

Thèse de Doctorat

Romain Bourcier

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie Santé*

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

Spécialité : *Génétique moléculaire*

Unité de recherche : *Institut du Thorax – Inserm UMR_1087*

Soutenue le 5 Septembre 2017

Thèse N° : 103971

Génétique et physiopathologie des formes familiales d'anévrismes intracrâniens

JURY

Président du jury :	Elisabeth TOURNIER LASSERVE, Directeur d'unité, UMR_740, CHU Lariboisière
Rapporteurs :	Charbel MOUNAYER, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Limoges Jean Baptiste MICHEL, Directeur de recherche, UMR_1148, CHU Bichat
Examineurs :	Anne JOUTEL, Directeur d'unité, UMR_740, CHU Lariboisière Gervaise LOIRAND, Directeur de recherche, UMR_1087, CHU de Nantes
Invité :	Gabriel RINKEL, Professeur des Universités, UMC Utrecht, Pays Bas
Directeur de Thèse :	Hubert DESAL, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	Richard REDON, Directeur d'unité, UMR_1087, CHU de Nantes

Remerciements :

Merci tout d'abord à Hubert Desal, chef de service de Neuroradiologie Diagnostique et Interventionnelle du CHU de Nantes, mon maître, pour le soutien qu'il me témoigne au quotidien.

Merci à Richard Redon, Directeur de l'unité INSERM 1087, pour m'avoir intégré au sein de l'équipe de génétique, pour son soutien au projet et pour avoir accepté de diriger cette thèse.

Merci à Gervaise Loirand pour son soutien au projet ICAN et pour ses conseils avisés.

Merci à Anne Joutel pour avoir accepté de prendre part à ce jury, pour ses encouragements tout au long de cette thèse.

Merci à Elisabeth Tournier-Lasserre pour avoir accepté de prendre part à ce jury.

Merci aux Prs. Charbel Mounayer et Jean-Baptiste Michel pour avoir accepté le rôle de rapporteur de cette thèse.

Merci au Pr.Rinkel pour sa présence et merci au Dr.Ruigrok pour avoir accepté de m'accueillir dans leur équipe en Novembre prochain.

Merci au Pr Hervé Le Marec pour avoir cru au projet dès le début et pour son enthousiasme.

Merci au Pr de Kersaint Gilly pour son soutien au début de ma carrière médicale.

Merci à Emmanuelle Bourcereau pour toute l'énergie qu'elle déploie pour ICAN.

Merci à Stéphanie Chatel pour son investissement pour le projet ICAN.

Merci beaucoup à Léa Ferrand pour son aide dans les démarches “administratives”, pour son enthousiasme et son dynamisme.

Merci à Solène Jouan et Aurélie Thollet pour leur aide dans ICAN.

Sans elles, ICAN n'existerait pas.

Merci à Stéphanie Bonnaud pour toutes les manip' de génet' réalisées, sa bonne humeur et son soutien.

Merci à Cédric Lenoble, Alexis Moles et Vincent L'allinec pour leur travail de Master 2 au sein du projet ICAN.

Un merci particulier à Antoine Rimbert pour l'ensemble de ses conseils, de ses enseignements et les bons moments partagés.

Merci à Matilde Karakachoff pour la réalisation du projet épidémio-génétique ainsi que pour son travail sur l'enrichissement des variations.

Merci à Pierre Lindenbaum pour la création des fichiers VCF.

Merci à Solena Le Scouarnec pour ses explications précises et son aide dans l'exploitation des données exomes.

Merci à Jade Violleau, Estelle Baron et Hadja el Adjouzi pour leur aide et leurs conseils durant mon Master 2.

Merci à Floriane Simonet et Christian Dina pour leur travail sur les IBD.

Merci à Sandrine Heurtebise-Chrétien et à Céline Menguy pour leur travail sur la fonction d'ANGPTL6.

Merci à Séverine Abramatic pour son aide dans la valorisation du projet ICAN.

Merci à Vimla Mayoura pour son aide dans la communication autour du projet ICAN.

Merci à Alban Gaignard pour son travail sur les données et méta données et pour tous les passionnants travaux à venir, j'en suis sûr.

Merci à mes collègues du service de Neuroradiologie Diagnostique et Interventionnelle du CHU de Nantes pour leur soutien et pour me laisser le temps de mener ces projets.

Merci à Gaëlle Balloy pour sa tentative de table des matières.

Merci aux co-investigateurs du projet ICAN pour leur participation à ce projet.

Merci à mes amis Thomas, Simon, Nicolas, Florent, Jimmy, Cédric, Naïla, Pierre Paul, Marie Céline, Marine, mes grands-parents et toute ma famille pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail.

Merci à ma sœur Justine et à Tom, un remerciement particulier pour la relecture du manuscrit

Merci à Stéphanie, ma femme et à mon fils Achille sans qui je n'aurais pas la force de faire ce travail.

Merci à Patrice, mon père pour m'avoir donné le goût de l'effort et l'envie de comprendre « comment ça marche » .

Merci à Anne Françoise, ma mère pour son soutien depuis le premier jour d'école jusqu'à aujourd'hui, tout cela c'est grâce à elle.

Avant-Propos

L'anévrisme intracrânien se rompt, saigne et tue sans prévenir un individu qui, jusqu'ici, allait bien. L'organisme humain, assimilé à un cosmos parfaitement agencé, est un équilibre parfait sur lequel les stoïciens s'étaient penchés pour poser les fondements d'une certaine médecine. Pourquoi cet organisme se désajuste-t-il à un endroit précis, d'une seconde à l'autre ?

Etrangement, c'est un évènement qui semble exclusivement toucher notre espèce. Cependant, et pour paraphraser Montaigne, ce n'est sans doute pas simplement notre «entière humaine condition» qui nous assujettit au risque anévrisimal. Pour peu que l'on choisisse réellement notre environnement, sommes-nous libres d'induire cet anévrisme ? Dans la vie comme dans les artères, rien ne se passe comme prévu et on ne peut opposer naïvement déterminisme et environnement.

En effet, le « tout génétique » et les espoirs suscités par l'explosion technologique de ces dernières années ne suffiront sans doute pas à répondre à ces questions. Depuis plus de 20 ans, des centaines de chercheurs traquent Le Gène des anévrismes intracrâniens, mais il semble que plusieurs gènes puissent être impliqués dans ce qu'il convient d'appeler une susceptibilité ou une fragilité. Toutefois, les histoires familiales que nous croisons dans notre métier, avec la charge émotionnelle qui les accompagnent, nous confèrent l'intime conviction que quelque chose se transmet.

à Yvonne Bourcier-Bossis

Abréviations :

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIC	Anévrisme Intracrânien
ARC	Attaché de Recherche Clinique
ARNm	Acide riboNucléique messenger
ATCD	Antécédents
CCTIRS	Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en Matière de Recherche dans le Domaine de la Santé
CEPIDC	Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CPP	Comité de Protection des Personnes
CRB	Centre des Ressources Biologiques
CRF	Case Report Form (cahier d'observation)
DIM	Département d'information médicale
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétique
GAIA	Génétique des formes familiales d'anévrismes intracrâniens (Projet)
GNEDS	Groupe Nantais d'Ethique dans le Domaine de la Santé
GWAS	Genomewide association study
HSA	Hémorragie sous-arachnoïdienne
HTA	Hypertension artérielle
IBD	Identity by descent

ICAN	Understanding the pathophysiology of intracranial aneurysm (Projet)
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IRC	Infirmière de recherche clinique
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
KI	Knock in
KO	Knock out
LOD	Logarithm of odds
MAF	Minor allele frequency
NGS	Next generation sequencing
OR	Odds ratio
PCR	PolymeraseChainReaction
PGH	Projet génome humain
RNI	Recherche Non Interventionnelle
RR	RisqueRelatif
SMR	Standardized mortality ratio
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TDM	Tomodensitométrie
TEC	Technicien d'études cliniques
VCF	Variation génétique call format

Résumé

Les anévrismes intracrâniens (AIC) se définissent par une hernie acquise de la paroi artérielle survenant préférentiellement à une bifurcation artérielle avec une prédilection topographique caractéristique au niveau des vaisseaux de la base du crâne. Peu d'études cliniques et/ou moléculaires ont abordé la place de la susceptibilité génétique dans des formes familiales d'AIC. Nous avons initié le recrutement de grandes familles atteintes d'AIC afin d'identifier les anomalies génétiques prédisposant aux anévrismes intracrâniens par une approche de séquençage d'exomes. Ce projet, nommé GAIA, a permis de recruter 4 familles présentant une forte agrégation de cas d'AIC. Au sein d'une famille, nous avons mis en évidence une variation génétique rare et délétère - partagée par les 5 membres atteints d'AIC - dans un gène codant pour une protéine circulante en lien avec l'angiogenèse. Cinq autres variations rares dans ce gène ont été mises en évidence dans une population de cas familiaux d'AIC, ce qui constitue un enrichissement significatif comparé aux bases de données en population générale. Le dosage de la protéine circulante montre des niveaux abaissés chez les patients de ces familles porteurs de ces variations comparés à leurs apparentés non porteurs. Nous poursuivons nos investigations génétiques sur les 3 autres grandes familles, ainsi que sur une centaine de noyaux familiaux d'AIC. En parallèle, afin d'identifier des voies de signalisation biologiques d'intérêt dans les formes familiales mais aussi sporadiques d'AIC, nous coordonnons dans le cadre du projet ICAN une bio-collection incluant déjà 1100 cas index, associée à une banque de données cliniques et d'imagerie.

Table des matières

I. INTRODUCTION	5
A. Rappels généraux de génétique	5
1. Quelques définitions.....	5
2. Les apports du Projet Génome Humain.....	9
3. Développement des stratégies de séquençage haut débit.....	10
4. Les grandes bases de données publiques.....	10
5. Variations fréquentes et pathologies fréquentes.....	11
B. Rappels généraux au sujet des anévrismes intracrâniens	15
1. Données cliniques et épidémiologiques.....	15
2. Anévrismes rompus : prise en charge en urgence.....	20
3. Anévrisme de découverte fortuite : quelle prise en charge ?.....	21
4. Améliorer la prise en charge des anévrismes intracrâniens non rompus: 2 axes de réflexions.....	23
a) Une stratégie de dépistage plus pertinente.....	23
b) Des traitements mini-invasifs plus sûrs et efficaces.....	24
C. Physiopathologie et génétique de la formation des anévrismes intracrâniens : Etat de l'art	25
1. Familiale ne veut pas dire génétique.....	25
2. Place de la génétique dans la survenue des anévrismes intracrâniens.....	27
a) Analyse de liaison génétique.....	28
b) Etudes d'associationsur génome entier.....	30
i. Etudes d'association sur génome entier publiées.....	30
ii. Travaux ancillaires aux études de génome entier.....	32
c) Article publié : Genetic investigation on intracranial aneurysm : Update and perspectives.....	35
d) Séquençage d'exome et anévrismes intracrâniens.....	40
3. Unprimum movens méconnu.....	43
a) Etudes des interactions environnementales avec les anévrismes intracrâniens.....	45
b) Epigénétique et anévrismes intracrâniens.....	45

c) Transcriptome, expression et anévrismes intracrâniens.....	47
II. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	49
A. GAIA : une étude centrée sur les formes familiales d'anévrismes intracrâniens	49
1. Analyse de la famille 39548 : <i>ANGPTL6</i> un gène candidat en lien avec la formation des anévrismes intracrâniens.....	52
2. MANUSCRIT EN RELECTURE à l'AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS :	57
3. Analyse des autres familles recrutées	83
a) Analyse de la famille 39423 : <i>CTSO</i> un autre gène candidat	83
b) Analyse du séquençage d'exomes de 95 propositus issus de formes familiales d'AIC.....	88
4. Article publié: Is there an inherited anatomical conformation favoring aneurysmal formation of the anterior communicating artery?.....	89
5. Approche épidémiogéographique	101
B. Article publié: Understanding the Pathophysiology of Intracranial aneurysm : The ICAN Project ...	107
III. CONCLUSION.....	117
IV. PERSPECTIVES.....	119
A. Dosage sérique D'Angptl6 dans une large population de porteurs d'AIC et de témoins	119
B. Autres exploitations de la biocollection ICAN	119
C. Développement du volet imagerie.....	120
V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
VI. ANNEXES	141
A. Réponses aux appels d'offres et financements obtenus.....	141
B. Communications orales et affichées	142

C. Matériels et Méthodes	143
1. GAIA historique et lancement.....	143
2. Aspect techniques du séquençage d'exomes	145
a) Séquençage d'exome complet	145
b) Séquençage haut débit	149
c) Alignement et annotation des variations	154
d) Filtrage des variations.....	155
3. Séquençage capillaire	158
4. Génotypage Haut Débit	158
5. Etudes d' Identity by descent.....	159
6. Approche épidémiogéographique	160
7. ICAN en pratique.....	161
D. Newsletter ICAN	165
E. Affiche GAIA	168

I. INTRODUCTION

A. RAPPELS GENERAUX DE GENETIQUE

1. QUELQUES DEFINITIONS

Un **gène** est un fragment d'ADN chromosomique qui code la synthèse d'un ARN puis d'une protéine. Il est constitué de séquences codantes (transcrites en ARN messagers et traduites en protéines) et non codantes (non transcrites, ou transcrites en ARN, mais non traduites).

Le **génom**e est l'ensemble du matériel génétique d'une espèce codé par son ADN et est composé de 46 chromosomes chez l'humain.

Un **locus** est un emplacement physique précis et invariable sur un chromosome. Il peut être une portion du chromosome où se situent un ou plusieurs gènes, mais pas nécessairement.

Un **allèle** est une version d'une même base nucléotidique, d'un gène ou d'un locus. Au sein d'une même espèce, le génome d'un individu est différent de celui d'un autre individu, c'est le polymorphisme génétique. Il peut donc exister dans les populations naturelles plusieurs séquences différentes d'ADN pour un même locus.

Un **haplotype** est un groupe d'allèles situés sur le même locus chromosomique et habituellement transmis ensemble.

Le concept de **polymorphisme génétique** désigne la possibilité de plusieurs allèles pour une même base, un gène ou locus donnés.

Le **polymorphisme nucléotidique(SNP) single-nucleotide polymorphism)** est la variation d'une seule paire de bases du génome, entre individus d'une même espèce. La notion de fréquence de l'allèle mineur ou **Minor allele frequency (MAF)** traduit donc la fréquence de cet allèle alternatif dans une population donnée.0

Les **exons** sont les segments d'un précurseur ARN qui sont conservés et que l'on retrouve dans l'ARN mature dans le cytoplasme. Les segments du précurseur ARN qui sont éliminés lors de l'épissage s'appellent par opposition des **introns**.

L'étude génétique des pathologies humaines héréditaires s'est fortement développée au cours du XXe siècle. Cependant, la notion de transmission de caractères héréditaires est identifiée depuis de nombreuses années. 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 différents allèles, certains dominants et d'autres récessifs.

Depuis la mise au point d'une technologie de séquençage par Frederick Sanger en 1977 puis le développement de la technique d'amplification en chaîne par polymérase chain reaction(PCR) par Kary Mullis en 1986, le « génie génétique » a développé 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(Restriction Fragment Length Polymorphisms) (1), microsatellites (NIH/CEPH collaborative mapping group 1992), variations nucléotidiques simples (SNP) a permis de générer des cartes génétiques de

plus en plus précises et ont identifié 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 variations responsables de pathologies génétiques ont été identifiées. On distingue: (i) les variations génétiques rares, qui possèdent des effets forts (forte pénétrance vis-à-vis de la pathologie), (ii) les variations fréquentes à effets faibles (ou modérés) et (iii) les variations de fréquence intermédiaire présentant des effets modérés (Figure 1) (2,3).

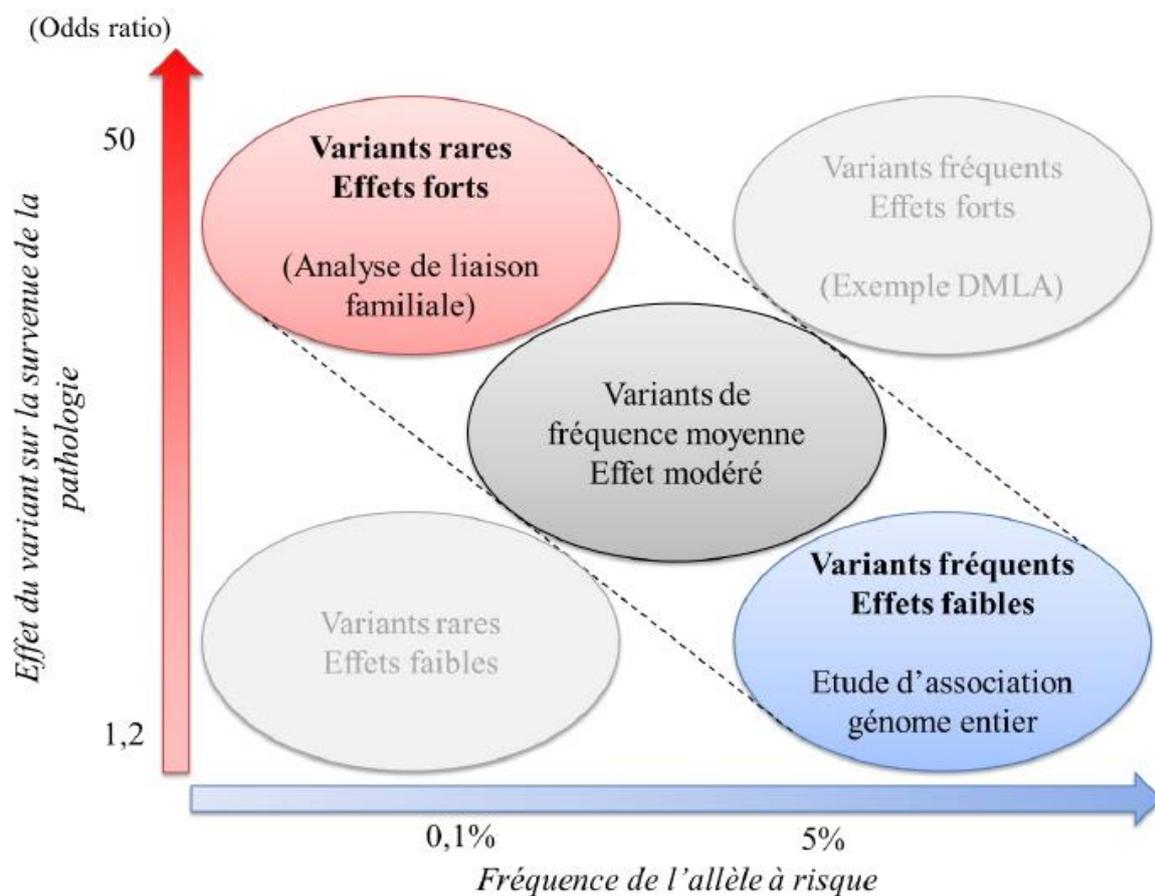


Figure 1: Représentation schématique de l'effet pathogène de variations génétiques (odds ratio) en fonction de la fréquence de l'allèle à risque. D'après Manolio et al. (2)

2. LES APPORTS DU PROJET GENOME 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 variations causales responsables de la pathologie étudiée.

