Ankyrin-B Coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca Exchanger, and InsP3 Receptor in a Cardiac T-tubule/SR Microdomain." *PLoS Biology* 3 (12) (December 4): e423. doi:10.1371/journal.pbio.0030423.
- Mohler, Peter J, Solena Le Scouarnec, Isabelle Denjoy, John S Lowe, Pascale Guicheney, Lise Caron, Iwona M Driskell, et al. 2007. "Defining the Cellular Phenotype of 'Ankyrin-B Syndrome' Variants: Human ANK2 Variants Associated with Clinical Phenotypes Display a Spectrum of Activities in Cardiomyocytes." *Circulation* 115 (4) (January 2): 432–41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.656512.
- Mohler, Peter J, Jean-Jacques J Schott, Anthony O Gramolini, Keith W Dilly, Silvia Guatimosim, William H duBell, Long-Sheng S Song, et al. 2003. "Ankyrin-B Mutation Causes Type 4 Long-QT Cardiac Arrhythmia and Sudden Cardiac Death." *Nature* 421 (6923) (February 4): 634–9. doi:10.1038/nature01335.
- Mohler, Peter J, Igor Splawski, Carlo Napolitano, Georgia Bottelli, Leah Sharpe, Katherine Timothy, Silvia G Priori, Mark T Keating, and Vann Bennett. 2004. "A Cardiac Arrhythmia Syndrome Caused by Loss of Ankyrin-B Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (24) (June 2): 9137–42. doi:10.1073/pnas.0402546101.
- Monteleone, P L, and L F Fagan. 1969. "Possible X-Linked Congenital Heart Disease." *Circulation* 39 (5): 611–4.
- Moore, Catherine A, Caroline A Parkin, Yannick Bidet, and Philip W Ingham. 2007. "A Role for the Myoblast City Homologues Dock1 and Dock5 and the Adaptor Proteins Crk and Crk-like in Zebrafish Myoblast Fusion." *Development (Cambridge, England)* 134 (17) (September 6): 3145–53. doi:10.1242/dev.001214.
- Morgenthaler, Stephan, and William G Thilly. 2007. "A Strategy to Discover Genes That Carry Multi-Allelic or Mono-Allelic Risk for Common Diseases: A Cohort Allelic Sums Test (CAST)." *Mutation Research* 615 (1-2) (February 6): 28–56. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.09.003.
- Mortazavi, Ali, Brian A Williams, Kenneth McCue, Lorian Schaeffer, and Barbara Wold. 2008. "Mapping and Quantifying Mammalian Transcriptomes by RNA-Seq." *Nature Methods* 5 (7) (July 2): 621–8. doi:10.1038/nmeth.1226.
- Moser, A R, A R Shoemaker, C S Connelly, L Clipson, K A Gould, C Luongo, W F Dove, P H Siggers, and R L Gardner. 1995. "Homozygosity for the Min Allele of Apc Results in Disruption of Mouse Development prior to Gastrulation." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 203 (4): 422–33. doi:10.1002/aja.1002030405.
- Moskowitz, Ivan P, Jun Wang, Michael A Peterson, William T Pu, Alexander C Mackinnon, Leif Oxburgh, Gerald C Chu, et al. 2011. "Transcription Factor Genes Smad4 and Gata4 Cooperatively Regulate Cardiac Valve Development. [corrected]." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (10) (March 2): 4006–11. doi:10.1073/pnas.1019025108.