C'est dans ce contexte, que le Projet Génome Humain (PGH) débute en 1989 aux USA. 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 premiers résultats de ce séquençage ont été publiés en 2001 (4), puis complétées en 2004 (International HumanGenomeSequencing Consortium 2004). La publication de la séquence du génome Humain (par l'Université de Santa Cruz <http://genome.ucsc.edu/>) (5,6) a conduit à 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 conduit au 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 contribué de façon majeure à l'identification de gènes responsables de pathologies. Actuellement, plus 8000 gènes sont associés à des traits pathologiques dans la base de données d'OnlineMendelianInheritance in Man (<http://www.omim.org/>), de l'université John Hopkins (Baltimore, Maryland, US).

3. DEVELOPPEMENT DES STRATEGIES DE SEQUENÇAGE HAUT DEBIT

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 trop faible et de coûts importants. Au début des années 2000 des technologies de séquençage haut débit ont été développées (next-generationsequencing, NGS) et 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 utilisé pour les analyses sur le génome humain, est l'IlluminaHiSeq. 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 (7). Cette méthode, appelée séquençage d'exome, réduit les coûts de séquençage et d'augmenter la qualité de séquençage des régions génomiques ciblées.

4. LES GRANDES BASES DE DONNEES PUBLIQUES

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 étant rapidement apparu hautement polymorphe, le projet international Hapmap (HaplotypeMap) a eu pour but dès 2002 de caractériser les 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). De nouvelles bases de données ont ainsi été développées afin d'estimer de plus en plus précisément la fréquence des variations génétiques retrouvées. Actuellement, la base de données Genome Aggregation Database (<http://gnomad.broadinstitute.org>; GnomAD) est la base de données la plus exhaustive : elle liste au 26/01/2017, l'ensemble des variations retrouvés chez respectivement 120 000 et 15 000 individus non apparentés dont l'exome et le génome complet ont été séquencés.

5. VARIATIONS FREQUENTES ET PATHOLOGIES FREQUENTES.

L'implication de la combinaison de variations fréquentes impliquées 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 variations génétiques et au recrutement de cohortes importantes de patients.

Ces études d'associations sur génome entier (GWAS) sont basées sur l'hypothèse que des variations géniques fréquentes vont être transmises de génération en génération au sein de « blocs haplotypiques ». Celles-ci 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 variations à effets modestes par analyse de liaison (8). Ces GWAS 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 SNP en déséquilibre de

liaison. Le génotypage de variations 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 grâce à une étude sur le génome entier et sur de grandes cohortes de patients. Un grand nombre de GWAS sont à ce jour publiées (>2000 publications) et un grand nombre de marqueurs de prédisposition ont pu être identifiés (National Human Genome Research Institute) grâce à cette technologie.

Les « odds ratio » calculés dans le cadre des GWAS permettent d'estimer le risque relatif 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 variations rares à forte pénétrance responsables de pathologie au sein de familles (Odds ratio très élevés).

Il a été montré dans certaines pathologies que des variations à effet fort identifiés au sein de familles, peuvent présenter des pénétrances incomplètes (9). 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 variations génétiques (fréquents et/ou rares) et que leur activité soit synergique. En effet, il est probable qu'une variation génétique fréquente puisse expliquer des variations de l'expressivité de la variation génétique causale (rare) et que des déterminants épigénétiques potentiellement modulés par des variations fréquentes, soient impliqués dans ces variations. Cependant l'identification de tels modulateurs reste difficile.

L'existence de variations 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 génétiques, épigénétiques et environnementaux.

B. RAPPELS GENERAUX AU SUJET DES ANEVRIsmES

INTRACRANIENS

1. DONNEES CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES

Les anévrismes intracrâniens(AIC) sont des anomalies fréquentes et touchent 3,2 % de la population adulte soit 1,2 à 3 millions de français(10,11). Ces AIC ne deviennent symptomatiques que rarement mais de façon dramatique. La rupture survient avec une incidence annuelle de 8-10/100000 habitants/année dans la population caucasienne et atteint 20/100000 habitants/année dans la population japonaise ou finlandaise (12). Les Anévrismes intracrâniens (AIC) se définissent par une hernie acquise de la paroi artérielle survenant préférentiellement à une bifurcation artérielle avec une prédilection topographique assez caractéristique au niveau des vaisseaux de la base du crâne (Figure 2).

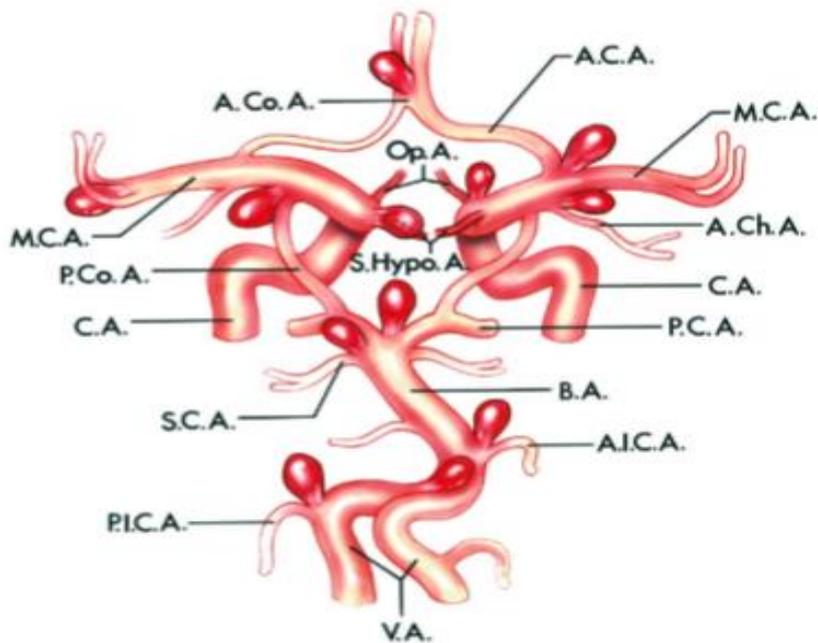


Figure 2 : Représentation schématique des localisations habituelles d'AIC d'après Rhoton(13)

A.C.A. : artère cérébrale antérieure; A.Ch.A. : artère choroïdienne antérieure ; A.Co.A. : artère communicante antérieure ; A.I.C.A. : artère cérébelleuse antéro-inférieure ; B.A. : artère basilaire C.A. : artère carotide interne ; M.C.A. : artère cérébrale moyenne ; Op.A. : artère ophtalmique ; P.C.A. : artère cérébrale postérieure ; P.Co.A. : artère communicante postérieure ; P.I.C.A. : artère cérébelleuse postéro-inférieure ; S.C.A. : artère cérébelleuse supérieure ; S.Hypo.A. : artère hypophysaire supérieure ; V.A. : artère vertébrale

Les figures 3 à 5, présentent les différentes modalités d'imagerie usuelles pour le bilan angioarchitectural d'un AIC, des artères porteuses et de l'ensemble de la vascularisation artérielle intracrâniennes d'un individu.



Figure 3 : Vue de face d'une artériographie cérébrale de la carotide montrant un anévrisme de la bifurcation cérébrale moyenne gauche.



Figure 4 : Vue de face d'une angiRM en temps de vol montrant un anévrisme de la bifurcation cérébrale moyenne droite.

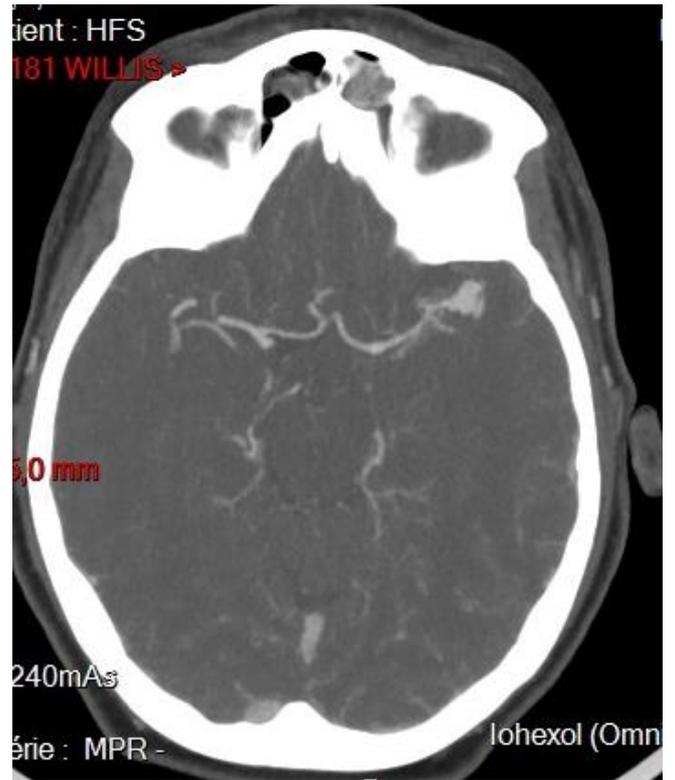
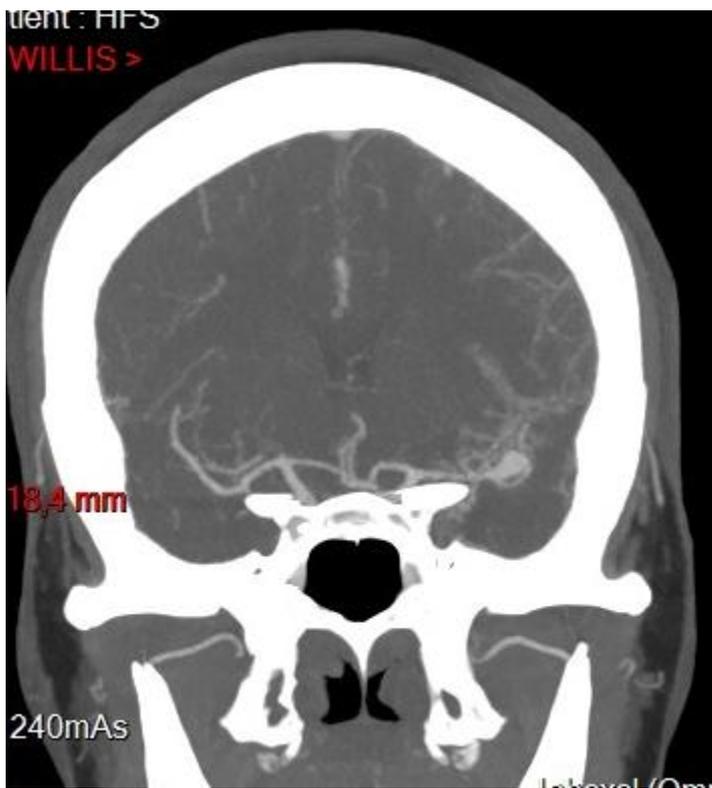


Figure5 : Vue de face et axiale d'un angioscanner cérébrale montrant un anévrisme de la bifurcation cérébrale moyenne gauche.

2. ANEURISMES ROMPUS : PRISE EN CHARGE EN URGENCE

La rupture d'un AIC entraîne une hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) de sombre pronostic avec un taux de morbi-mortalité de 45 à 75% dans le premier mois malgré les progrès considérables de la neuro-réanimation et de la neuroradiologie interventionnelle(14).

Dans l'urgence, le traitement prévaut à toute considération étiopathogénique. L'étude ISAT a démontré dans ce cadre l'intérêt du traitement endovasculaire comparé au traitement chirurgical en diminuant de façon significative le nombre de patients dépendants à 3 mois (15).

Le traitement en urgence consiste en la mise en place de spires de platine à l'intérieur de l'AIC afin de provoquer la formation d'un thrombus qui va exclure l'AIC de la circulation sanguine cérébrale. Ce traitement permettra d'éviter le re-saignement précoce de l'AIC qui est le plus souvent léthal. Toutefois, il persiste un risque de complication de l'HSA comme le développement d'une hydrocéphalie aiguë liée aux troubles de résorption du liquide céphalo-spinal ainsi que le vasospasme survenant souvent de manière décalée (environ 5 à 7 jours après la rupture).

C'est donc une pathologie grevée de lourdes conséquences sociales et économiques puisqu'elle va toucher des personnes jeunes et bien souvent jusque-là en bonne santé (âge moyen à la rupture environ 50 ans) (16).

3. ANEURISME DE DECOUVERTE FORTUITE : QUELLE PRISE EN CHARGE ?

Les progrès de l'imagerie non invasive - Tomodensitométrie (TDM) ou Imagerie par résonance magnétique (IRM) - permettent de dépister cette anomalie vasculaire au stade « pré-symptomatique » et exposent de plus en plus fréquemment les praticiens à la découverte fortuite d'AIC.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun consensus permettant d'identifier les AIC à traiter préventivement. En effet, les données de la littérature décrivent un risque hémorragique quasi nul (0,05%/an) pour les AIC de moins de 7 mm sans antécédents hémorragiques (10), or ces données sont en contradiction avec les constatations de terrain où la majorité des AIC rompus mesure moins de 5 mm (11).

L'étude TEAM proposait de randomiser 2000 patients avec un suivi sur 10 ans, entre un bras interventionnel et un bras observationnel avec surveillance et contrôle des facteurs de risques environnementaux (12). Malheureusement, cette étude n'a pu être menée à terme du fait d'un nombre d'inclusion trop faible.

Actuellement, il existe une tendance à intervenir préventivement chez des patients sélectionnés sur des critères cliniques et morphologiques propres à l'AIC. Certains facteurs de risques de rupture d'un AIC ont été identifiés par ordre d'importance (18) :

- Tabagisme (Risque Relatif (RR)=3)
- Hypertension artérielle (HTA) (RR=2,5)
- Consommation d'alcool > 150g/semaine (RR=2)

A noter qu'il existe des disparités homme/femme dans l'importance de ces facteurs de risques.

En outre, des facteurs liés aux caractéristiques morphologiques de l'AIC sont aussi reconnus:

- Taille > 7 mm et localisation postérieure (17)
- Caractère irrégulier, lobulations(19)
- Aspect ratio >1,6 (20), Size ratio > 2 (21)
- Evolutivité

Ainsi les scores PHASES puis ELAPSS regroupant ces principaux facteur de risque ont-ils été proposés pour rendre compte du risque de croissance d'un AIC (22,23).

4. AMELIORER LA PRISE EN CHARGE DES ANEURISMES INTRACRANIENS NON ROMPUS: 2 AXES DE REFLEXIONS

a) Une stratégie de dépistage plus pertinente

Les AIC sont dans la très grande majorité des cas asymptomatiques avant de se rompre. L'IRM constitue aujourd'hui le moyen de dépistage des AIC (24). En effet, sa sensibilité et sa spécificité sont bonnes pour des AIC de plus de 3 mm et c'est un examen non irradiant(25). Mais la disponibilité de cet examen et le coût en limite l'utilisation. On sait aujourd'hui que lorsque deux antécédents de rupture d'AIC sont apparus dans une famille, ce dépistage par IRM est requis chez les apparentés au 1er degré (26). Cependant, la grande majorité des ruptures surviennent en dehors de ce contexte et le poids de l'organisation d'un dépistage de masse même limité à tous les apparentés au 1er degrés de patients atteints d'AIC est trop lourd pour la société (27).

Il serait donc très judicieux d'évaluer une stratégie de dépistage de masse par IRM chez des patients qui présentent un risque relatif intermédiaire entre ces deux derniers groupes (les apparentés aux 1^{ers} degrés d'un cas et les apparentés aux 1^{ers} degrés de 2 cas d'AIC dans la famille). Il faudrait dans cette optique disposer d'un marqueur simple, peu coûteux, non invasif. Celui-ci nous permettrait de sélectionner, dans une population d'individus sains mais apparentés à un sujet porteur d'AIC (personne qui présente donc déjà un RRx4 de présence d'AIC), ceux qui sont susceptibles de développer un AIC. Ces patients devront alors bénéficier d'une surveillance IRM rapprochée afin de détecter l'apparition d'un AIC avant sa rupture.

b) Des traitements mini-invasifs plus sûrs et efficaces

L'amélioration du traitement des AIC est un second axe de réflexion. Le traitement endovasculaire par mise en place de spires dans l'AIC non rompu est efficace mais non dénué de complications (28). Il existe en effet des risques hémorragiques et thromboemboliques qui conduisent à environ 3,5% d'évènements neurologiques graves dans le premier mois suivant l'intervention (28).

D'autres types de traitement des AIC non rompus sont déjà largement utilisés comme la mise en place de stents de diversion de flux dans l'une des artères porteuses de l'AIC (29-31). D'autre part, des dispositifs de diversion de flux intra-anévrismaux sont aussi utilisés depuis peu et les résultats à long terme sont en cours d'évaluation (32).

Ces traitements novateurs sont nés d'une philosophie totalement différentes grâce aux connaissances acquises au sujet des facteurs hémodynamiques en cause dans la formation et la rupture anévrismale (33,34). Ainsi l'amélioration des connaissances physiopathologiques au sujet de la formation mais aussi de la rupture des AIC peut permettre le développement de traitements potentiellement plus sûrs et plus efficaces. On peut aujourd'hui imaginer que la thérapie cellulaire pourrait ainsi être utile afin d'assurer une véritable guérison de la maladie pariétale (35).

Le développement de traitements et de stratégies de dépistage plus efficaces sont deux axes pouvant être adressés par notre travail. En effet, la génétique est pour nous une porte d'entrée dans la physiopathologie anévrismale et est sans doute la voie la plus efficace qui mène à un dépistage ciblé et personnalisé des patients à risque d'AIC.

C. PHYSIOPATHOLOGIE ET GENETIQUE DE LA FORMATION DES ANEURISMES INTRACRANIENS : ÉTAT DE L'ART

1. FAMILIALE NE VEUT PAS DIRE GENETIQUE

La présence d'AIC étant un facteur de risque majeur d'HSA, Bor et al. ont montré que le risque d'HSA pour un individu apparenté au 1er degré était multiplié par 51(CI, 8,56-1117) quand au moins deux cas d'HSA sont survenus dans la familles (36,37). Toutefois, l'intervalle de confiance de ce résultat, dû au très faible nombre de cas, amène à le considérer avec prudence. Les formes familiales de rupture d'AIC et donc d'HSA sont rares car seuls 3% des patients avec une HSA ont un ATCD au 1 er degré de HSA. Certains affirment que cela est dû aux stratégies de dépistage mais celle-ci sont relativement récentes (1990) et les registres (suédois par exemple) recensent les cas depuis les années 60 (38).

L'héritabilité, définie comme la proportion de la susceptibilité à la maladie due aux facteurs génétiques, peut être mesurée par la concordance du phénomène chez les jumeaux. Le groupe Nordic Twin Study s'est intéressé à la pathologie anévrismale chez les jumeaux. Leur étude a montré une héritabilité estimée à 41% pour la rupture d'AIC, suggérant que les facteurs environnementaux sont déterminants dans la survenue d'HSA liée aux AIC (39).

Si les HSA sont rares, la prévalence des AIC est nettement supérieure et varie de 0 à 42 % selon les études avec un taux de 3,2% reportée dans la plus grande méta-analyse à ce jour (11). Toutefois et comme affirmé par Korja et al, il ne serait pas étonnant que cette prévalence dépasse nettement les 6% dans une sous population de femmes hypertendues et tabagiques (40). En effet, la sœur tabagique et hypertendue d'un

individu porteur d'AIC présente le risque relatif maximal d'être porteur d'un AIC (41). De plus la plupart des cas d'AIC retrouvés chez les apparentés quand un dépistage familial est entrepris mesure moins de 4 mm (41).

Ces considérations relatives aux facteurs de risque, et l'échec des GWAS (cf. Etudes d'association sur génome entier association publiées) de grande ampleur à mettre en évidence une association forte entre un locus de susceptibilité et la présence d'AIC, poussent certains à penser que l'agrégation de cas au sein d'une famille, est en fait liée à l'agrégation des facteurs de risque dans cette famille. En d'autres termes, la génétique n'expliquerait pas la survenue d'AIC dans les familles en question.

Cependant, s'il apparaît probable que les facteurs environnementaux ont une importance majeure dans le risque de survenue d'HSA, la génétique paraît quant à elle impliquée dans la formation de l'AIC. Cette hypothèse est appuyée par le groupe FIA qui a étudié les 21 paires de jumeaux incluses dans leur étude. Parmi ces dernières, 11 des 12 paires de jumeaux monozygotes sont tous deux porteurs d'AIC contre seulement 5 des 9 paires de jumeaux dizygotes (42).

2. PLACE DE LA GENETIQUE DANS LA SURVENUE DES ANEURISMES INTRACRANIENS

Des études ont suggéré que le principal facteur d'apparition d'un AIC était la présence d'un antécédent familial d'AIC (RR=4) (10). Les formes familiales représenteraient 7 à 12,5% des cas d'AIC (43)(12) et sont définies par la présence d'au moins 2 cas apparentés au 1^{er} ou au 2^{ème} degré (26).

Il est important de différencier les formes familiales d'AIC liées à des pathologies syndromiques identifiées telles que la polykystose autosomique dominante mais aussi le syndrome d'ElhersDanlos de type IV, le syndrome de Marfan et plus récemment décrit les Aneurysm-Ostéoarthritisme Syndromes liés en particulier à la mutation du gène *SMAD3*(44). Toutefois, l'ensemble de ces formes familiales syndromiques ne représenterait que 1% des AIC (45). Il existe donc de nombreuses formes non syndromiques d'AIC familiaux.

Dans les années 1960 - 1970, les premiers cas familiaux ont été décrits (46) mais il a fallu attendre les progrès de la génétique moléculaire et les années 2000 pour voir apparaître des études d'intérêts concernant ces formes familiales. A ce jour, le plus grand nombre de patients atteints au sein d'une famille s'élève à dix (47).

a) Analyse de liaison génétique

Les analyses de liaison menées dans les années 2000 ont été confrontées à 2 types de difficultés majeures :

1) L'identification de grandes familles génétiquement informatives est rendue difficile par l'apparition tardive des AIC, la prévalence faible et par le nombre important de décès post-rupture.

2) Les analyses de liaison paramétriques nécessitent, au préalable, une hypothèse de transmission mendélienne. Celle-ci est difficile à émettre dans le cadre des AIC car les modes de transmission sont probablement hétérogènes. Afin de pallier ce problème, des analyses de liaison « sibling-pair » (paire de frères/ sœurs) ont été utilisées s'affranchissant ainsi du mode de transmission (voir Annexes IBD)

En 2001, *Onda et al.* ont identifié une liaison sur le chromosome 7q11 grâce à une étude de liaison portant sur une centaine de cas japonais (sibling-pairs) (Logarithm of odds (LOD) score 3,22). Dans ce locus, le gène codant l'élastine (*ELN*) est apparu comme un bon gène candidat, mais aucun des 14 SNP identifiés dans ce gène n'a montré d'association allélique avec la pathologie (48). De même, Olson et *al.* en 2002 puis Van der Voet et *al.* en 2004 mettent en évidence un déséquilibre de liaison sur le chromosome 19q13.3 (49)(50). En 2004, Farnham et *al.* confirment un déséquilibre de liaison sur le chromosome 7q11 dans une population de l'Utah aux USA (51). Akagawa et *al.* en 2006 ont identifié un haplotype en déséquilibre de liaison sur 7q11 chez des japonais. Deux SNP délétères dans les régions régulatrices du gène codant l'élastine ont été retrouvés. Dans des études *in vitro*, l'expression fonctionnelle de ces mutations entraînent une accélération de la dégradation de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'élastine et une diminution de l'activité du promoteur de *LKM1*(52).

D'autres travaux réalisés sur des familles génétiquement informatives ont pu mettre en évidence les loci 2p13 (LOD score 3.55), 1p34.3-p36.13 (LOD score 4,2) et 13q14.12-21.1 (LOD score 4.56) (47)(53). Ces loci contiennent des gènes candidats, mais les investigations de l'époque n'ont pas abouti à l'identification d'un gène.

En effet, les technologies actuelles de séquençage haut débit n'étaient pas disponibles et ne permettaient pas de réaliser un criblage exhaustif des gènes présents dans le locus.

En 2008, une méta-analyse de 5 études de liaison totalisait une dizaine de loci sans qu'aucun de ces derniers ne permettent de déterminer clairement de mutation à effet fort à l'origine des formes familiales d'AIC (54).

Enfin en 2008, la plus grande étude de liaison intitulée "Familial Intracranial Aneurysm Study 1" (FIA 1) portant sur plus de 1100 cas familiaux issus d'un consortium international de 192 familles a été publiée. Cette étude a la particularité de prendre en compte les facteurs de risque de rupture d'AIC comme le tabac et l'HTA. Celle-ci a montré un LOD score maximal modeste sur les chromosomes 4q et 12p mais modulé jusqu'à 4,1 sur le chromosome 7 avec l'interaction quantitative du tabagisme exprimé en paquet/années. (55). Ces études familiales, bien que n'aboutissant pas à l'identification de gènes majeurs, montrent également l'existence de déterminants génétiques.

Au total, six régions génomiques ont montré un déséquilibre de liaison dans au moins deux études indépendantes(1p34-36, 4q32, 7q11, 14q22, 19q13, et Xp22) (56).

b) Etudes d'association sur génome entier

i. Etudes d'association sur génome entier publiées

Les études de liaisons suggèrent donc qu'il n'y ait pas qu'une variation à effet fort dans les familles d'AIC mais plusieurs facteurs génétiques et environnementaux contribuant aux AIC. En effet, les variations touchent potentiellement plusieurs gènes. Tout comme le diabète de type 1, ces constatations font entrer les AIC dans le cadre des Maladies Complexes (57).

C'est pourquoi en parallèle de ces analyses familiales à la recherche de variations à effet fort, des études ont été menées afin d'identifier des variations fréquentes pouvant prédisposer aux AIC.

A partir de 2008, des GWAS ont été publiées, mais aucune n'est pas parvenue à expliquer la forte héritabilité supposée de la pathologie. Les variations génétiques testées dans ce type d'études sont caractérisées par leur forte fréquence (SNP) et leur effet faible sur la pathologie. Au final, les loci retrouvées dans ces études n'expliqueraient que 5% de l'héritabilité des formes familiales (58).

Les études de Bilguvar et Yasuno ont identifié 5 loci (18q11.2 proche de *RBBP8*, 10q24.32 proche de *CNNM2*, 13q13.1 proche de *STARD13*, 8q11.23 proche de *SOX17*, 9p21.3 proche de *CDKN2A* et *CDKN2B*). (59)(58).

Les mêmes auteurs ont publié en 2011 une association entre les AIC et une variation génétique (SNP) sur le gène codant le récepteur de type A de l'endothéline, gène candidat fonctionnel et situé sur le locus 4q31.23. (60). En 2012, Foroud et *al.* Ont

comparé des résultats d'une GWAS sur cohortes d'AIC familiaux et sporadiques. Ils confirment une modeste association avec 9p mais l'Odds Ratio reste supérieur avec le tabagisme qu'avec les variations présents et testés dans ce locus (OR tabac (2,5)>OR génotype SNP 8q (1,4)) suggérant ainsi que le tabagisme est un facteur de risque d'AIC supérieur aux variations retrouvées dans ce locus. En outre, le tabagisme et la présence de ces variations conduisent dans cette étude, à un sur-risque d'AIC attendu. Il n'y aurait donc pas de locus de susceptibilité au tabagisme pour les AIC selon cette étude (61).

En 2012, une GWAS a de nouveau été réalisée mais sur une population exclusivement japonaise (62). L'étude réalisée sur plus de 1300 cas et 5000 contrôles et répliquée sur 2400 cas et 13000 confirme les loci déjà retrouvés dans les précédente GWAS et a approfondi l'étude fonctionnelle d'un locus 4q31.22 proche du récepteur de l'endothéline A. L'allèle alternatif du rs6841581 situé dans ce gène conduirait à une modification de l'affinité du Récepteur à l'endothéline.

La dernière GWAS a été publiée en 2014, et met en évidence un nouveau locus sur le chromosome 7 (OR 1.27) dont l'association est répliquée dans la cohorte allemande. Ce locus contient notamment le gène *HDAC9* qui est associé au AVC ischémiques (63).

Enfin, une méta analyse de « *candidate-gene association study* » (CGAS) et de GWAS regroupant 66 études (dont 6 GWAS) avec 41 SNP dans 29 gènes a été publiées en 2013 dans *Neurology*(64). Au total, 33000 cas et 83000 témoins ont permis après analyse de l'hétérogénéité statistique et correction des biais liées aux origines géographiques des cas et témoins de faire ressortir 19 SNP. Cette étude confirme les rôles importants de 9p21 : OR 1.29, 8q11 : OR 1.21 et 4q31 : OR 1.22.

ii. Travaux ancillaires aux études de génome entier

Différentes études reprennent les résultats de ces GWAS afin de moduler les effets des SNP en fonction de l'âge à la rupture, des facteurs de risque en environnementaux, les antécédents familiaux, de la localisation de l'anévrisme.

En 2010 une étude originale a montré que la localisation de l'AIC sur la circulation intracrânienne postérieure augmentait la force de l'association avec 9p21 (38). De même, Van't Hof en calculant un score génétique de risque en fonction de la présence des SNP et de leurs OR respectifs a mis en évidence une hétérogénéité génétique en fonction de la localisation des AIC (65).

Peymani et al. ont, en 2015 dans Stroke, mis en évidence une association entre un score similaire et la taille de l'AIC chez 120 patients. En revanche, aucun lien entre la présence des AIC et un score construit à partir de SNP en lien avec l'HTA n'a été retrouvé chez 120 porteurs d'AIC et 5000 contrôles (66).

En 2013, une équipe turque a tenté de combiner in silico les différents SNP retrouvés dans les GWAS et les gènes qui s'y rapportent pour identifier des voies de signalisation en jeu dans la formation des AIC. Ce travail a donc utilisé les données d'interactomiques et de protéomiques pour faire ressortir trois principales voies, celle du TGF β , de la MAP Kinase et du Calcium intracellulaire(67).

L'exploitation fonctionnelle la plus aboutie des résultats de ces GWAS est en lien avec le locus 8q11 (68). Ce locus contient le gène *SOX 17* connu comme régulateur de l'angiogénèse et de la différenciation des cellules endothéliales artérielles. Il est très exprimé dans les cellules endothéliales des artères intracrâniennes humaines. Un modèle murin KO pour ce gène a été généré et étudié sous différents régimes d'hypertension artérielle par histologie et en IRM 9,4 Tesla.

Sans hypertension, 25% des souris KO pour *SOX 17* forment des AIC contre 0% des wild type. Avec hypertension induite par pompe à angiotensine 2, 60% des souris KO pour *SOX 17* forment des AIC contre 15% des wild types. Toutefois l'examen attentif des images proposées dans cet article, montre que les dilatations décrites comme anévrismales sont fusiformes et correspondent sans doute à des dissections plus qu'à la formation de véritables dilatations sacculaires de bifurcations.

L'étude histologique de ce modèle murin transgénique montre, en réaction à l'hypertension, une dilatation de la lumière et un amincissement pariétal par raréfaction des fibres musculaires lisses. De plus les cellules endothéliales présentent une forme irrégulière avec des jonctions cellulaires déstabilisées (VE cadhérines). Cette étude montre enfin une nette baisse de l'expression de *SOX 17* dans les artères intracrâniennes des patients présentant des AIC multiples (mais pas si AIC unique) comparé aux témoins autopsiques.

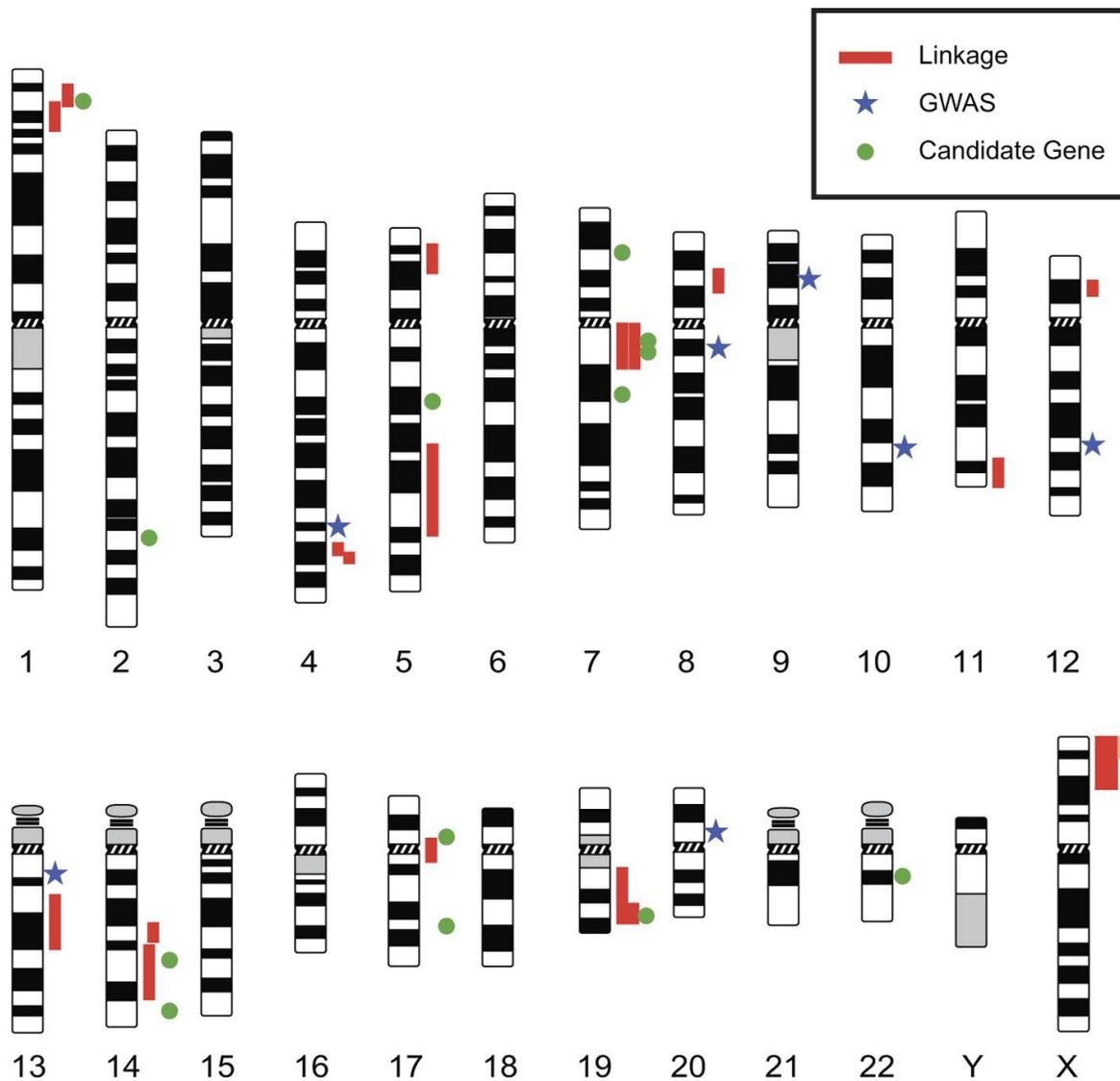


Figure 6 : Résumé des principaux « hits » des études de liaison, d'association ou de type gène candidats publiées. D'après Tromp et al (56).

c) Article publié :
Genetic investigation on intracranial
aneurysm : Update and perspectives

Journal of Neuroradiology (2015) 42, 67–71



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



REVIEW

Genetic investigations on intracranial aneurysm: Update and perspectives



Romain Bourcier^{a,b,*}, Richard Redon^b, Hubert Desal^{a,b}

^a Department of neuroradiology, CHU Nantes, boulevard J.-Monod, 44000 Nantes, France

^b 1087 Inserm unit, institut du thorax, 44000 Nantes, France

Available online 9 February 2015

KEYWORDS

Genetics;
Intracranial;
Aneurysm

Summary Detection of an intracranial aneurysm (IA) is a common finding in MRI practice. Nowadays, the incidence of unruptured IA seems to be increasing with the continuous evolution of imaging techniques. Important modifiable risk factors for SAH are well defined, but familial history of IA is the best risk marker for the presence of IA. Numerous heritable conditions are associated with IA formation but these syndromes account for less than 1% of all IAs in the population. No diagnostic test based on genetic knowledge is currently available to identify these mutations and patients who are at higher risk for developing IAs. In the longer term, a more comprehensive understanding of independent and interdependent molecular pathways germane to IA formation and rupture may guide the physician in developing targeted therapies and optimizing prognostic risk assessment.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

We still do not know why intracranial aneurysms (IA) develop. Genetic predisposition and environmental exposition are the two etiological factors explored so far. Although, there were already many specialized reviews in the specific topic of human genetics applied to IAs [1–5], we propose

in a single scientific paper a very summarized and concise state of the art. It can help the neuroradiologists to realize the current status and problems of genetic research for IAs.