- Müller, T, A Choidas, E Reichmann, and A Ullrich. 1999. "Phosphorylation and Free Pool of Beta-Catenin Are Regulated by Tyrosine Kinases and Tyrosine Phosphatases during Epithelial Cell Migration." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (15) (April 5): 10173–83.
- Nakamura, Fumihiko, Thomas P Stossel, and John H Hartwig. 2011. "The Filamins: Organizers of Cell Structure and Function." *Cell Adhesion & Migration* 5 (2): 160–9.
- Nataatmadja, Maria, Jennifer West, and Malcolm West. 2006. "Overexpression of Transforming Growth Factor-Beta Is Associated with Increased Hyaluronan Content and Impairment of Repair in Marfan Syndrome Aortic Aneurysm." *Circulation* 114 (1 Suppl) (July 2): I371–7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000927.
- Neptune, Enid R, Pamela A Frischmeyer, Dan E Arking, Loretha Myers, Tracie E Bunton, Barbara Gayraud, Francesco Ramirez, Lynn Y Sakai, and Harry C Dietz. 2003. "Dysregulation of TGF-Beta Activation Contributes to Pathogenesis in Marfan Syndrome." *Nature Genetics* 33 (3) (March 6): 407–11. doi:10.1038/ng1116.
- Nesta, Francesca, Maire Leyne, Chaim Yosefy, Charles Simpson, Daisy Dai, Jane Marshall, Judy Hung, Susan Slaughaupt, and Robert Levine. 2005. "New Locus for Autosomal Dominant Mitral Valve Prolapse on Chromosome 13: Clinical Insights From Genetic Studies." *Circulation* 112 (13): 2022–2030. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516930.
- Ng, Connie M, Alan Cheng, Loretha A Myers, Francisco Martinez-Murillo, Chunfa Jie, Djahida Bedja, Kathleen L Gabrielson, et al. 2005. "TGF-Beta-Dependent Pathogenesis of Mitral Valve Prolapse in a Mouse Model of Marfan Syndrome." *The Journal of Clinical Investigation* 114 (11): 1586–92. doi:10.1172/JCI22715.
- Ng, Sarah B, Emily H Turner, Peggy D Robertson, Steven D Flygare, Abigail W Bigham, Choli Lee, Tristan Shaffer, et al. 2009. "Targeted Capture and Massively Parallel Sequencing of 12 Human Exomes." *Nature* 461 (7261) (September 4): 272–6. doi:10.1038/nature08250.
- Nichols, Melanie, Nick Townsend, Peter Scarborough, and Mike Rayner. 2014. "Cardiovascular Disease in Europe 2014: Epidemiological Update." *European Heart Journal* 35 (42): 2929. doi:10.1093/eurheartj/ehu378.
- Nishimura, Rick A, Catherine M Otto, Robert O Bonow, Blase A Carabello, John P Erwin, Robert A Guyton, Patrick T O’Gara, et al. 2014. "2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." *Circulation* 129 (23) (June 2): 2440–92. doi:10.1161/CIR.0000000000000029.
- Nkomo, Vuyisile, Julius Gardin, Thomas Skelton, John Gottdiener, Christopher Scott, and Maurice Enriquez-Sarano. 2006. "Burden of Valvular Heart Diseases: A Population-Based Study." *Lancet (London, England)* 368 (9540): 1005–11. doi:10.1016/S0140-6736(06)69208-8.
- Nof, Eyal, David Luria, Dovrat Brass, Dina Marek, Hadas Lahat, Haya Reznik-Wolf, Elon Pras, Nathan Dascal, Michael Eldar, and Michael Glikson. 2007. "Point Mutation in the

- HCN4 Cardiac Ion Channel Pore Affecting Synthesis, Trafficking, and Functional Expression Is Associated with Familial Asymptomatic Sinus Bradycardia.” *Circulation* 116 (5) (July 2): 463–70. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706887.
- Nolan, K M, K Barrett, Y Lu, K Q Hu, S Vincent, and J Settleman. 1998. “Myoblast City, the Drosophila Homolog of DOCK180/CED-5, Is Required in a Rac Signaling Pathway Utilized for Multiple Developmental Processes.” *Genes & Development* 12 (21) (November): 3337–42. doi:10.1101/gad.12.21.3337.
- Norris, R A, R Moreno-Rodriguez, A Wessels, J Merot, P Bruneval, A H Chester, M H Yacoub, et al. 2010. “Expression of the Familial Cardiac Valvular Dystrophy Gene, Filamin-A, during Heart Morphogenesis.” *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* 239 (7) (July 4): 2118–27. doi:10.1002/dvdy.22346.
- Olsen, L H, M Fredholm, and H D Pedersen. 1999. “Epidemiology and Inheritance of Mitral Valve Prolapse in Dachshunds.” *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 13 (5) (January 5): 448–56.
- Pannu, Hariyadarshi, Van T Fadulu, Jessica Chang, Andrea Lafont, Sumera N Hasham, Elizabeth Sparks, Philip F Giampietro, et al. 2005. “Mutations in Transforming Growth Factor-Beta Receptor Type II Cause Familial Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections.” *Circulation* 112 (4): 513–20. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537340.
- Peal, David S, Stacey N Lynch, and David J Milan. 2012. “Patterning and Development of the Atrioventricular Canal in Zebrafish.” *Journal of Cardiovascular Translational Research* 4 (6): 720–6. doi:10.1007/s12265-011-9313-z.
- Pedersen, H D, and J Häggström. 2000. “Mitral Valve Prolapse in the Dog: A Model of Mitral Valve Prolapse in Man.” *Cardiovascular Research* 47 (2) (August 2): 234–43.
- Pedersen, H D, K A Lorentzen, and B O Kristensen. 1999. “Echocardiographic Mitral Valve Prolapse in Cavalier King Charles Spaniels: Epidemiology and Prognostic Significance for Regurgitation.” *The Veterinary Record* 144 (12) (March 6): 315–20.
- Pentikäinen, Ulla, and Jari Yläne. 2009. “The Regulation Mechanism for the Auto-Inhibition of Binding of Human Filamin A to Integrin.” *Journal of Molecular Biology* 393 (3) (October 5): 644–57. doi:10.1016/j.jmb.2009.08.035.
- Pereira, L, K Andrikopoulos, J Tian, S Y Lee, D R Keene, R Ono, D P Reinhardt, et al. 1997. “Targetting of the Gene Encoding Fibrillin-1 Recapitulates the Vascular Aspect of Marfan Syndrome.” *Nature Genetics* 17 (2) (October 3): 218–22. doi:10.1038/ng1097-218.
- Pereira, L, S Y Lee, B Gayraud, K Andrikopoulos, S D Shapiro, T Bunton, N J Biery, H C Dietz, L Y Sakai, and F Ramirez. 1999. “Pathogenetic Sequence for Aneurysm Revealed in Mice Underexpressing Fibrillin-1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7) (March 2): 3819–23.
- Pfaff, M, S Liu, D J Erle, and M H Ginsberg. 1998. “Integrin Beta Cytoplasmic Domains Differentially Bind to Cytoskeletal Proteins.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (11) (March 5): 6104–9.

- Probst, Vincent, Arthur A Wilde, Julien Barc, Frederic Sacher, Dominique Babuty, Philippe Mabo, Jacques Mansourati, et al. 2009. “SCN5A Mutations and the Role of Genetic Background in the Pathophysiology of Brugada Syndrome.” *Circulation. Cardiovascular Genetics* 2 (6) (December 2): 552–7. doi:10.1161/CIRCGENETICS.109.853374.
- Prunier, Fabrice, Gwenola Terrien, Yannick Le Corre, Ailea L Apana, Loïc Bière, Gilles Kauffenstein, Alain Furber, et al. 2013. “Pseudoxanthoma Elasticum: Cardiac Findings in Patients and Abcc6-Deficient Mouse Model.” *PloS One* 8 (7): e68700. doi:10.1371/journal.pone.0068700.
- Qian, Xiaolan, Guorong Li, Holly K Asmussen, Laura Asnagli, William C Vass, Richard Braverman, Kenneth M Yamada, Nicholas C Popescu, Alex G Papageorge, and Douglas R Lowy. 2007. “Oncogenic Inhibition by a Deleted in Liver Cancer Gene Requires Cooperation between Tensin Binding and Rho-Specific GTPase-Activating Protein Activities.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (21) (May 2): 9012–7. doi:10.1073/pnas.0703033104.
- Rabkin, E, M Aikawa, J R Stone, Y Fukumoto, P Libby, and F J Schoen. 2001. “Activated Interstitial Myofibroblasts Express Catabolic Enzymes and Mediate Matrix Remodeling in Myxomatous Heart Valves.” *Circulation* 104 (21) (November 2): 2525–32.
- Raeker, Maide Ö, and Mark W Russell. 2011. “Obscurin Depletion Impairs Organization of Skeletal Muscle in Developing Zebrafish Embryos.” *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011 (January 6): 479135. doi:10.1155/2011/479135.
- Rasheed, S, W A Nelson-Rees, E M Toth, P Arnstein, and M B Gardner. 1974. “Characterization of a Newly Derived Human Sarcoma Cell Line (HT-1080).” *Cancer* 33 (4) (April 1): 1027–33.
- Rath, Nibedita, Zhishan Wang, Min M Lu, and Edward E Morrissey. 2005. “LMCD1/Dyxin Is a Novel Transcriptional Cofactor That Restricts GATA6 Function by Inhibiting DNA Binding.” *Molecular and Cellular Biology* 25 (20) (October 6): 8864–73. doi:10.1128/MCB.25.20.8864-8873.2005.
- Rauen, Katherine. 2012. “The RASopathies.” *Genomics and Human Genetics* 14 (1): 355–369. doi:10.1146/annurev-genom-091212-153523.
- Reich, D E, and E S Lander. 2001. “On the Allelic Spectrum of Human Disease.” *Trends in Genetics : TIG* 17 (9) (September 6): 502–10.
- Robaei, Daniel, Thomas Ford, and Sze-Yuan Y Ooi. 2015. “Ankyrin-B Syndrome: A Case of Sinus Node Dysfunction, Atrial Fibrillation and Prolonged QT in a Young Adult.” *Heart, Lung & Circulation* 24 (2) (February): e31–4. doi:10.1016/j.hlc.2014.09.013.
- Robertson, Stephen P. 2005. “Filamin A: Phenotypic Diversity.” *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (3) (June 3): 301–7. doi:10.1016/j.gde.2005.04.001.
- Robson, Andrew, Kathleen R Allinson, Robert H Anderson, Deborah J Henderson, and Helen M Arthur. 2010. “The TGF β Type II Receptor Plays a Critical Role in the Endothelial Cells

during Cardiac Development.” *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 239 (9) (September 3): 2435–42. doi:10.1002/dvdy.22376.