Introduction

Detection of an intracranial aneurysm (IA) is a common finding in MRI practice [6]. Three percent of the general population harbors an IA [7]. Nowadays, the incidence of unruptured IA seems to be increasing with the continuous evolution of imaging techniques [4,8,9]. The main issue is that it can lead to permanent neurological deficit or death if the aneurysm ruptures (incidence de 10/100,000). However, the low incidence of subarachnoid hemorrhage (SAH) – compared to the prevalence of unruptured IA – suggests that the majority of IA do not rupture [10].

Abbreviations: IA, intracranial aneurysm; SAH, subarachnoid hemorrhage; MRA, magnetic resonance angiography; DNA, deoxyribonucleic acid; SNP, single nucleotide polymorphism; VNTR, variable number tandem repeat; GWL, genome wide linkage; GWAS, genome wide association study; OR, odds ratio; NGS, next generation sequencing.

* Corresponding author. Department of neuroradiology, CHU Nantes, boulevard J.-Monod, 44000 Nantes, France.
Tel.: +33 2 40 56 56 08.

E-mail address: romain.bourcier2@gmail.com (R. Bourcier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurad.2015.01.002>

0150-9861/© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Important modifiable risk factors for SAH include cigarette smoking (relative risk, 2.2 to 3.1), high blood pressure (relative risk, 2.5 to 2.6), and heavy (> 150 g/week) alcohol consumption (relative risk, 1.5 to 2.1) [11]. Individuals aged 40 to 60 years are at highest risk for IAs, with women affected more than men by a 3:2 ratio [12,13].

In 1999, the MARS group cleared the issue of screening healthy relatives around a patient with an IA. Indeed, among the 1st degree relatives, 149 patients should be screened with MRA to prevent 1 SAH and 298 patients to prevent one death by SAH [14]. Furthermore, familial history of IA is the best risk marker for the presence of IA [15]. For example, the risk of IA, as determined by magnetic resonance angiography (MRA) screening, is about four times greater among members of families with two or more patients presenting with IA than among the general population.

Numerous heritable conditions are associated with IA formation, including autosomal dominant polycystic kidney disease, neurofibromatosis type I, Marfan syndrome, multiple endocrine neoplasia type I, pseudoxanthoma elasticum, hereditary hemorrhagic telangiectasia, and Ehlers-Danlos syndrome type II and IV [16,17]. These syndromes account for less than 1% of all IAs in the population and therefore cannot explain the familial aggregation in most of IA cases [18]. Indeed, familial IA is supposed to represent 10% of all cases [19] and it appears that a systematic research of familial history of IA reveals familial forms more often than anticipated. Thus, ascertaining multigenerational extended pedigrees through affected index cases will likely lead to identify rapidly a sizable cohort of familial cases [18].

State of art – genetics studies

Several genetic models could explain the heritability of IAs. This condition may be attributable to the inheritance of rare genetic variation with major effect, but incomplete penetrance. This category of genetic variation can be assessed through familial investigations. Another hypothesis, which can be tested by applying population-based approaches, is that IAs are caused by common genetic variation with small effect size [18].

The collective efforts of multiple international consortiums have identified millions of common SNPs and copy number polymorphisms in DNAs from populations of various ancestries, as well as linkage-disequilibrium patterns [20]. This is the basis of the two main strategies applied for the last fifteen years to identify genetic variation causally related to IA: genome wide linkage (GWL) and genome wide association studies (GWAS) (Table 1).

Familial investigations

The availability of large families allows to test the unusual circumstance in which IAs are transmitted as a consequence of a mutation in a single gene with a major effect. Genome wide linkage analyses look for the chromosomal position (loci) containing the disease gene by interrogating genetic markers, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) or Variable Number Tandem Repeat (VNTR). This method has permitted to identify disease-causing genes in complex disorders such as diabetes, obesity, and hypertension

[21–23]. Furthermore, it has also shed light on the pathophysiology of cerebral cavernous malformations [24]. To date, a number of studies have applied linkage analysis to IA. The non-parametric approaches are attractive with respect to IA because the penetrance is likely incomplete, meaning that each mutation carrier is not necessarily affected. Overall, non-parametric linkage analyses have identified multiple loci contributing to IA formation and possible rupture [25–31] but only 4 (1p34.3–p36.13, 7q11, 19q13.3, and Xp22) have been replicated in different populations [26,27,29,32].

The strongest evidence to date involves regions on chromosomal arms 7q and 19q, on which several linkage hits have been reported in independent studies [25]. Positional candidate genes were tested in the relevant regions but only moderate associations were found (*PERLECAN* gene, *ELASTIN* gene, *COLLAGEN type 1 A2* gene) [1]: no functional variant was shown as segregating with IA.

Population-based studies

GWAS provide an alternative approach to elucidate the influence of genetic variants in complex or multi-factorial disorders. This strategy is based on the identification of a number of SNPs in loci that are significantly associated with the presence of IA, independently of modifiable risk factors. Logistic regression analysis is performed to predict the probability of IA given a specific SNP. Odds ratios (ORs) and *P* values are generated to report the proportion of individuals in the case group carrying a SNP compared to the proportion in the control group. Significant SNPs are mapped to loci, which can then be scrutinized to infer which genes play a role in the pathogenesis of IAs.

GWAS on other vascular diseases, including hypertension and ischemic stroke, have already yielded insight into new disease genes and pathways [33]. Nevertheless, the amount of data on genetic associations with IAs remains much smaller than for other complex diseases and only 4 large-scale GWAS (> 3000 cases and controls) have been reported so far for IA.

GWAS identified two loci – 9p21 and 8q12 – significantly associated with IAs (*P* value $\leq 1 \times 10^{-7}$) [34] in case-control populations from Iceland, Netherlands and Finland [35]. At the 8q12.1 locus, *SOX17* is the main candidate. This gene required for both endothelial formation and maintenance – an important aspect when considering the predominant location of IA at arterial branch points and sites of endothelial shear stress [36]. Analyses of each dataset individually as well as jointly found that the G allele at rs10757278 is associated with an approximately 1.29-fold increase in the risk of IA [37,38]. Thus, this locus alone explains only a small fraction of the genetic risk. The number of true additional genetic risk factors and the strength of their associations with IAs remain uncertain so far.

Data pooling from all genetic association studies allows risk estimates to be determined more precisely in light of statistical heterogeneity and differences in population ethnicity between studies. One comprehensive review and meta-analysis of all published GWAS of IA was reported by Alg and al. [34]. Once again, low ORs suggest that the genetic contribution to aneurysm development is substantial but

Table 1 Major studies about genetics of intracranial aneurysms with results in term of loci, candidates genes and their related functions.

Studies	Type of genetic analysis	Loci	Candidate genes	Functions
Yasuno et al. [32]	GWAS	4q31.23	<i>EDNRA</i>	Vasoconstriction
Yasuno et al. [32]	GWAS	8q21.3	<i>SOX17</i>	Endothelial sprouting
Bilguvar et al. [31]				
Yasuno et al. [32]	GWAS	9p21.3	<i>CDKN2A/B</i>	Smooth muscle proliferation
Bilguvar et al. [31]				
Yasuno et al. [32]	GWAS	10q24.32	<i>CNNM2</i>	Epithelial absorption of Mg ²⁺
Yasuno et al. [32]	GWAS	13q13.1	<i>STARD13</i>	Endothelial cell migration
Bilguvar et al. [31]	GWAS	2q	<i>BOLL, PLCL1</i>	Homology to phospholipase C, lies downstream of VEGFR2
Yasuno et al. [32]	GWAS	18q11.2	<i>RBBP8</i>	Cell cycle
Onda et al. [21]	GWL	7q11, 5q22, 14q22	<i>ELASTIN</i>	Parietal vessel elasticity
Nahed et al. [20]	GWL	1p34.3–p36.13, Xp22	<i>PERLECAN</i>	Stimulate endothelial growth and re-generation
Yamada et al. [23]	GWL	19q13, Xp22		
Ozturk et al. [22]	GWL	11q24, 14q23		

GWAS: genome wide association studies; GWL: genome wide linkage.

can't explain the estimated part of heredity in this pathology.

Gene expression studies

Gene expression studies use microarrays to catalog the transcriptome of IAs in an individual. Numerous studies have been ongoing since 2001, and demonstrate abnormal transcription in proteins germane to collagens, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, and cell adhesion molecules [39–42]. One can easily conclude that the key actor that causes IA formation is among these genes. However, all these studies were conducted after aneurysmal rupture. Thus, since a SAH is a cataclysmic and systemic event, we are not able today to distinguish the "chicken and egg". The large clusters of genes overexpressed in these conditions are probably the consequence of the rupture [43].

Next generation sequencing (NGS): a new era in human genetics

New strategies based on NGS have permitted to discover unknown mutations causally related to familial thoracic aortic aneurysms and dissections or to brainstem gliomas [44,45]. Recently, the FIA consortium has brought the genetics of familial forms of IA in the era of whole-exome sequencing [46]. Large pedigrees of American, Australian and New Zealander affected by IA were recruited to analyse all coding sequences from fifty patients, carrying IA or not. Several relevant mutations have been identified: plans are underway to further test the impacted genes.

Conclusion

No diagnostic test based on genetic knowledge is currently available to identify patients who are at higher risk for developing IAs. The discovery of genetic mutations with large effects shared by individuals with AIC would be a first crucial step. The existence of common risk alleles for IA located around the same genes would then be an argument in favor of the hypothesis that the corresponding gene products play important roles in the integrity of the cerebral vasculature. In the longer term, a more comprehensive understanding of independent and interdependent molecular pathways germane to IA formation and rupture may guide the physician in developing targeted therapies and optimizing prognostic risk assessment.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

References

- [1] Ruigrok YM, Rinkel GJE. Genetics of intracranial aneurysms. *Stroke* 2008;39(3):1049–55.
- [2] Ruigrok YM, Rinkel GJE, Wijmenga C. Genetics of intracranial aneurysms. *Lancet Neurol* 2005;4(3):179–89.
- [3] Francis SE, Tu J, Qian Y, Avolio AP. A combination of genetic, molecular and haemodynamic risk factors contributes to the formation, enlargement and rupture of brain aneurysms. *J Clin Neurosci* 2013;20(7):912–8.
- [4] Kricshek B, Inoue I. The genetics of intracranial aneurysms. *J Hum Genet* 2006;51(7):587–94.

- [5] Schievink WI, Schaid DJ, Rogers HM, Piepgras DG, Michels VW. On the inheritance of intracranial aneurysms. *Stroke* 1994;25(10):2028–37.
- [6] Pierot L, Portefaix C, Rodriguez-Régent C, Gallas S, Meder J-F, Oppenheim C. Role of MRA in the detection of intracranial aneurysm in the acute phase of subarachnoid hemorrhage. *J Neuroradiol* 2013;40(3):204–10.
- [7] Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2011;10(7):626–36.
- [8] Morita A, Fujiwara S, Hashi K, Ohtsu H, Kirino T. Risk of rupture associated with intact cerebral aneurysms in the Japanese population: a systematic review of the literature from Japan. *J Neurosurg* 2005;102(4):601–6.
- [9] Hasan DM, Chalouhi N, Jabbour P, Magnotta VA, Kung DK, Young WL. Imaging aspirin effect on macrophages in the wall of human cerebral aneurysms using ferumoxytol-enhanced MRI: preliminary results. *J Neuroradiol* 2013;40(3):187–91.
- [10] Mackey J, Brown Jr RD, Moomaw CJ, Sauerbeck L, Horning R, Gandhi D, et al. Unruptured intracranial aneurysms in the Familial Intracranial Aneurysm and International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms cohorts: differences in multiplicity and location. *J Neurosurg* 2012;117(1):60–4.
- [11] Feigin V, Parag V, Lawes CMM, Rodgers A, Suh I, Woodward M, et al. Smoking and elevated blood pressure are the most important risk factors for subarachnoid hemorrhage in the Asia-Pacific region: an overview of 26 cohorts involving 306,620 participants. *Stroke* 2005;36(7):1360–5.
- [12] Wardlaw JM, White PM. The detection and management of unruptured intracranial aneurysms. *Brain* 2000;123(Pt 2):205–21.
- [13] Chason JL, Hindman WM. Berry aneurysms of the circle of Willis; results of a planned autopsy study. *Neurology* 1958;8(1):41–4.
- [14] Raaymakers TW. Aneurysms in relatives of patients with subarachnoid hemorrhage: frequency and risk factors. MARS Study Group. *Magnetic Resonance Angiography in Relatives of patients with Subarachnoid hemorrhage*. *Neurology* 1999;53(5):982–8.
- [15] Rinkel GJ, Djibuti M, Algra A, van Gijn J. Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. *Stroke* 1998;29(1):251–6.
- [16] Schievink WI. Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery* 1997;40(4):651–62 [discussion 662–3].
- [17] Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 2009;76(2):149–68.
- [18] Nahed BV, Bydon M, Ozturk AK, Bilguvar K, Bayrakli F, Gunel M. Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery* 2007;60(2):213–25 [discussion 225–6].
- [19] Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med* 1992;326(11):733–6.
- [20] International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437(7063):1299–320.
- [21] Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, et al. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 2001;293(5532):1107–12.
- [22] Concannon P, Ertlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Pociot F, et al. Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1435 multiplex families. *Diabetes* 2005;54(10):2995–3001.
- [23] Liu Y-J, Xiao P, Xiong DH, Recker RR, Deng H-W. Searching for obesity genes: progress and prospects. *Drugs Today* 2005;41(5):345–62.
- [24] Notelet L, Chapon F, Khoury S, Vahedi K, Chodkiewicz JP, Courtheoux P, et al. Familial cavernous malformations in a large French kindred: mapping of the gene to the CCM1 locus on chromosome 7q. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1997;63(1):40–5.
- [25] Biros E, Golledge J. Meta-analysis of whole-genome linkage scans for intracranial aneurysm. *Neurosci Lett* 2008;431(1):31–5.
- [26] Nahed BV, Seker A, Guclu B, Ozturk AK, Finberg K, Hawkins AA, et al. Mapping a Mendelian form of intracranial aneurysm to 1p34.3–p36.13. *Am J Hum Genet* 2005;76(1):172–9.
- [27] Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Takakura K, Hori T, Takeda J, et al. Genomewide-linkage and haplotype-association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7q11. *Am J Hum Genet* 2001;69(4):804–19.
- [28] Ozturk AK, Nahed BV, Bydon M, Bilguvar K, Goksu E, Bademci G, et al. Molecular genetic analysis of two large kindreds with intracranial aneurysms demonstrates linkage to 11q24-25 and 14q23-31. *Stroke* 2006;37(4):1021–7.
- [29] Yamada S, Utsunomiya M, Inoue K, Nozaki K, Inoue S, Takenaka K, et al. Genome-Wide Scan for Japanese Familial Intracranial Aneurysms Linkage to Several Chromosomal Regions. *Circulation* 2004;110(24):3727–33.
- [30] Roos YBWM, Pals G, Struycken PM, Rinkel GJE, Limburg M, Pronk JC, et al. Genome-wide linkage in a large Dutch consanguineous family maps a locus for intracranial aneurysms to chromosome 2p13. *Stroke* 2004;35(10):2276–81.
- [31] Farnham JM, Camp NJ, Neuhausen SL, Tsuruda J, Parker D, MacDonald J, et al. Confirmation of chromosome 7q11 locus for predisposition to intracranial aneurysm. *Hum Genet* 2004;114(3):250–5.
- [32] Mineharu Y, Inoue K, Inoue S, Yamada S, Nozaki K, Hashimoto N, et al. Model-based linkage analyses confirm chromosome 19q13.3 as a susceptibility locus for intracranial aneurysm. *Stroke* 2007;38(4):1174–8.
- [33] Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 2011;478(7367):103–9.
- [34] Alg VS, Sofat R, Houlden H, Werring DJ. Genetic risk factors for intracranial aneurysms: a meta-analysis in more than 116,000 individuals. *Neurology* 2013;80(23):2154–65.
- [35] Hussain I, Duffis EJ, Gandhi CD, Prestigiacomo CJ. Genome-wide association studies of intracranial aneurysms: an update. *Stroke* 2013;44(9):2670–5.
- [36] Foroud T, Koller DL, Lai D, Sauerbeck L, Anderson C, Ko N, et al. Genome-Wide Association Study of Intracranial Aneurysms Confirms Role of Anril and SOX17 in Disease Risk. *Stroke* 2012;43(11):2846–52.
- [37] Bilguvar K, Yasuno K, Niemelä M, Ruigrok YM, von Und Zu Fraunberg M, van Duijn CM, et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nat Genet* 2008;40(12):1472–7.
- [38] Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Low S-K, Kirschek B, Auburger G, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet* 2010;42(5):420–5.
- [39] Peters DG, Kassam AB, Feingold E, Heidrich-O'Hare E, Yonas H, Ferrell RE, et al. Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodeling. *Stroke* 2001;32(4):1036–42.
- [40] Li L, Yang X, Jiang F, Dusting GJ, Wu Z. Transcriptome-wide characterization of gene expression associated with unruptured intracranial aneurysms. *Eur Neurol* 2009;62(6):330–7.
- [41] Pera J, Korostynski M, Krzyżkowski T, Czopek J, Słowik A, Dziedzic T, et al. Gene expression profiles in human ruptured

- and unruptured intracranial aneurysms: what is the role of inflammation? *Stroke* 2010;41(2):224–31.
- [42] Marchese E, Vignati A, Albanese A, Nucci CG, Sabatino G, Tirpakova B, et al. Comparative evaluation of genome-wide gene expression profiles in ruptured and unruptured human intracranial aneurysms. *J Biol Regul Homeost Agents* 2010;24(2):185–95.
- [43] Roder C, Kasuya H, Harati A, Tatagiba M, Inoue I, Krischek B. Meta-analysis of microarray gene expression studies on intracranial aneurysms. *Neuroscience* 2012;201:105–13.
- [44] Boileau C, Guo D-C, Hanna N, Regalado ES, Detaint D, Gong L, et al. TGF β 2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat Genet* 2012;44(8):916–21.
- [45] Zhang L, Chen LH, Wan H, Yang R, Wang Z, Feng J, et al. Exome sequencing identifies somatic gain-of-function PPM1D mutations in brainstem gliomas. *Nat Genet* 2014;46(7):726–30.
- [46] Foroud T, FIA Study Investigators. Whole exome sequencing of intracranial aneurysm. *Stroke* 2013;44(6 Suppl 1):S26–8.

d) Séquençage d'exome et anévrismes intracrâniens

Depuis ce dernier article en 2015, quatre études ont été publiées suite à l'application du séquençage d'exome sur des formes familiales d'AIC.

En 2013, le consortium FIA a publié un article rapportant l'usage d'une stratégie d'exomes equencing sur des formes familiales d'AIC. Le séquençage de 50 exomes chez des patients issus de 7 familles a abouti à la sélection de 96 gènes sans plus d'information dans cet article (69). Deux ans après, la même équipe publie les résultats de cette stratégie génétique appliquée aux AIC dans ces 7 familles (70).