Ross, Sarah E, Alejandra E McCord, Cynthia Jung, Denize Atan, Stephanie I Mok, Martin Hemberg, Tae-Kyung K Kim, et al. 2012. “Bhlhb5 and Prdm8 Form a Repressor Complex Involved in Neuronal Circuit Assembly.” *Neuron* 73 (2) (January 4): 292–303. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.035.

Rubinfeld, B, I Albert, E Porfiri, C Fiol, S Munemitsu, and P Polakis. 1996. “Binding of GSK3beta to the APC-Beta-Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly.” *Science (New York, N.Y.)* 272 (5264): 1023–6.

Sacks, Michael S, and Ajit P Yoganathan. 2007. “Heart Valve Function: A Biomechanical Perspective.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 362 (1484) (August 3): 1369–91. doi:10.1098/rstb.2007.2122.

Saintigny, Gaëlle, François-Xavier X Bernard, Franck Juchaux, Nathalie Pedretti, and Christian Mahé. 2008. “Reduced Expression of the Adhesion Protein tensin1 in Cultured Human Dermal Fibroblasts Affects Collagen Gel Contraction.” *Experimental Dermatology* 17 (9) (September 1): 788–9. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00707.x.

Sanematsu, Fumiyuki, Masanori Hirashima, Mélanie Laurin, Ryosuke Takii, Akihiko Nishikimi, Keiko Kitajima, Guo Ding, et al. 2010. “DOCK180 Is a Rac Activator That Regulates Cardiovascular Development by Acting Downstream of CXCR4.” *Circulation Research* 107 (9) (October 5): 1102–5. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223388.

Sasaki, A, Y Masuda, Y Ohta, K Ikeda, and K Watanabe. 2001. “Filamin Associates with Smads and Regulates Transforming Growth Factor-Beta Signaling.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (21) (May 5): 17871–7. doi:10.1074/jbc.M008422200.

Sauls, Kimberly, Annemarieke de Vlaming, Brett S Harris, Katherine Williams, Andy Wessels, Robert A Levine, Susan A Slaugenhaupt, et al. 2012. “Developmental Basis for Filamin-A-Associated Myxomatous Mitral Valve Disease.” *Cardiovascular Research* 96 (1) (October 1): 109–19. doi:10.1093/cvr/cvs238.

Schaapveld, R Q, J T Schepens, G W Robinson, J Attema, F T Oerlemans, J A Fransen, M Streuli, B Wieringa, L Hennighausen, and W J Hendriks. 1997. “Impaired Mammary Gland Development and Function in Mice Lacking LAR Receptor-like Tyrosine Phosphatase Activity.” *Developmental Biology* 188 (1) (August 5): 134–46. doi:10.1006/dbio.1997.8630.

Schoen, Frederick J. 2008. “Evolving Concepts of Cardiac Valve Dynamics: The Continuum of Development, Functional Structure, Pathobiology, and Tissue Engineering.” *Circulation* 118 (18) (October 2): 1864–80. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805911.

Schott, J J, F Charpentier, S Peltier, P Foley, E Drouin, J B Bouhour, P Donnelly, G Vergnaud, L Bachner, and J P Moisan. 1995. “Mapping of a Gene for Long QT Syndrome to Chromosome 4q25-27.” *American Journal of Human Genetics* 57 (5) (November 3): 1114–22.

- Scrace, Simon, Eric O'Neill, Ester M Hammond, and Isabel M Pires. 2013. "Use of the xCELLigence System for Real-Time Analysis of Changes in Cellular Motility and Adhesion in Physiological Conditions." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1046 (January 2): 295–306. doi:10.1007/978-1-62703-538-5_17.
- Serfass, Pierre, Valérie Chetboul, Carolina C Sampedrano, Audrey Nicolle, Thierry Benalloul, Hervé Laforge, Christophe Gau, Carole Hébert, Jean-Louis L Pouchelon, and Renaud Tissier. 2006. "Retrospective Study of 942 Small-Sized Dogs: Prevalence of Left Apical Systolic Heart Murmur and Left-Sided Heart Failure, Critical Effects of Breed and Sex." *Journal of Veterinary Cardiology: The Official Journal of the European Society of Veterinary Cardiology* 8 (1) (May 1): 11–8. doi:10.1016/j.jvc.2005.10.001.
- Shi, Jianxin, Douglas F Levinson, Jubao Duan, Alan R Sanders, Yonglan Zheng, Itsik Pe'er, Frank Dudbridge, et al. 2009. "Common Variants on Chromosome 6p22.1 Are Associated with Schizophrenia." *Nature* 460 (7256) (August 4): 753–7. doi:10.1038/nature08192.
- Shirai, Manabu, Kyoko Imanaka-Yoshida, Michael D Schneider, Robert J Schwartz, and Takayuki Morisaki. 2009. "T-Box 2, a Mediator of Bmp-Smad Signaling, Induced Hyaluronan Synthase 2 and Tgfbeta2 Expression and Endocardial Cushion Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44) (November 2): 18604–9. doi:10.1073/pnas.0900635106.
- Sieber, O M, I P Tomlinson, and H Lamlum. 2001. "The Adenomatous Polyposis Coli (APC) Tumour Suppressor--Genetics, Function and Disease." *Molecular Medicine Today* 6 (12): 462–9.
- Sliwa, Karen, Melinda Carrington, Bongani M Mayosi, Elias Zigiriadis, Robert Mvungi, and Simon Stewart. 2010. "Incidence and Characteristics of Newly Diagnosed Rheumatic Heart Disease in Urban African Adults: Insights from the Heart of Soweto Study." *European Heart Journal* 31 (6) (March 1): 719–27. doi:10.1093/eurheartj/ehp530.
- Smits, Jeroen P P, Tamara T Koopmann, Ronald Wilders, Marieke W Veldkamp, Tobias Opthof, Zahir A Bhuiyan, Marcel M A M Mannens, et al. 2005. "A Mutation in the Human Cardiac Sodium Channel (E161K) Contributes to Sick Sinus Syndrome, Conduction Disease and Brugada Syndrome in Two Families." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (6) (June 3): 969–81. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.02.024.
- Song, Lanying, Yunhong Li, Kai Wang, and Chengji J Zhou. 2010. "Cardiac Neural Crest and Outflow Tract Defects in Lrp6 Mutant Mice." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 239 (1) (January 5): 200–10. doi:10.1002/dvdy.22079.
- Stanescu, Horia C, Mauricio Arcos-Burgos, Alan Medlar, Detlef Bockenhauer, Anna Kottgen, Liviu Dragomirescu, Catalin Voinescu, et al. 2011. "Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 Alleles in Idiopathic Membranous Nephropathy." *The New England Journal of Medicine* 364 (7) (February 4): 616–26. doi:10.1056/NEJMoa1009742.
- Stankunas, Kryn, Gene Ma, Frank Kuhnert, Calvin Kuo, and Ching-Pin Chang. 2010. "VEGF Signaling Has Distinct Spatiotemporal Roles during Heart Valve Development." *Developmental Biology* 347 (2). doi:10.1016/j.ydbio.2010.08.030.

- Stewart, Katherine, Noriko Uetani, Wiljan Hendriks, Michel L Tremblay, and Maxime Bouchard. 2013. “Inactivation of LAR Family Phosphatase Genes Ptpns and Ptpnf Causes Craniofacial Malformations Resembling Pierre-Robin Sequence.” *Development (Cambridge, England)* 140 (16) (August 4): 3413–22. doi:10.1242/dev.094532.
- Stosfel, T P, J Condeelis, L Cooley, J H Hartwig, A Noegel, M Schleicher, and S S Shapiro. 2001. “Filamins as Integrators of Cell Mechanics and Signalling.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (2) (February 4): 138–45. doi:10.1038/35052082.
- Strunnikova, N V, A Maminishkis, J J Barb, F Wang, C Zhi, Y Sergeev, W Chen, et al. 2010. “Transcriptome Analysis and Molecular Signature of Human Retinal Pigment Epithelium.” *Human Molecular Genetics* 19 (12) (June 2): 2468–86. doi:10.1093/hmg/ddq129.
- Swenson, L, J Häggström, C Kvarn, and R K Juneja. 1996. “Relationship between Parental Cardiac Status in Cavalier King Charles Spaniels and Prevalence and Severity of Chronic Valvular Disease in Offspring.” *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208 (12) (June 6): 2009–12.
- Tabiti, K, L Cui, V J Chhatwal, S Mochhala, S S Ngoi, and C J Pallen. 1996. “Novel Alternative Splicing Predicts a Secreted Extracellular Isoform of the Human Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase LAR.” *Gene* 175 (1-2) (October 4): 7–13.
- Tanoue, Takuji, and Masatoshi Takeichi. 2005. “New Insights into Fat Cadherins.” *Journal of Cell Science* 118 (Pt 11) (June 3): 2347–53. doi:10.1242/jcs.02398.
- Ten Dijke, Peter, and Caroline S Hill. 2004. “New Insights into TGF-Beta-Smad Signalling.” *Trends in Biochemical Sciences* 29 (5): 265–73. doi:10.1016/j.tibs.2004.03.008.
- Tetsu, O, and F McCormick. 1999. “Beta-Catenin Regulates Expression of Cyclin D1 in Colon Carcinoma Cells.” *Nature* 398 (6726): 422–6. doi:10.1038/18884.
- Thalji, Nassir M, Michael A Hagler, Heyu Zhang, Grace Casacang-Verzosa, Asha A Nair, Rakesh M Suri, and Jordan D Miller. 2015. “Nonbiased Molecular Screening Identifies Novel Molecular Regulators of Fibrogenic and Proliferative Signaling in Myxomatous Mitral Valve Disease.” *Circulation. Cardiovascular Genetics* 8 (3) (June 1): 516–28. doi:10.1161/CIRCGENETICS.114.000921.
- Thomas, Paul D, Michael J Campbell, Anish Kejariwal, Huaiyu Mi, Brian Karlak, Robin Daverman, Karen Diemer, Anushya Muruganujan, and Apurva Narechania. 2003. “PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function.” *Genome Research* 13 (9) (September 1): 2129–41. doi:10.1101/gr.772403.
- Thorvaldsdóttir, Helga, James Robinson, and Jill Mesirov. 2013. “Integrative Genomics Viewer (IGV): High-Performance Genomics Data Visualization and Exploration.” *Briefings in Bioinformatics* 14 (2): 178–192. doi:10.1093/bib/bbs017.
- Timmerman, Luika A, Joaquín Grego-Bessa, Angel Raya, Esther Bertrán, José M M Pérez-Pomares, Juan Díez, Sergi Aranda, et al. 2004. “Notch Promotes Epithelial-Mesenchymal