Le filtrage des variations autosomiques s'est attaché à retenir les variations non synonymes, rares ($MAF < 1\%$) dans les bases de données en ligne (1000G et EVS) disponibles au moment ce travail et une base donnée locale de 260 exomes. Un filtrage sur les effets protéiques supposés de la variation a aussi été appliqué (au moins « damaging » dans SIFT ou poplyphen2). Les variations ont été retenues quand elles étaient retrouvées chez l'ensemble des patients atteints d'AIC au sein d'une même famille, c'est-à-dire que la présence d'une phénocopie conduisait à l'élimination du gène en question.

Pour filtrer les variations et étudier la ségrégation au sein des familles, les patients ont été considérés comme sain s'il n'était pas porteur d'AIC à 45 ans. Une étude de liaison paramétrique a été menée dans chacune de ces familles. Chaque variation sélectionnée suite au séquençage d'exome a été annotée par le LOD score maximal dans une fenêtre de 10Mb autour de ce dernier. Pour conclure cette stratégie complexe de filtrage, une étude d'expression sur 22 AIC rompus, 21 non rompus et 16 contrôles (artères piales de régions épileptogènes) a été menée sur des patients indépendants de ces familles. A

l'issue de ces étapes et sur les 68 gènes sélectionnés, seul *TMEM132B*, un gène mal caractérisé, est surexprimé de manière significative dans les tissus anévrismaux. (70).

Yan et al. ont publié dans *stroke* en 2015 les résultats de leur étude portant sur 12 familles chinoises (71). Le premier filtre appliqué est un filtre de fréquence en population de 5% (MAF<5%). Les variations sélectionnées sont celles présentes dans « au moins une » des 12 familles. Par la suite, des filtres de prédiction protéique et dans Gene Ontology sont appliqués pour ne conserver que 10 variations. Ces 10 variations retenues sont étudiées successivement dans une cohorte de réplique de 24 familles porteuses d'AIC, de 426 cas sporadiques d'AIC et de 1500 contrôles. L'hypothèse est donc qu'une même variation et non pas un gène puisse être responsable de la pathologie dans ces différentes familles. Au final, les variations présentes dans *ADAMTS15* et *FILIP1L* semblent significativement plus fréquentes dans la population des AIC familiaux que dans la population contrôle. En revanche, aucune différence n'est observée entre cette fréquence dans la population des AIC sporadiques et dans la population contrôle.

Zhou et al. ont récemment aussi appliqué une stratégie de séquençage d'exome sur 6 familles franco-canadiennes porteuses d'AIC (72). L'étude s'est en revanche focalisée sur la recherche de variations rares qui puissent expliquer l'agrégation de cas d'AIC au sein de ces familles. Leur analyse révèle un enrichissement en variations rares dans le gène codant pour laring finger protein 213 (*RNF213*). Le criblage de ce gène dans une cohorte plus large de cas sporadiques et l'étude d'association supportent cette hypothèse. Ce gène serait impliqué dans le développement de la maladie Moya Moya dans les populations japonaises (73). Tout comme dans l'article de Yan et al, les variations sélectionnées sont celles présentes dans « au moins deux » des 6 familles, et 16 des 26 patients porteurs d'AIC atteints dans ces familles ne présentent pas de variations dans *RNF 213*.

A ce jour, l'étude qui semble la plus intéressante au sujet de la génétique et de la physiopathologie anévrismale a été publiée dans Stroke en 2016 (74). Santiago Sim et al. ont étudié une famille de 35 individus franco-canadiens. En 2009, une étude de liaison avait retrouvé un locus de susceptibilité en 13 q14-21 au sein de cette famille (75).

Parmi les 9 porteurs d'AIC dans cette famille, deux individus ont bénéficié du séquençage d'exomes. 53 variations rares (MAF < 0.01%) et non synonymes sont partagées par ces 2 individus. De manière très intéressante, l'une de ces mutations touche l'ensemble des 9 patients atteints d'AIC et épargne les 26 non porteurs d'AIC. Cette mutation non-sens, touche le gène *THSD1*. Cette mutation est rare puisque absente de la base de données ExAC (Cambridge, MA, exac.broadinstitute.org/) et dans une cohorte de 300 contrôles recrutés dans leur étude. Ce gène a donc été passé au crible chez 500 patients porteurs d'AIC et 7 autres variations faux sens et rares ont été mis en évidence.

L'étude fonctionnelle de ce gène, révèle une expression dans la cellule endothéliale vasculaire du modèle murin. Les zebrafish qui ont subi une inactivation de ce gène par injection d'un oligonucléotide ciblant un site d'épissage de *THSD1* orthologue, présentent des hémorragies intracrâniennes sous 48h.

Toutefois, malgré une imagerie magnétique haute résolution 9,4 Tesla et l'étude histologique, aucun AIC n'a été mis en évidence dans le modèle murin ou le zebrafish.

3. UNPRIMUM MOVENS MECONNU

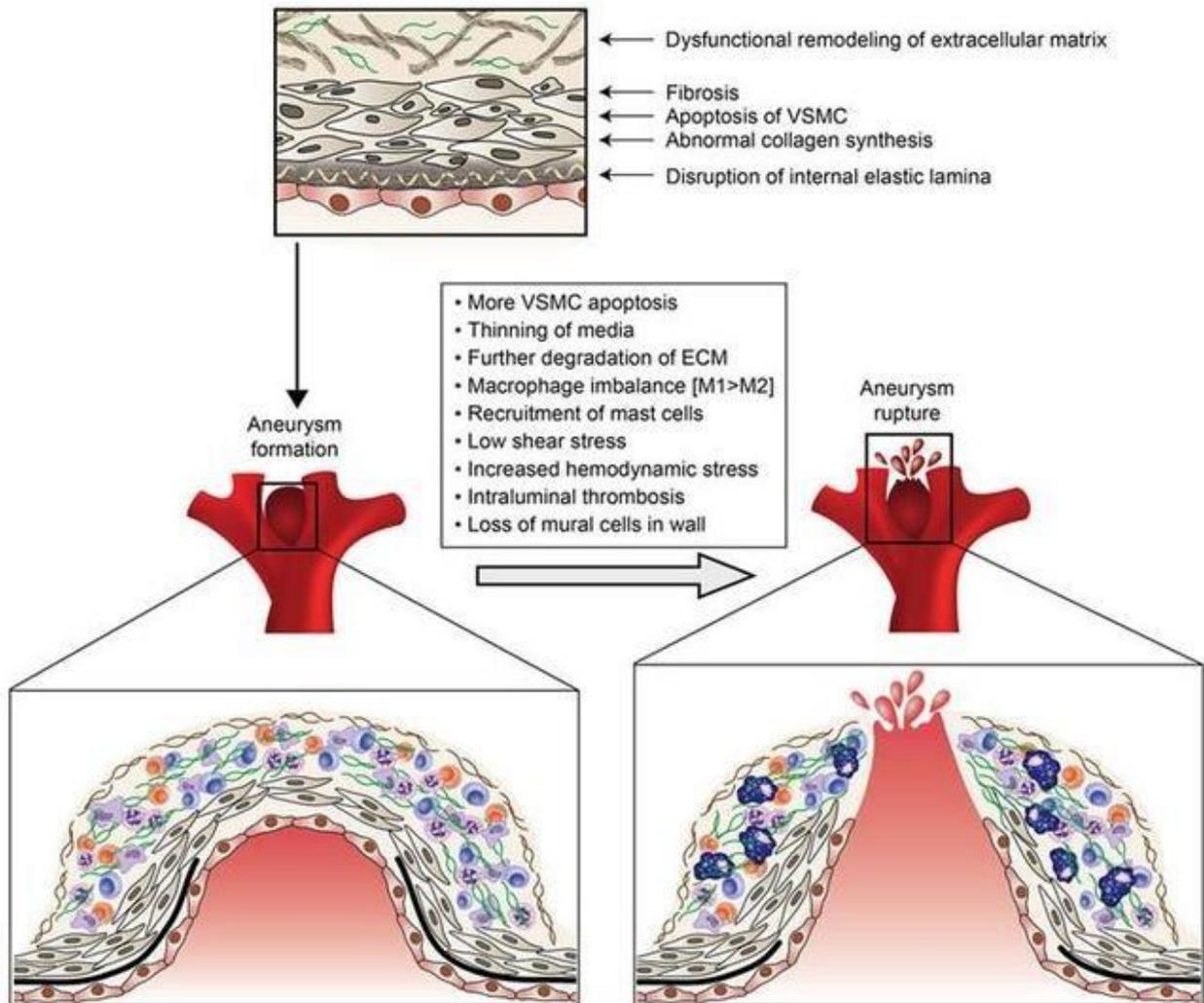


Figure 7 : Formation et rupture d'un AIC d'après Chalouhi et al.(76)

La physiopathologie des AIC est méconnue, notamment en raison de l'absence de modèles animaux pertinents. En effet, l'exploration de ces mécanismes utilise essentiellement des modèles de fragilisation de la paroi vasculaire par injection intracisternale d'élastase chez le rat ou la souris, associée à une augmentation des contraintes hémodynamiques par l'induction d'une hypertension artérielle. Si ce modèle résulte en une désadaptation pariétale pathologique à un stress hémodynamique et offre un bon modèle d'étude des traitements implantables des AIC, il permet difficilement d'explorer les mécanismes à l'origine de la formation des AIC (77).

Les données histologiques d'AIC, rompus ou non, opérés chirurgicalement, mettent en évidence une certaine hétérogénéité. L'élément commun est la rupture de la limitante élastique interne (78). L'initiation de la formation des AIC serait liée à une dysfonction endothéliale et des cellules musculaires lisses en réponse à un stress hémodynamique (76). Les forces de cisaillements parallèles à la paroi (shear stress) peuvent induire une surexpression du stress oxydant dans les cellules musculaires lisses par l'activation de NF-kappaB(79). Une prédisposition à la dilatation artérielle associée à une surexpression des voies du stress oxydant pourrait ainsi favoriser la formation anévrismale (80). Chez l'animal, l'augmentation du stress hémodynamique au niveau d'une bifurcation carotidienne induit à ce niveau un remodelage de la paroi artérielle ayant les caractéristiques initiales des AIC (81).

Cette désadaptation endothéliale dont les mécanismes physiopathologiques sont encore inconnus, provoque une réponse de type inflammatoire et une modification des phénotypes cellulaires de la paroi. Les jonctions serrées endothéliales sont rompues à la phase initiale de la formation, augmentant la perméabilité de l'endothélium et favorisant l'infiltration macrophagique(82). Les cellules musculaires lisses se différencient pour migrer, et proliférer entraînant une hyperplasie myo-intimale.

Dans la lésion pré-anévrismale un thrombus pariétal se forme et va, tout comme dans les anévrismes aortiques, avoir une action cytotoxique sur la paroi anévrismale (83,84). Les protéinases comme les Métallo protéinase 2 sont secrétées par les cellules musculaires lisses et dégradent la matrice extra cellulaire ainsi que la limitante élastique interne, provoquant la formation d'un sac anévrismal. Ce processus peut se poursuivre par une apoptose des cellules musculaires lisses accentuant l'amincissement de la paroi, pouvant alors conduire à la rupture(85).

a) Etudes des interactions environnementales avec les anévrismes intracrâniens

Il est important de noter que les facteurs environnementaux agissent sur le risque de rupture mais aussi sur le risque de présence d'AIC. Vlak et al. ont en 2013 réalisé une étude sur 216 AIC non rompus et 574 contrôles (86). Ils ont confirmé que le tabac et l'HTA étaient d'importants facteurs mais surtout que leur effets étaient multiplicatifs pour atteindre un Odds ratio (OR) de 8 (alors que le tabac seul = 3 et l'HTA = 2,9). Ces mécanismes physiopathologiques n'expliquent cependant pas, à eux seuls, pourquoi certaines personnes présentent une dysfonction endothéliale et développent des AIC, tandis que d'autres soumis aux mêmes facteurs de risque environnementaux en sont indemnes.

b) Epigénétique et anévrismes intracrâniens

Les études transcriptomiques mettent en évidence des modulations de l'expression de certains gènes probablement dues aux facteurs environnementaux. Ces effets peuvent être transmis par l'intermédiaire des mécanismes d'épigénétique. Ces mécanismes regroupent principalement l'action des miRNA, des long non-coding RNA, l'acétylations des histones et la méthylation de l'ADN.

Une étude récente sur 20 patients opérés d'AIC a analysé 485 000 sites de méthylation sur micro arrays(87). Les gènes d'intérêts ont été sélectionnés dans Gene Ontology et Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome afin de réaliser une étude en clusters. 14 gènes sont apparus comme différentiellement exprimés entre les tissus AIC et les tissus témoins (artères temporales). Ces gènes sont impliqués dans les voies NF- κ B, JAK-STAT, et ERK/JNK. Mais comme souvent dans ce type d'étude, l'absence de vaisseaux cérébraux artériels intracrâniens comme tissus témoins constitue un biais majeur.

De nombreuses études se sont intéressées aux miRNA. Le miRNA 370 3p, miRNA 29a et 29b mais aussi les miRNA 143/145, ont montré des taux sanguins ou d'expression tissulaire modulés chez des patients porteurs d'AIC (88–90). Sima et al. ont très récemment étudié des polymorphismes situés sur les promoteurs des miRNA 143/145 sur 565 patients AIC et 622 témoins (91). Ils ont montré que les rs4703342 et rs4703343 étaient associés à une baisse de l'expression de ces derniers liés à un plus faible risque d'AIC (étude d'association).

Enfin, une étude récente sur 12 patients porteurs d'AIC et 12 tissus témoins s'est intéressée aux long non coding RNA (92). Cette étude a montré une expression différentielle entre les deux tissus sur 1,150 long non coding RNA et 286 miRNA avant de regrouper *in silico*, ces derniers dans un réseau (competing endogenous RNA) grâce à Gene Ontology et Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome. Les réseaux ainsi mis en évidence sont impliqués dans les phénomènes d'adhésion focale et de contraction des fibres musculaires lisses. Cependant, le long non-coding RNA qui a suscité le plus d'intérêt dans la pathologie anévrismale intracrânienne reste ANRIL évoqué plus haut au sujet des GWAS (61).

c) Transcriptome, expression et anévrismes intracrâniens

Les études de transcriptomique portent le plus souvent sur l'étude des AIC rompus comparés aux AIC non rompus. Ces études se heurtent principalement à la mise en évidence de voies de signalisation activées en conséquence de la rupture et non l'inverse.

Pour les études qui visent à analyser l'expression des gènes dans les tissus anévrismaux non rompus, le principal problème réside, encore une fois, dans la difficulté à obtenir un tissu contrôle pertinent. En effet, la plupart de ces études se contente d'étudier les niveaux d'expression des gènes dans le tissu anévrisimal comparé aux artères temporales (n'ayant ni la même histologie ni la même physiologie que les artères intracrâniennes).

En 2012, une méta-analyse a combiné les résultats de cinq études d'expression regroupant 30 cas d'AIC rompus et 30 cas d'AIC non rompus. Cette analyse retrouve 7 gènes (*BCL2*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *CXCL12*, *TIMP4*, et *TNC*) dont l'expression est modifiée dans au moins quatre des cinq études et qui pour la plupart sont liés à la matrice extracellulaire (93).

Une récente étude de 2016 a inclus 22 AIC rompus, 22 AIC non rompus et 16 contrôles issus d'artères corticales prélevées lors de chirurgies d'épilepsie. Les gènes différentiellement exprimés étaient ceux des voies lysosomales et de l'immunité entre les AIC rompus et non rompus. D'autre part, entre AIC et contrôles, les gènes différentiellement exprimés étaient encore une fois en lien avec la matrice extracellulaire (94).

Une étude a analysé le transcriptome dans le sérum (et non dans le tissu anévrismale) de 119 patients aux antécédents d'AIC rompu comparé à 118 contrôles. L'intérêt de

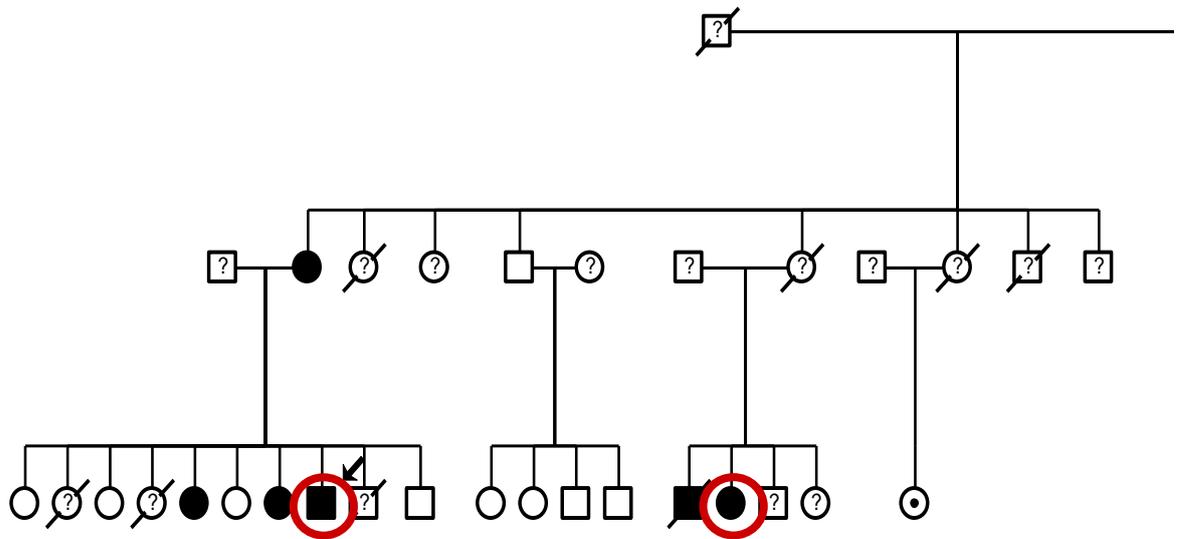
cette étude réside dans le mode de recrutement des contrôles (95). Ils l'ont été le même jour que les cas atteints et en moyenne 2 ans après l'hémorragie. Ces témoins étaient souvent les conjoints des cas donc sans lien de parenté mais avec même mode de vie. Aucun cluster surexprimé n'est apparu dans cette étude.