- Transition during Cardiac Development and Oncogenic Transformation.” *Genes & Development* 18 (1) (January 4): 99–115. doi:10.1101/gad.276304.
- Tisi, M A, Y Xie, T T Yeo, and F M Longo. 2000. “Downregulation of LAR Tyrosine Phosphatase Prevents Apoptosis and Augments NGF-Induced Neurite Outgrowth.” *Journal of Neurobiology* 42 (4) (March 3): 477–86.
- Towbin, Jeffrey. 1999. “Toward an Understanding of the Cause of Mitral Valve Prolapse.” *The American Journal of Human Genetics* 65 (5): 1238–41. doi:10.1086/302635.
- Trapnell, Cole, Adam Roberts, Loyal Goff, Geo Pertea, Daehwan Kim, David R Kelley, Harold Pimentel, Steven L Salzberg, John L Rinn, and Lior Pachter. 2012. “Differential Gene and Transcript Expression Analysis of RNA-Seq Experiments with TopHat and Cufflinks.” *Nature Protocols* 7 (3) (March 4): 562–78. doi:10.1038/nprot.2012.016.
- Tsuji, Shoji. 2010. “Genetics of Neurodegenerative Diseases: Insights from High-Throughput Resequencing.” *Human Molecular Genetics* 19 (R1): R65–R70. doi:10.1093/hmg/ddq162.
- Uetani, Noriko, Kristen Bertozzi, Melanie J Chagnon, Wiljan Hendriks, Michel L Tremblay, and Maxime Bouchard. 2009. “Maturation of Ureter-Bladder Connection in Mice Is Controlled by LAR Family Receptor Protein Tyrosine Phosphatases.” *The Journal of Clinical Investigation* 119 (4) (April 3): 924–35. doi:10.1172/JCI37196.
- Van der Linde, Denise, Ingrid M van de Laar, Aida M Bertoli-Avella, Rogier A Oldenburg, Jos A Bekkers, Francesco U Mattace-Raso, Anton H van den Meiracker, et al. 2012. “Aggressive Cardiovascular Phenotype of Aneurysms-Osteoarthritis Syndrome Caused by Pathogenic SMAD3 Variants.” *Journal of the American College of Cardiology* 60 (5): 397–403. doi:10.1016/j.jacc.2011.12.052.
- Van Lieshout, E M, I Van der Heijden, W J Hendriks, and C E Van der Zee. 2001. “A Decrease in Size and Number of Basal Forebrain Cholinergic Neurons Is Paralleled by Diminished Hippocampal Cholinergic Innervation in Mice Lacking Leukocyte Common Antigen-Related Protein Tyrosine Phosphatase Activity.” *Neuroscience* 102 (4) (January 1): 833–41.
- Venter, J C, M D Adams, E W Myers, P W Li, R J Mural, G G Sutton, H O Smith, et al. 2001. “The Sequence of the Human Genome.” *Science (New York, N.Y.)* 291 (5507) (February 5): 1304–51. doi:10.1126/science.1058040.
- Vesely, I. 1998. “The Role of Elastin in Aortic Valve Mechanics.” *Journal of Biomechanics* 31 (2): 115–23. doi:10.1016/S0021-9290(97)00122-X.
- Von Gise, Alexander, and William Pu. 2012. “Endocardial and Epicardial Epithelial to Mesenchymal Transitions in Heart Development and Disease.” *Circulation Research* 110 (12): 1628–45. doi:10.1161/circresaha.111.259960.
- Wan, Benjamin, Mohammad Rahnavardi, David H Tian, Kevin Phan, Stine Munkholm-Larsen, Paul G Bannon, and Tristan D Yan. 2013. “A Meta-Analysis of MitraClip System versus Surgery for Treatment of Severe Mitral Regurgitation.” *Annals of Cardiothoracic Surgery* 2 (6) (November 5): 683–92. doi:10.3978/j.issn.2225-319X.2013.11.02.