II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

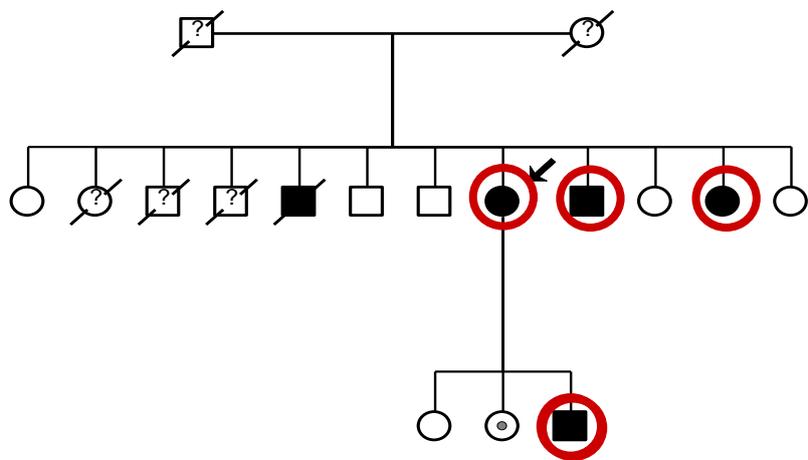
A. GAIA : UNE ETUDE CENTREE SUR LES FORMES FAMILIALES D'ANEVRISMES INTRACRANIENS

Le projet GAIA a recruté dans les régions Ouest puis Centre de la France plus de 110 noyaux familiaux répondant à la définition des formes familiales d'AIC (au moins 2 apparentés présentant un AIC certain et reliés aux 1^{ers} degrés). Le réseau GAIA était constitué des CHU de Angers, Bordeaux, Créteil, Nantes, Poitiers, Rennes, Tours.

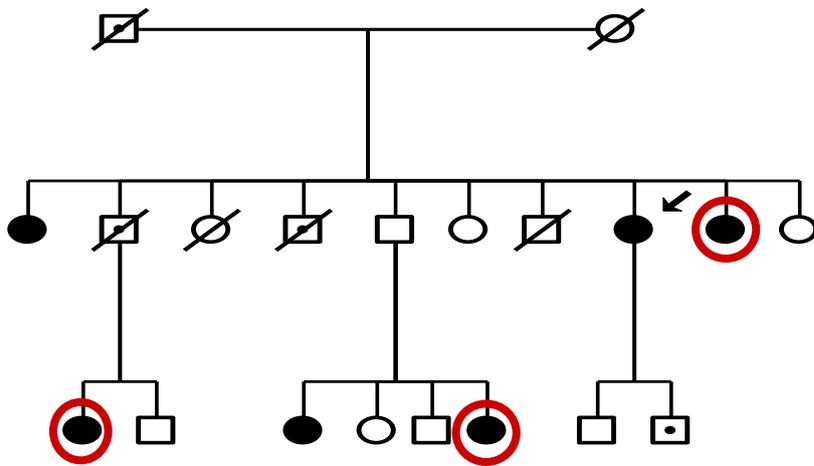
Plus de 400 IRM de dépistage ont été réalisées autour de ces noyaux familiaux afin de définir le phénotype des apparentés. Au final, 4 familles (cf. Figure 8), ont été sélectionnées car elles présentaient plus de 4 porteurs d'AIC vivants sur plusieurs générations. Le séquençage de 11 patients au sein de ces familles a été effectué.



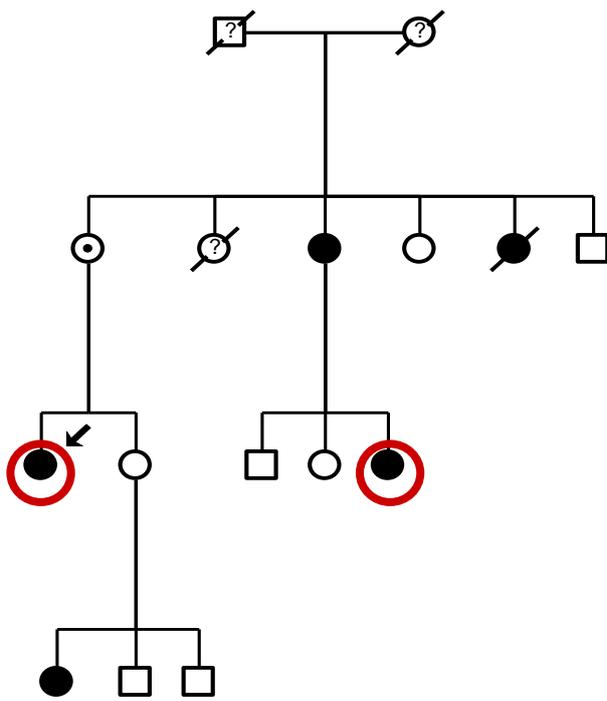
Famille 40125



Famille 39501



Famille 39423



- Homme porteur d'AIC
- Homme sans AIC
- Femme porteuse d'AIC
- Femme sans AIC
- ⊙ Phénotype inconnu
- ∅ Patient décédé
- ⊙ Phénotype incertain
- ↙ Propositus
- Patient ayant bénéficié du séquençage d'exome
- + Patient porteur de l'allèle
- Patient non porteur de l'allèle

Famille 39458

Figure 8 : Familles recrutées dans le cadre de GAIA et sélectionnées pour le séquençage d'exome.

Nous avons choisi deux patients atteints d'AIC et les plus éloignés possibles pour réaliser le séquençage d'exome. Ces patients sont entourés sur les arbres. Deux familles particulièrement informatives provenaient de la partie Ouest de la Vendée sont représentées sur la figure 8.

1. ANALYSE DE LA FAMILLE 39548 : *ANGPTL6* UN GENE CANDIDAT EN LIEN AVEC LA FORMATION DES ANEURISMES INTRACRANIENS

La première famille (39458) était issue de la région de Challans en Vendée (85). Cette famille présentait 5 cas d'AIC sur trois générations. L'ADN des patients indemnes d'AIC dans cette famille a aussi été prélevé. L'analyse des variations génétiques partagées dans cette famille a conduit à la rédaction de l'article suivant.

Peu d'équipes ont appliqué une stratégie de séquençage d'exome sur des formes familiales d'AIC. En 2015, le consortium FIA a publié les résultats de cette stratégie génétique appliquée aux AIC dans ces 7 familles (70). Pour filtrer les variations et étudier la ségrégation au sein des familles, les patients ont été considérés comme sain s'il n'était pas porteur d'AIC à 45 ans. Si on en réfère à la courbe de survenue des AIC en fonction de l'âge dans la méta-analyse publiée par Vlak et al. en 2011 dans le Lancet, cette stratégie est très critiquable. En effet, après 50 ans, un nouveau pic d'incidence s'individualise (11).

La stratégie complexe de filtrage a été enrichie dans cette étude par l'analyse d'expression sur 22 AIC rompus, 21 non rompus et 16 contrôles (artères piales de régions épiléptogènes), mais sur des patients indépendants de ces familles. En effet, il

serait sans doute très intéressant de pouvoir confronter les résultats d'une stratégie de filtration d'exome avec les niveaux d'expression tissulaire dans la paroi anévrismale chez les mêmes patients. A ce jour, ce travail n'a pu être réalisé mais dans une certaine mesure, la mise en évidence dans notre article, d'une baisse de la sécrétion d'Angptl6 dans le sang des patients présentant une variation du gène *ANGPTL6* constitue une validation de l'expression phénotypique de ces variations.

Dans l'article de Farlow et al. sur les 68 gènes sélectionnés, seul *TMEM132B*, un gène mal caractérisé, est surexprimé de manière significative dans les tissus anévrismaux. Il est important de noter que ce gène a passé les filtres de cette étude malgré l'absence de variation chez un patient avec un phénotype décrit comme « incertain ». En d'autres termes, ce patient présente un AIC de 2 mm, ce qui constituerait pour nous une phénocopie et discréditerait fortement le gène en question. Au final, le titre de cet article résume bien le sentiment d'échec des auteurs et la déception quant à l'usage de cette stratégie d'exome chez les formes familiales d'AIC : "Lessons learned from whole exome sequencing in multiplex families affected by a complex genetic disorder, intracranial aneurysm." (70).

Yan et al. ont publié dans *stroke* en 2015 les résultats de leur étude portant sur 12 familles chinoises (71). On peut noter qu'une seule de ces familles présente deux cas de patients porteurs d'AIC chez des cousins (partageant donc seulement 1/32 de leur patrimoine génétique). Cette configuration favorise pourtant le filtrage et la sélection des variations d'intérêt pour la pathologie. La stratégie de filtrage de cette équipe est étonnante, car appliquant une stratégie d'exome, visant plutôt à rechercher des variations rares, elle applique des filtres de relative grande fréquence. En effet, le premier filtre appliqué est un filtre de fréquence en population de 5% ($MAF < 5\%$). D'autre part, les variations sélectionnées sont celles présentes dans « au moins une » des 12 familles, ce qui n'exclut pas la présence de phénocopie (ainsi seule une variation dans *GPR63* coségrège parfaitement dans 2 familles). Par la suite, des filtres de prédiction

protéique et dans Gene Ontology s'appuyant donc sur des suppositions fonctionnelles et physiopathologiques sont appliqués pour ne conserver que 10 variations.

Ces 10 variations retenues sont étudiées successivement dans une cohorte de réplication de 24 familles porteuses d'AIC, de 426 cas sporadiques d'AIC et de 1500 contrôles. L'hypothèse est donc qu'une même variation et non pas un gène puisse être responsable de la pathologie dans ces différentes familles.

Zhou et al. ont appliqué une stratégie similaire (72). L'étude s'est en revanche focalisée sur la recherche de variations rares qui puissent expliquer l'agrégation de cas d'AIC au sein de ces familles. Tout comme dans l'article de Yan et al, les variations sélectionnées sont celles présentes dans « au moins deux » des 6 familles et 16 des 26 patients atteints dans ces familles ne présentent pas de variations dans *RNF 213*.

Dans notre travail nous mettons en évidence le rôle potentiel d'Angptl6 dans la formation des AIC. Angptl6 est une protéine membre de la famille des Angptl qui possède des propriétés pro-angiogéniques attribuées à son domaine fibrinogène-like en C terminal (96). Angptl6 (ou AGF : angiopoïetin-related growth factor) appartient à la famille des protéines angiopoïetin-like constituées de 8 membres, de glycoprotéines sécrétées, ayant une homologie de séquence avec les angiopoïétines (97). A la différence de ces dernières elles ne se lient pas aux récepteurs endothéliaux Tie1 et Tie 2, couplés à des protéines kinases. Elles présentent une double fonction, métabolique et angiogénique portée respectivement par leur domaine N terminal (coiled-coiled) et leur domaine C terminal comportant un domaine fibrinogène-like (98). Le rôle angiogénique de l'extrémité C terminale a notamment été mis en évidence chez Angptl 3, par son interaction avec les intégrines $\alpha 5 \beta 3$, stimulant la migration cellulaire (99).

Chez l'homme, Angptl6 est une protéine circulante sécrétée par le foie. Son taux sérique varie en fonction du métabolisme lipidique et glucidique, il est notamment

corrélé à l'insulino-résistance (100). Son taux serait également augmenté au cours de la pré-éclampsie ou du syndrome des ovaires polykystiques(101,102).

Angptl6 aurait un rôle pro-angiogénique. Elle stimulerait la migration endothéliale et augmenterait la perméabilité vasculaire par sa liaison au intégrines grâce à son domaine RGD-binding integrin situé à son extrémité C terminale (96,103,104). Dans un modèle animal d'ischémie des membres inférieurs, Angptl6 favorise l'angiogenèse par la voie de signalisation ERK1/2-eNOS-NO (103). Enfin les souris knockout n'exprimant pas Anptl6 présentent une mortalité in utero de 80% par agénésie cardiovasculaire et les souris survivantes présentent une obésité associée à une insulino-résistance (105).

Les résultats obtenus montrent qu'il existe un taux sérique d'Angptl6 significativement inférieur chez les membres porteurs hétérozygotes. Or, nous remarquons que les taux sériques moyens sont diminués de moitié dans ce groupe de sujets. Cela soulève donc l'hypothèse de l'absence de sécrétion de la protéine Angptl6K460*chez ces patients. Au sein du segment tronqué de 11 acides aminés se trouve une proline en position 468. Du fait de sa structure moléculaire, cet acide aminé peut jouer un rôle dans la conformation et le repliement de la protéine. Ainsi la perte de cette proline par la troncation pourrait modifier la structure de la protéine et la rendre sensible aux processus de dégradation.

Il semble donc que Angptl6 K460* soit absente du sérum de membres porteurs d'une variation génétique, les modifications fonctionnelles endothéliales seraient donc liées uniquement à une haplo insuffisance. Le modèle murin de type Knock-in permettra de réaliser une analyse in vivo de la vascularisation artérielle cérébrale chez la souris mutée sur les effets développementaux d'une telle haplo insuffisance.

2. MANUSCRIT EN RELECTURE À L'AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS :

Rare Coding Variants in *ANGPTL6* and Familial Forms of Intracranial Aneurysm

Romain Bourcier^{1,2}, Solena Le Scouarnec², Stéphanie Bonnaud^{2,4}, Matilde Karakachoff^{2,4}, Emmanuelle Bourcereau⁴, Sandrine Heurtebise Chrétien², Céline Menguy², Christian Dina^{2,4}, Floriane Simonet^{2,4}, Alexis Moles³, Cédric Lenoble¹, Pierre Lindenbaum², Stéphanie Chatel^{2,4}, Bertrand Isidor⁵, Jean-Jacques Schott^{2,4}, Hervé Le Marec^{2,4}, ICAN Study Group, Gervaise Loirand^{2,4,6}, Hubert Desal^{1,2,6,*}, Richard Redon^{2,4,6,*}.

¹ *Department of Neuroradiology, CHU Nantes, France*

² *INSERM, CNRS, UNIV Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France*

³ *Department of Neurosurgery, CHU Nantes, France*

⁴ *CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France*

⁵ *Department of Medical Genetics, CHU Nantes, France*

⁶ *These authors contributed equally to this work*

*Correspondence: hubert.desal@chu-nantes.fr (H.D.), richard.redon@inserm.fr (R.R.)

Abstract

Intracranial aneurysms (IA) are acquired cerebrovascular abnormalities characterized by a localized dilation and wall thinning in intracranial arteries. The main IA complication is the rupture, resulting in subarachnoid haemorrhage and possibly leading to severe outcome. IA pathogenesis is still largely unknown, with no reliable risk marker available so far. Here we have identified one rare nonsense variant (1617A>T) in the last exon of the *Angiopoietin-Like 6 (ANGPTL6)* gene, shared by the 4 tested affected members from a large pedigree with multiple IA carriers. We have showed a reduction by half of ANGPTL6 serum concentration in heterozygous 1617A>T carriers compared to their non-carrier relatives, due the inability of the truncated protein (K460*-ANGPTL6) produced by the transcripts carrying the 1617A>T variant to be secreted. By extending genetic screening to 94 additional index cases with familial IA, we then identified 3 other rare missense or frameshift variants in *ANGPTL6*, carried by 5 patients. We observed a significant enrichment ($p=0.0004$) in rare coding variants within this gene among the 95 index cases with familial IA, compared to a reference population of 63,339 Non-Finnish European individuals. In total, among the 6 corresponding families, 12 out of 13 (92%) individuals carrying IA also carry such variants in *ANGPTL6*, *versus* 15 out of 41 (37%) unaffected ones. At last, we noticed a higher rate of individuals with a history of high blood pressure among affected *versus* healthy carriers of *ANGPTL6* variants, suggesting that ANGPTL6 could trigger lesions in the cerebral arterial wall when challenged by risk factors such as hypertension. Altogether, our results indicate that rare coding variants in *ANGPTL6* are causally related to familial forms of IA.

Introduction

Intracranial aneurysms (IA) are acquired cerebrovascular abnormalities affecting 3% of the general population [mean age 50 years] (1). They are characterized by a localized dilation and wall thinning in typical locations in intracranial arteries (2). The most notorious and deleterious complication of an IA is the rupture, resulting in subarachnoid haemorrhage that can lead to severe disability and death (3). Neither reliable biomarkers nor diagnostic tools are currently available to predict IA formation or evolution. Current treatments are mostly invasive and rely on microsurgical or endovascular treatment with a risk of procedural morbidity or mortality (4).

Although the pathogenesis of IA has been the subject of several studies for many years, the mechanisms underlying their formation, growth and eventual rupture remain largely unknown (5). IA are mostly acquired lesions resulting from a defective vascular wall response to local hemodynamic stress (6). The structural deterioration of the arterial wall involves inflammation and tissue degeneration with degradation of the extracellular matrix and smooth muscle cell apoptosis (7). Risk factors such as hypertension, female sex, increasing age, cigarette smoking, excessive alcohol consumption and familial history of aneurysm predispose to IA formation and rupture (8). Furthermore, increasing evidence suggests a genetic component of IA formation (9). Genome-wide association studies and subsequent case-control replication analyses have identified common risk alleles for IA formation, in particular on chromosome 9 within the cyclin-dependent kinase inhibitor 2B antisense inhibitor gene, on chromosome 8 near the *SOX17* transcription regulator gene, and on chromosome 4 near the endothelin receptor A gene (10). However, these loci altogether may only explain c. 5% of familial risk in Europe and Japan (11).

Whole-exome sequencing approaches have recently been applied to families with multiple IA

carriers, leading to the identification of new susceptibility genes for IA pathogenesis, such as *RNF213* (12) or *THSD1* (13). While the Ring Finger Protein 213 had been previously involved in vascular-wall construction (14,15), inactivation of the Thrombospondin Type 1 Domain Containing Protein 1 has been reported to impair the adhesion of endothelial cells to the extracellular matrix, and to cause cerebral bleeding and increased mortality in zebrafish and mice (13). These recent advances provide new insights into the pathophysiology of IA, and demonstrate the usefulness of familial approaches based on whole-exome sequencing to improve knowledge on the molecular mechanisms underlying IA formation and rupture.

In the present study, by combining whole-exome sequencing, identity-by-descent (IBD) analysis, gene burden testing and functional investigations, we identified rare coding variants in the *Angiopoietin-Like 6* gene (*ANGPTL6*) as causally related to familial forms of IA.

Material and Methods

Clinical recruitment

Familial cases of IA are defined as at least two first-degree relatives both diagnosed with typical IA (defined as a saccular arterial dilatation of any size occurring at a bifurcation of the intracranial vasculature), without any age limitation. Index cases and their relatives were recruited following the French ethical guidelines for genetic research, and under approval from the French Ministry of Research (n° DC-2011-1399) and the local ethical committee. Informed written consent was obtained from each individual agreeing to participate in the genetic study, to whom MRI screening and blood sampling were proposed.

The full recruiting process has been described previously (16). Briefly, neuroradiological phenotyping was performed in each recruiting center by interventional neuroradiologists, neurologists and neurosurgeons in order to recruit only the typical saccular bifurcation IA. Mycotic, fusiform-shaped or dissecting IA were systematically excluded, as well as IA in relation with an arteriovenous malformation and IA resulting from syndromic disorders such as Marfan disease or vascular forms of Ehlers Danlos. Eye fundus, transthoracic echocardiography, non-invasive analysis of endothelial dysfunction, and echography Doppler analysis of peripheral arteries (sub clavians, radials, femorals, renals, and digestives) were carried out to check for any other vascular malformation or variation potentially linked to the presence of IA, thus constituting a syndrome yet unknown.

Whole Exome Sequencing (WES)

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using the NucleoSpin[®] Blood kit XL (Macherey Nagel, Germany). Briefly, coding exons from 3 µg of genomic DNA were captured using the SureSelect Human All Exon V4+UTR Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), following the manufacturer's protocol. DNA was sheared by

acoustic fragmentation (Bioruptor Diagenode) and purified with the magnetic beads Agencourt AMPure XP (Beckmann Coulter genomics), and fragment quality was assessed (Tapestation 2200 Agilent). Exome-enriched genomes were paired-end sequenced (100-bp reads) on Illumina HiSeq 1500 (Illumina Inc, San Diego, CA) to mean depth coverage above 30x. Sequence reads were mapped to the human reference genome (Broad Institute human_g1k_v37) using the Burrows-Wheeler Aligner (17). Duplicates were flagged using Picard software. Duplicates Reads were realigned and recalibrated using the Genome Analysis Toolkit (GATK) (18). Variant detection was performed with GATK Hapcaller. Functional annotation of high-quality variants was performed using SnpEff 3.4 and Ensembl VEPv7.4. The sequencing quality was determined with the Depth Of Coverage Walker provided in GATK. Knime4Bio (19) was used for all merging and filtering steps. Variants with a sequencing depth of less than 10 or a genotype quality below 90 were excluded, as well as synonymous variants with no predicted effect on splicing sites. At last, from the resulting set of 'functional' variants (as reported in Figure 1), we filtered out any variant with a minor allele frequency (MAF) higher than 0.1% in the non-Finnish European (NFE) population from the ExAC database, as well as few remaining variants reported with a minor allele frequency (MAF) higher than 10% in our in-house database of 260 whole-exome sequences from patients with various cardiac phenotypes.

Identity-by-descent analysis

SNP genotyping was performed on population-optimized Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1 array plates following the standard manufacturer's protocol. Fluorescence intensities were quantified using the Affymetrix GeneTitan Multi-Channel Instrument, and primary analysis was conducted with Affymetrix Power Tools following the manufacturer's recommendations. After genotype calling, all individuals had a genotype call rate above 97%.

SNPs with an MAF < 10%, a call rate < 95% or with $P < 1 \times 10^{-5}$ when testing for Hardy-Weinberg equilibrium were excluded. IBD estimation was performed with IBDLD v3.34, NoLD method (20). Shared regions were obtained by analyzing a set of independent SNPs ($R^2 < 0.2$) using genotypes from French individuals (21) as a reference panel. The IBD status at every SNP locus was obtained for each pair of individuals, based on a hidden Markov model implemented in the IBDLD program.

Capillary sequencing and burden testing

Validation experiments for each selected variant, familial segregation analyses and further screening for *ANGPTL6* coding mutations were performed by capillary sequencing on an Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer, using standard procedures. Sequences analyses were performed with Seqscape v2.5. Burden test was performed by comparing the proportion of alleles with rare coding variants within the *ANGPTL6* gene carried by AI cases *versus* gnomAD individuals of NFE ancestry (22), through the use of Fisher's exact test.

Expression analyses of ANGPTL6

HEK293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. Stable HEK293 cell lines were obtained by transfection of pcDNA3.1 vector encoding WT-ANGPTL6 and K460*-ANGPTL6 (G418 selection). Recombinant proteins are expressed as Nter-FLAG fusion proteins. In HEK293, recombinant human proteins were detected by both anti-flag and anti-ANGPTL6 antibodies (Adipogen, AB_2490340) and ELISA (kit supplied by Adipogen). In human subjects, serum ANGPTL6 levels were measured by ELISA. For transcript analysis, total RNA from stably transfected HEK293 cells was purified using Trizol (Life technology) according to the manufacturer's instructions then reverse-transcribed. Real-time quantitative

PCR was performed using the TaqMan 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primers used to assess *ANGPTL6* mRNA expression were designed using the Primer Express 3.1 software (sequences available on request).

Results

A non-sense variant in ANGPTL6 shared by family members with IA

The index case of family A (individual III-1; Figure 1A) was diagnosed after a subarachnoid hemorrhage. This event revealed a ruptured anterior cerebral artery aneurysm and a second middle cerebral artery aneurysm (Fig. 1B). She completely recovered from the subarachnoid hemorrhage and because of known familial history of ruptured IA (II-2, II-5), a systematic screening was performed among relatives. This screening diagnosed two IA in his cousins (III-5) and one IA in their niece (IV-1). Individual II-4 had an episode suggestive of aneurysmal SAH at the age of 36, but she died before a CT scan or angiography could be performed. The mother (II-1) of the index case, who carries an ectasia measuring less than 2mm and diagnosed as uncertain (16), was classified as phenotype unknown.

Clinical information was collected for 28 individuals in family A, and DNA was available for 27 of them (DNA was unavailable for II-5 who died in 1974 after a rupture of IA). Individuals with IA (II-2, II-5, III-1, III-5 and IV-1) were all female and IA was diagnosed on a CT angiography or conventional angiography. Details of the family members are shown in Supplemental Table: noteworthy, all IA carriers except IV-1 suffered from high blood pressure.

We combined WES and IBD analysis to identify any rare genetic variant likely explaining this familial case. Whole-exome sequencing applied to the first cousins III-1 and III-5 led respectively to the detection of 25,674 and 23,456 functional sequence variants in comparison to the human reference genome assembly (Figure 1C). After filtering out genetic variants reported with an MAF above 0.1% in the non-Finnish European (NFE) population from the ExAC database, we ended up with 29 rare variants shared between the first cousins, which

were all manually reviewed by visual inspection of sequence reads using the Integrative Genomics Viewer (23).

In parallel, IBD analysis of the complete pedigree identified 12 haplotypes shared by the 4 affected relatives. Within these chromosomal intervals, individuals III.1 and III.5 shared 10 rare, non-synonymous variants (Figure 1C). By capillary sequencing, we determined that the 4 affected relatives share 8 of these variants (Table 1), among which one nonsense variant, 1617A>T (K460*), in the *ANGPTL6* gene.

Reduced ANGPTL6 secretion among heterozygous carriers

ANGPTL6 is one of the eight members of the secreted glycoprotein ANGPTL family, which share a common structure consisting of an amino-terminal coiled-coil domain, a linker region and a carboxy-terminal fibrinogen-like domain. In human, ANGPTL6 is described as a circulating pro-angiogenic factor mainly secreted from the liver (24,25). The 1617A>T *ANGPTL6* variant leads to the occurrence of a premature stop codon in the last exon. The corresponding transcript may thus escape the nonsense-mediated mRNA decay and is predicted to result in a protein truncated by only the last 11 amino acids (K460*-ANGPTL6). To analyze the functional properties of K460*-ANGPTL6, we first aimed at producing the full-length and the truncated protein by establishing stable cell lines expressing wild-type (WT-ANGPTL6) and K460*-ANGPTL6. Cells transfected with plasmids encoding for the WT- and K460*-ANGPTL6 expressed similar levels of transcripts (Fig. 3A). Western blot using anti-flag antibody showed that WT-ANGPTL6 was secreted in the culture medium while K460*-ANGPTL6 was almost not detected in the supernatant of cells transfected with the variant (Fig. 3B). Quantification of ANGPTL6 concentration by ELISA confirmed the significant reduction of the secretion of K460*-ANGPTL6 compared to WT-ANGPTL6 (Fig. 3B). In agreement with this defective secretion, immunofluorescence labeling and

quantification in permeabilized cells clearly showed the retention of K460*-ANGPTL6 in the cytoplasm (Fig 3C). Altogether, these data strongly suggest that the 1617A>T *ANGPTL6* variant leads to the expression of the truncated K460*-ANGPTL6 that is not secreted. Accordingly, subjects heterozygous for the 1617A>T *ANGPTL6* variant are expected to have a decreased level of circulating ANGPTL6. To assess this hypothesis, we performed Elisa to compare the serum concentration of ANGPTL6 in subjects from the same family found to be homozygous for the WT-*ANGPTL6* (n=5) and heterozygous for the 1617A>T *ANGPTL6* (n=7). Results show a 50% reduction in the serum level of ANGPTL6 in heterozygous subjects compared to controls (Fig 3D).

Enrichment in rare coding variants within ANGPTL6 among IA carriers

We then extended genetic screening on the coding portion of *ANGPTL6* to 94 additional index cases with familial IA, and identified five additional patients carrying rare, non-synonymous variants in *ANGPTL6* predicted as damaging *in silico* by PolyPhen-2 and/or SIFT (Table 1): two patients with the same missense mutation in exon 1 leading to the E131V substitution in *ANGPTL6*, one patient with a missense mutation in exon 4 leading to the L348F substitution, and two patients carrying the same CGCGCTGAGCCTCGGCGGA-bp insertion leading to one premature STOP codon in exon 2.

Overall, 17 individuals were diagnosed with certain IA among these six families (Table 1 and Supplemental Table). In total, 12 out of the 13 (92%) family members carrying IA and agreeing to participate in genetic research also carry such variants in *ANGPTL6*, versus 15 out of 41 (34%) unaffected ones. The only affected individual who does not carry any rare coding variant in *ANGPTL6* (III-5, family F) is a young male born in 1963 and presenting with an aneurysm on the anterior communicant artery, with no reported history of smoking, high blood pressure or any relevant associated disease.

Among the remaining 12 patients (median body mass index = 24), 7 (58%) were female, and 7 (58%) carry multiple IA (with a maximum of three). IA is located on the middle cerebral artery bifurcation in 7 cases (58%), on the anterior communicant artery, the anterior cerebral artery and the internal carotid artery in 3 cases (25%), and on the posterior communicant artery in 2 cases (17%). Eight (67%) of these patients had a history of smoking or were current smoker before the IA was discovered, with a median pack/years quantification of 31. Five out of 10 for whom we had the information (50%) have a history of high blood pressure. None are affected by diabetes mellitus, while 4 (33%) were treated by statins for dyslipidemia. Of note, 4 (33%) have reported a weekly alcohol intake above 150g.

To further test the association of *ANGPTL6* rare variants with susceptibility to familial IA, we also compared the proportions of alleles carrying rare, non-synonymous variants across this gene among the 95 index cases enrolled in the present study (6/190 allele counts; 3.16%) versus 63,369 NFE individuals included in the gnomAD database (630/126,738 allele counts; 0.50%), and found a significant enrichment in non-synonymous variants with an MAF below 0.1% in the NFE reference population, among AI cases ($p=0.0004$; OR=6.52).

Discussion

In the present study, we identified one rare nonsense variant, 1617A>T, in the last exon of the *Angiopoietin-Like 6 (ANGPTL6)* gene, which was carried by the 4 tested affected members from a large pedigree with multiple IA carriers. Because (i) the 1617A>T nonsense variant is the only loss-of-function variant shared by all affected members in the family, (ii) it is carried by only 5 out of the 22 unaffected relatives, and (iii) *ANGPTL6* is a functionally relevant candidate for playing a role in IA pathophysiology, we thereafter focused our investigations on this particular gene.

Indeed, members of the *ANGPTL* family have been reported as regulators of angiogenesis through their carboxyl terminus (26). *ANGPTL6* has been identified as a positive mediator for angiogenesis that increases endothelial permeability and stimulates endothelial cell migration (25). Although members of the *ANGPTL* family have also been described as regulators of glucose and lipoprotein metabolisms through their amino terminus (13), a recent large-scale population study showed that *ANGPTL6* does not affect lipoprotein profile (27).

Interestingly, it is known that genes associated with vascular malformations of the brain have demonstrated or plausible roles in angiogenesis and vascular remodelling (28). The development of the vasculature involves both vasculogenesis during embryogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis of the cerebral vasculature occurs outside the brain, followed by capillary sprouting from the perineural plexus to penetrate the neural tube. Growth of the cerebral vasculature then entirely results from angiogenesis that requires vascular endothelial cell proliferation and migration, then vascular stabilization, corresponding to the formation of capillary tubes by endothelial cells and the recruitment of pericytes, the smooth muscle cell precursors, to their walls. All these timely organized events are tightly controlled by angiogenic factors and aberrant expression or function of these mediators, including

ANGPTL6, may lead to abnormal cerebral artery wall formation. For example, defective recruitment of pericytes leads to vessel dilation and microaneurysm (29).

We then extended our genetic screen on *ANGPTL6* to 94 additional index cases with familial IA, and identified additional rare missense or frameshift variants in this gene carried by index cases from five other families (Figure 2 and Table 1). In total, among the 6 families, 12 out of 13 (92%) family members carrying IA also carry such variants in *ANGPTL6*, versus 15 out of 41 (37%) unaffected ones. The only affected individual who does not carry any rare coding variant in *ANGPTL6* (III-5, family F; Figure 2) presents with an IA in the anterior communicating artery, a location where IA have been reported with probably weaker heritability (30,31).

By burden test, we showed a significant enrichment in rare coding variants within this gene in our population of 95 index cases with familial IA, compared to a reference population of 63,339 NFE individuals. This result confirms that rare coding variants in *ANGPTL6* are associated to familial forms of IA.

In human, *ANGPTL6* is described as a circulating protein mainly secreted from the liver and acting as an endocrine factor in the peripheral tissues (32). Here we showed a 50% reduction of *ANGPTL6* serum concentration in heterozygous 1617A>T carriers compared to their non-carrier relatives. We demonstrated that this reduction results from the inability of the truncated protein lacking the last 11 amino acids (K460*-*ANGPTL6*) produced by the transcripts carrying the 1617A>T variant to be secreted. These results thus show that the 1617A>T *ANGPTL6* variant leads to *ANGPTL6* haploinsufficiency, due to the inability of the truncated protein to be secreted.

In this study, we have found a remarkable number of patients (n=15) carrying possibly deleterious variations in *ANGPTL6* but without IA at the moment of the study. Since all affected individuals in our study have been subjected to at least one environmental risk factor,

it is possible that familial rare variants in *ANGPTL6* require additional inauspicious factors to trigger IA development. A prominent and well established environmental factor associated with the IA formation is the history of high blood pressure (8). Indeed, we found in our study a significant difference in the rate of patients with a history of high blood pressure in affected *versus* healthy carriers of *ANGPTL6* variants (Table 2). We hypothesise that *ANPTL6* variants render cerebral arterial wall vulnerable to deformation, thus promoting lesion formation and/or progression, when challenged with other deleterious genetic or environmental factors such as high blood pressure, either through direct mechanical effects on vessel walls or by triggering inflammation. In the present study, we have identified rare coding variants in *ANGPTL6* causally related to IA in six families with multiple affected relatives. Our results point a novel pathogenic pathway for a disease whose etiology is still poorly understood. Currently no blood test has been established to help the diagnosis of IA. Since a circulating form of *ANGPTL6* can be detected, determining a blood level of *ANGPTL6* that can favor IA formation could be of great interest. Developing biomarkers could undoubtedly facilitate early detection and risk assessment of IA. A knock-in mouse model is currently under development in order to address these prominent questions about *ANGPTL6* and IA susceptibility. Discovering genetic risk factors and better understanding the molecular mechanisms responsible for IA formation will be prerequisites for the identification of new therapeutic targets.

Supplemental data

Supplemental data include one table.

Acknowledgments

We are grateful to the members of the genomics and bioinformatics core facilities of Nantes

(Biogenouest) for their expert services. We would like to thank the Genome Aggregation Database (gnomAD) and the groups that provided exome and genome variant data to this resource. A full list of contributing groups can be found at <http://gnomad.broadinstitute.org/about>. This work was supported by the French Regional Council of Pays-de-la-Loire (VaCaRMe program to H.L.M and R.R.), the Fondation Genavie (to G.L. and R.R.), the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR-15-CE17-0008-01 to G.L) and the French Ministry of Health (Clinical trial RC15_0304 to H.D.).

Web resources

Exome Aggregation Consortium (ExAC) Browser: <http://exac.broadinstitute.org>

Genome Aggregation Database (gnomAD) Browser: <http://gnomad.broadinstitute.org>

Picard: <https://github.com/broadinstitute/picard>

Polyphen-2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>

SIFT: <http://sift.jcvi.org>

Snpeff: <http://snpeff.sourceforge.net>

Variant Effect Predictor (VEP): <http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/>

References

1. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2011 Jul;10(7):626–36.
2. Laaksamo E, Ramachandran M, Frösen J, Tulamo R, Baumann M, Friedlander RM, et al. Intracellular signaling pathways and size, shape, and rupture history of human intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 2012 Jun;70(6):1565-1572; discussion 1572-1573.
3. Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, Linn FHH, de Rooij NK, Rinkel GJE. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2009 Jul;8(7):635–42.
4. Pierot L, Spelle L, Vitry F. Immediate clinical outcome of patients harboring unruptured intracranial aneurysms treated by endovascular approach: results of the ATENA study. *Stroke*. 2008 Sep;39(9):2497–504.
5. Huttunen T, von und zu Fraunberg M, Frösen J, Lehecka M, Tromp G, Helin K, et al. Saccular intracranial aneurysm disease: distribution of site, size, and age suggests different etiologies for aneurysm formation and rupture in 316 familial and 1454 sporadic eastern Finnish patients. *Neurosurgery*. 2010 Apr;66(4):631–638; discussion 638.
6. Bacigaluppi S, Piccinelli M, Antiga L, Veneziani A, Passerini T, Rampini P, et al. Factors affecting formation and rupture of intracranial saccular aneurysms. *Neurosurg Rev*. 2014 Jan;37(1):1–14.
7. Frösen J. Smooth muscle cells and the formation, degeneration, and rupture of saccular intracranial aneurysm wall--a review of current pathophysiological knowledge. *Transl Stroke Res*. 2014 Jun;5(3):347–56.
8. Vlak MHM, Rinkel GJE, Greebe P, Algra A. Independent risk factors for intracranial aneurysms and their joint effect: a case-control study. *Stroke*. 2013 Apr;44(4):984–7.
9. Bourcier R, Redon R, Desal H. Genetic investigations on intracranial aneurysm: Update and perspectives. *J Neuroradiol*. 2015 Feb 9;
10. Alg VS, Sofat R, Houlden H, Werring DJ. Genetic risk factors for intracranial aneurysms: A meta-analysis in more than 116,000 individuals. *Neurology*. 2013 Jun 4;80(23):2154–65.
11. Yasuno K, Bakircioğlu M, Low S-K, Bilgüvar K, Gaál E, Ruigrok YM, et al. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Dec 6;108(49):19707–12.
12. Zhou S, Ambalavanan A, Rochefort D, Xie P, Bourassa CV, Hince P, et al. RNF213 Is Associated with Intracranial Aneurysms in the French-Canadian Population. *The American Journal of Human Genetics*. 2016 Nov;99(5):1072–85.