- Wang, Fang, Sean N Wolfson, Arash Gharib, and Alvaro Sagasti. 2012. "LAR Receptor Tyrosine Phosphatases and HSPGs Guide Peripheral Sensory Axons to the Skin." *Current Biology : CB* 22 (5) (March 2): 373–82. doi:10.1016/j.cub.2012.01.040.
- Wang, Huan, Leslie A Leinwand, and Kristi S Anseth. 2014. "Roles of Transforming Growth Factor- β 1 and OB-Cadherin in Porcine Cardiac Valve Myofibroblast Differentiation." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (10) (October 3): 4551–62. doi:10.1096/fj.14-254623.
- Wang, Jian, Ning Xu, Xinheng Feng, Ning Hou, JiShuai Zhang, Xuan Cheng, Yeguang Chen, Youyi Zhang, and Xiao Yang. 2005. "Targeted Disruption of Smad4 in Cardiomyocytes Results in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure." *Circulation Research* 97 (8) (October 5): 821–8. doi:10.1161/01.RES.0000185833.42544.06.
- Wang, X, L P Weng, and Q Yu. 2000. "Specific Inhibition of FGF-Induced MAPK Activation by the Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase LAR." *Oncogene* 19 (19) (May 4): 2346–53. doi:10.1038/sj.onc.1203558.
- WATSON, J D, and F H CRICK. 1953. "Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." *Nature* 171 (4356) (April 6): 737–8.
- Wicks, S J, T Grocott, K Haros, M Maillard, P ten Dijke, and A Chantry. 2006. "Reversible Ubiquitination Regulates the Smad/TGF-Beta Signalling Pathway." *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 5) (November 3): 761–3. doi:10.1042/BST0340761.
- Wong, R S, F M Follis, B K Shively, and J A Wernly. 1995. "Osteogenesis Imperfecta and Cardiovascular Diseases." *The Annals of Thoracic Surgery* 60 (5): 1439–43. doi:10.1016/0003-4975(95)00706-Q.
- Wu, Bingruo, Yidong Wang, Wendy Lui, Melissa Langworthy, Kevin Tompkins, Antonis Hatzopoulos, H. Baldwin, and Bin Zhou. 2011. "Nfatc1 Coordinates Valve Endocardial Cell Lineage Development Required for Heart Valve Formation." *Circulation Research* 109 (2): 183–192. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.245035.
- Wu, and Horvitz. 1998. "C. Elegans Phagocytosis and Cell-Migration Protein CED-5 Is Similar to Human DOCK180." *Nature* 392 (6675): 501–4. doi:10.1038/33163.
- Wu, Xin, Sekar Ramachandran, Miao-Chong Lin, Richard Cerione, and Jon Erickson. 2011. "A Minimal Rac Activation Domain in the Unconventional Guanine Nucleotide Exchange Factor Dock180." *Biochemistry* 50 (6): 1070–80. doi:10.1021/bi100971y.
- Wu, Y C, M C Tsai, L C Cheng, C J Chou, and N Y Weng. 2001. "C. Elegans CED-12 Acts in the Conserved crkII/DOCK180/Rac Pathway to Control Cell Migration and Cell Corpse Engulfment." *Developmental Cell* 1 (4) (October 1): 491–502.
- Yamada, Miho, Jean-Pierre Revelli, Gregor Eichele, Matt Barron, and Robert Schwartz. 2000. "Expression of Chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 Genes during Early Heart Development: Evidence for BMP2 Induction of Tbx2." *Developmental Biology* 228 (1). doi:10.1006/dbio.2000.9927.

- Yamazaki, Masahito, Shou Furuike, and Tadanao Ito. 2002. "Mechanical Response of Single Filamin A (ABP-280) Molecules and Its Role in the Actin Cytoskeleton." *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 23 (5-6) (January 2): 525–34.
- Yoder, Mervin C, Laura E Mead, Daniel Prater, Theresa R Krier, Karim N Mroueh, Fang Li, Rachel Krasich, Constance J Temm, Josef T Prchal, and David A Ingram. 2007. "Redefining Endothelial Progenitor Cells via Clonal Analysis and Hematopoietic Stem/progenitor Cell Principals." *Blood* 109 (5): 1801–9. doi:10.1182/blood-2006-08-043471.
- Zhang, J S, and F M Longo. 1995. "LAR Tyrosine Phosphatase Receptor: Alternative Splicing Is Preferential to the Nervous System, Coordinated with Cell Growth and Generates Novel Isoforms Containing Extensive CAG Repeats." *The Journal of Cell Biology* 128 (3) (February 3): 415–31.
- Zhou, Alex-Xianghua X, John H Hartwig, and Levent M Akyürek. 2010. "Filamins in Cell Signaling, Transcription and Organ Development." *Trends in Cell Biology* 20 (2) (February 1): 113–23. doi:10.1016/j.tcb.2009.12.001.
- Zhou, Xianghua, Jan Borén, and Levent M Akyürek. 2007. "Filamins in Cardiovascular Development." *Trends in Cardiovascular Medicine* 17 (7) (October 1): 222–9. doi:10.1016/j.tcm.2007.08.001.
- Zuppiroli, A, M J Roman, M O'Grady, and R B Devereux. 1998. "A Family Study of Anterior Mitral Leaflet Thickness and Mitral Valve Prolapse." *The American Journal of Cardiology* 82 (6): 823–6, A10.

Thèse de Doctorat

Antoine RIMBERT

Génétique et physiopathologie des dystrophies valvulaires mitrales non-syndromiques

Genetics and physiopathology of mitral non-syndromic valvular dystrophies

Résumé

Le prolapsus valvulaire mitral (PVM) est une pathologie cardiaque fréquente (2,5% de la population) et une cause majeure de chirurgie valvulaire. Le PVM peut être sporadique ou familial avec une forte implication de facteurs génétiques méconnus à ce jour.

Nous avons cherché à identifier de nouveaux gènes impliqués dans les formes familiales de PVM non-syndromique par des approches de séquençage nouvelle génération, de génotypage haut débit, de modèles cellulaires et animaux.

A partir d'analyses d'identité par descendance et de séquençage d'exome, nous avons identifié, grâce à l'étude de 18 familles, *APC*, *DOCK1*, *ANK2* et *PTPRF* (impliqués dans le remodelage du cytosquelette et dans les voies de la valvulogénèse) comme de nouveaux gènes responsables de PVM.

Nous avons ensuite développé un kit de séquençage ciblé pour les régions codantes de 78 gènes identifiés par séquençage d'exome ou candidats et l'avons utilisé pour 272 patients atteints de PVM.

Ainsi 4 variants rares non-synonymes ont été identifiés dans le gène *ARHGAP24* qui coségrègent au sein de familles atteintes de PVM de type dégénérescence fibro-élastique (FED). Les tests fonctionnels montrent que ces mutations sont des pertes de fonction.

Nous avons enfin identifié un enrichissement en variants rares dans des gènes impliqués dans la valvulogénèse grâce à des tests d'enrichissement comparant 272 patients PVM à des individus contrôles.

Ce travail identifie *ARHGAP24* comme le premier gène de PVM de type FED et suggère l'implication d'*APC*, *DOCK1*, *ANK2* et *PTPRF* dans le PVM de type Barlow. Les gènes identifiés ciblent des mécanismes clés de l'homéostasie de la VM, de la valvulogénèse et de la réponse au stress mécanique.

Mots clés

Prolapsus Valvulaire Mitral (PVM), Pathologie dégénérative, Génétique, Séquençage d'exome complet, Séquençage haut-débit de régions cibles, Stress mécanique, Cytosquelette.

Abstract

Mitral Valve Prolapse (MVP) is a common cardiac disease (2.5% of the general population) and is a leading cause for valve surgery. MVP can be sporadic or familial with a strong genetic background however its genetic background remains poorly understood.

Here we aim to identify new causative genes involved in the pathogenesis of familial non-syndromic MVP using Next Generation Sequencing, high throughput genotyping, cellular and animal models.

We first applied Whole Exome Sequencing and Identity By Descent analysis to identify genetic variations responsible for MVP in 18 affected families.

This approach identified *APC*, *DOCK1*, *ANK2* and *PTPRF* as new potential genes involved in key functions of MVP pathogenesis (cytoskeleton remodeling and developmental pathways).

Second, we have developed a custom kit to capture and sequence coding regions of 78 genes identified by exome sequencing or their likely implication in valve development and applied it to 272 MVP patients.

Among them, we identified four rare *ARHGAP24* missense variants which co-segregate with MVP in families. In vitro and in vivo experiments showed that all mutations are loss of function and lead to fibroelastic deficiency (FED) type of MVP.

Finally, we applied burden tests to test for a significant enrichment in rare coding variations (minor allele frequency <0.1%) compare to control individuals. Preliminary results identified enrichment in genes involved in valvulogenesis.

This work identifies *ARHGAP24* as the first gene for FED type of MVP and suggests *APC*, *DOCK1*, *ANK2* and *PTPRF* for Barlow type MVP. All genes target key mechanisms that modify MV homeostasis, valvulogenesis and mechanical stress adapted response.

Key Words

Mitral Valve Prolapse (MVP), Degenerative disease, Genetics, Whole Exome Sequencing, Targeted high-throughput sequencing, Mechanical stress, Cytoskeleton