13. Santiago-Sim T, Fang X, Hennessy ML, Nalbach SV, DePalma SR, Lee MS, et al. *THSD1* (Thrombospondin Type 1 Domain Containing Protein 1) Mutation in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2016 Dec;47(12):3005–13.
14. Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22542.
15. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*. 2011 Jan;56(1):34–40.
16. Bourcier R, Chatel S, Bourcereau E, Jouan S, Marec HL, Daumas-Duport B, et al. Understanding the Pathophysiology of Intracranial Aneurysm: The ICAN Project. *Neurosurgery*. 2017 Apr 1;80(4):621–6.
17. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010 Mar 1;26(5):589–95.
18. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010 Sep;20(9):1297–303.
19. Lindenbaum P, Le Scouarnec S, Portero V, Redon R. Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinformatics*. 2011 Nov 15;27(22):3200–1.
20. Han L, Abney M. Identity by descent estimation with dense genome-wide genotype data. *Genetic Epidemiology*. 2011;n/a-n/a.
21. Karakachoff M, Duforet-Frebourg N, Simonet F, Le Scouarnec S, Pellen N, Lecoite S, et al. Fine-scale human genetic structure in Western France. *Eur J Hum Genet*. 2015 Jun;23(6):831–6.
22. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 18;536(7616):285–91.
23. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*. 2013 Mar 1;14(2):178–92.
24. Santulli G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:4.
25. Oike Y, Ito Y, Maekawa H, Morisada T, Kubota Y, Akao M, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3760–5.
26. Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Jan;18(1):6–14.

27. Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):70–9.
28. Leblanc GG, Golanov E, Awad IA, Young WL, Biology of Vascular Malformations of the Brain NINDS Workshop Collaborators. *Biology of vascular malformations of the brain*. *Stroke*. 2009 Dec;40(12):e694-702.
29. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999 Jun;126(14):3047–55.
30. Bourcier R, Lenoble C, Guyomarch-Delasalle B, Daumas-Duport B, Papagiannaki C, Redon R, et al. Is there an inherited anatomical conformation favoring aneurysmal formation of the anterior communicating artery? *J Neurosurg*. 2017 May;126(5):1598–605.
31. Mackey J, Brown RD Jr, Moomaw CJ, Hornung R, Sauerbeck L, Woo D, et al. Familial Intracranial Aneurysms: Is Anatomic Vulnerability Heritable? *Stroke*. 2013 Jan;44(1):38–42.
32. Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, et al. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):400–8.

Figure 1: Genetic investigations in a large family with multiple IA carriers

(A) Pedigree of family A showing the segregation pattern of the variant *ANGPTL6* 1617A>T (Filled, empty boxes and boxes with question marks indicate IA carriers, non-carriers and individuals with unknown status; signs '+' indicate the presence of the *ANGPTL6* variant, signs '-' its absence; the arrow indicates the index case, the asterisks indicate the patients included in WES analysis). (B) Digital subtracted angiographies showing two intracranial aneurysms carried by the individual III-1, one on the Middle Cerebral Artery (left panel) and one on the Anterior Cerebral Artery (right panel). (C) Summary of the filtering steps applied to genetic variant detected by WES in individuals III-1 and III-5 (MAF: minor allele frequency, IBD: identity by descent, LOF: loss of function).

Figure 2: Familial cases of IA in the presence of rare coding variants in *ANGPTL6*

Filled, empty boxes and boxes with question marks indicate IA carriers, non-carriers and individuals with unknown status; signs '+' indicate the presence of the *ANGPTL6* variant, signs '-' its absence; black arrows indicates the index cases.

Figure 3: Expression of WT- and K460*-*ANGPTL6* in cultured cells and patient sera

(A) Analysis by qPCR of *ANGPTL6* transcripts in HEK293 cells expressing WT- and K460*-*ANGPTL6*. (B) Analysis by Western-Blot (anti-flag Ab) and Elisa of the expression of WT- and K460*-*ANGPTL6* in culture media and lysates from stably transfected HEK293. (C) Immunofluorescence labeling with anti- *ANGPTL6* Ab and corresponding quantification in permeabilized HEK293 cells expressing WT- and K460*-*ANGPTL6*. (D) Analysis of serum level of *ANGPTL6* in controls (WT-*ANGPTL6*) and individuals expressing the K460*-*ANGPTL6* (heterozygous).

Family	Genomic position	Gene	AA change	MAF in ExAC (NFE)	GERP score	Predicted Functional Impact		Carriers / Total	
						SIFT	Polyphen 2	Affected	Unaffected
A	chr6:52701135C>A	GSTA5	M57I	0,00002	2.63	deleterious	benign	4/4	5/22
	chr10:73046467G>A	UNC5B	D192N	0,00001	5.43	deleterious	possibly_damaging	4/4	10/22
	chr11:64756981G>A	BATF2	L125F	0,00002	3.54	tolerated	probably_damaging	4/4	6/22
	chr11:65113459G>T	DPF2	G41V	0,00013	-7.09	tolerated	unknown	4/4	6/22
	chr11:65746304C>T	SART1	T765I	0,00000	4.76	deleterious	probably_damaging	4/4	6/22
	chr19:10610439C>T	KEAP1	A91T	0,00013	4.68	tolerated	benign	4/4	5/22
	chr19:14001265G>A	C19orf57	A135V	0,00025	-3.41	deleterious	benign	4/4	5/22
	chr19:10203300T>A	ANGPTL6	K460*	0,00001	4.39		LOF	4/4	5/22
B + C	chr19:10206848T>A	ANGPTL6	E131V	not found	4.03	deleterious	benign	4/4	4/10
D	chr19:10204205G>A	ANGPTL6	L348F	not found	3.67	tolerated	probably_damaging	1/1	0/1
E + F	chr19:10206782G>GC+	ANGPTL6	A153VfsX65	0,00060	4.36		LOF	3/4	6/8

Table 1: Rare coding variants shared by all affected members in family A, and rare coding variants in *ANGPTL6* carried by affected members from other families

GERP: Genomic Evolutionary Rate Profiling, MAF: Minor Allele Frequency, LOF: Loss Of Function, ExAC (NFE): Exome Aggregation Consortium (Non-Finnish Europeans), SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant

	<i>Healthy individuals No ANGPTL6 variant (n=16[*])</i>	<i>Healthy individuals ANGPTL6 variant (n=15)</i>	<i>IA carriers ANGPTL6 variant (n=12)</i>
Median age	57	56	59
Female sex	56 %	53 %	58 %
History of smoking [#]	56 % (8 p. y.)	73 % (10 p. y.)	67 % (31 p. y.)
High blood pressure[§]	7 %	9 %	50 %
Alcohol intake > 150 g/w	19 %	13 %	33 %
Median BMI	22	24	24
Diabetis - Dyslipidemia	19 %	18 %	33 %

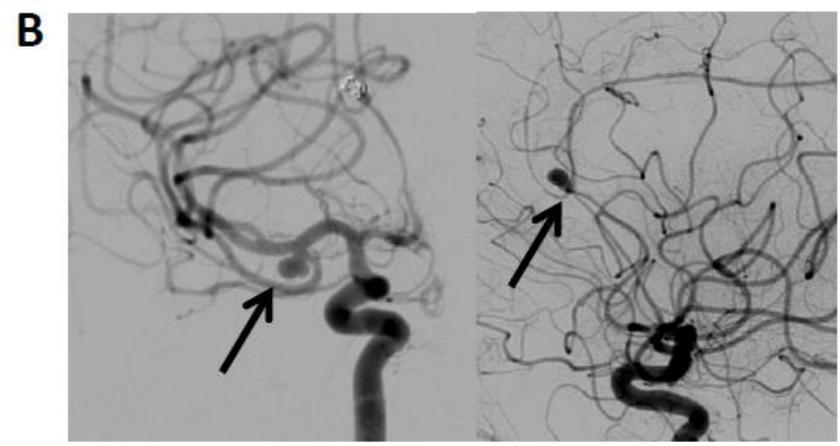
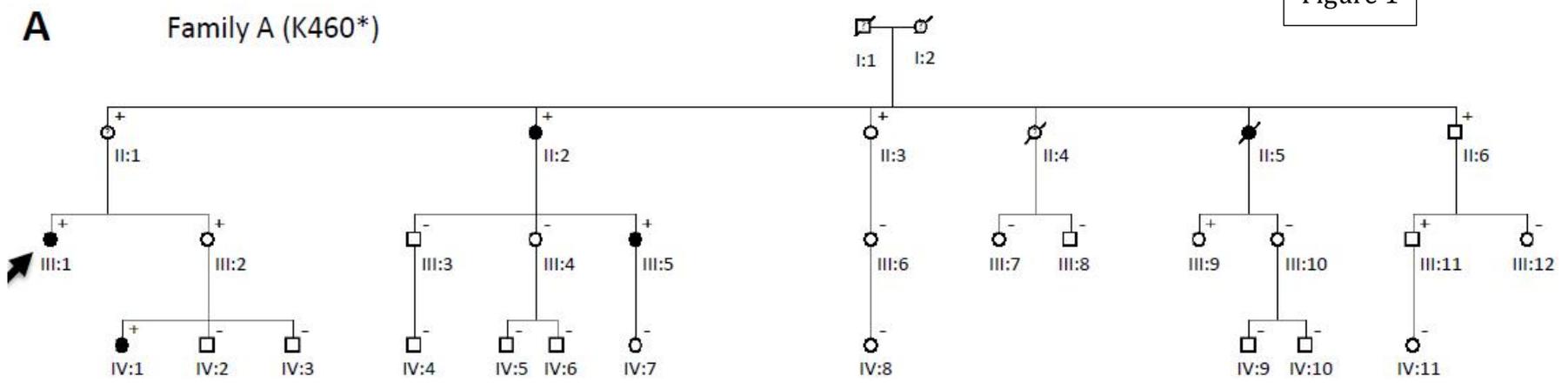
Table 2: Clinical characteristics and exposition to risk factors for IA carriers and unaffected relatives, according to ANGPTL6 status

^{*} *Healthy individuals aged over 35 years, without ANGPTL6 variant*

[#] *p. y.: median consumption in pack/years among smokers*

[§] *Significant difference between affected versus healthy individuals carrying ANGPTL6 variants; P=0.013 (Chi-squared test)*

Figure 1



C

<i>Individuals</i>	<i>III-1</i>	<i>III-5</i>
Functional variants	25,674	23,456
MAF < 0,1% in ExAC (NFE)	456	436
Shared by III.1 & III.5	29	
In IBD haplotypes	10	
Shared by all affected	8	
Predicted LOF	1 (<i>ANGPTL6</i>)	

Figure 2

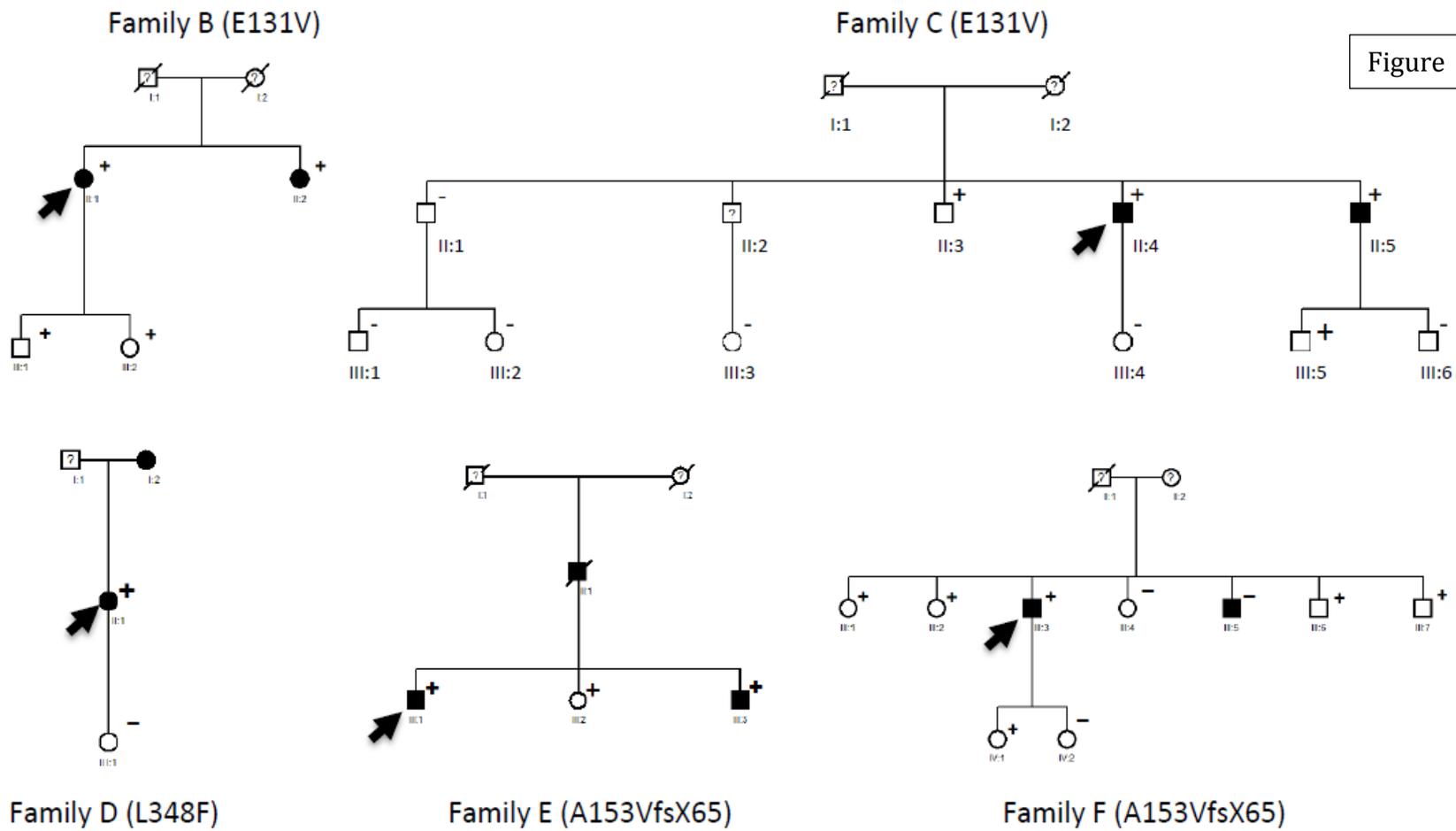


Figure 2

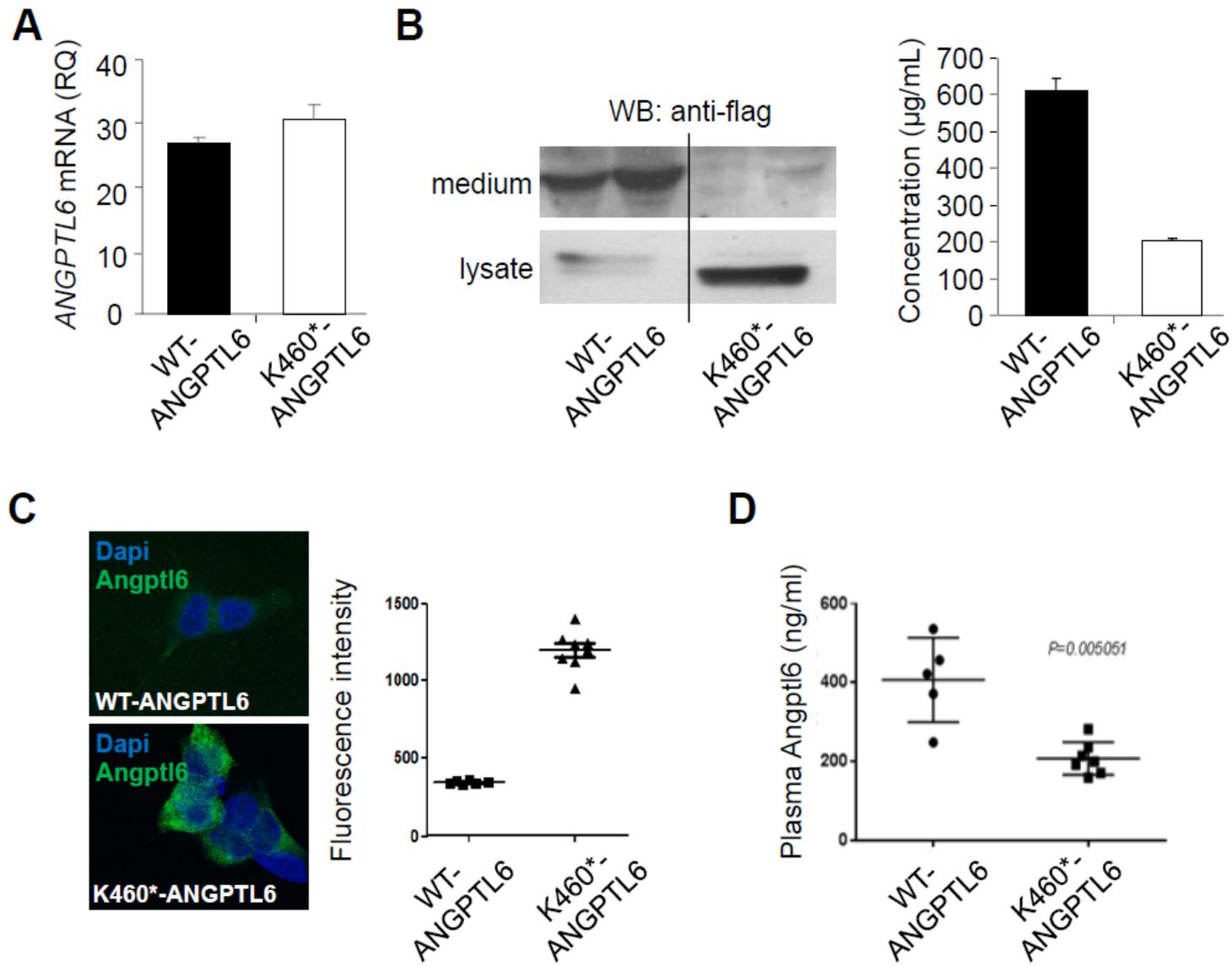


Figure 3

3. ANALYSE DES AUTRES FAMILLES RECRUTEES

a) Analyse de la famille 39423 : *CTSO* un autre gène candidat

La seconde famille (39423) était issue de la région du Sud Vendée et de la Rochelle. Dans cette famille, 6 cas d'AIC sur deux générations ont été authentifiés et l'ADN de ces patients pour ces derniers était disponible. De plus, trois autres cas d'AIC atteignant une troisième génération étaient probables mais l'ADN de ces patients décédés n'était pas disponible, leur phénotype est donc incertain.

Trois patients sélectionnés ont bénéficié du séquençage d'exome et sont entourés en rouge sur la figure 8.

Une analyse de liaison s'est intéressée aux 6 patients atteints de cette famille. Ces analyses ont été réalisées avec l'algorithme « Identity By Descent Linkage Disequilibrium » et a calculé un nombre de pairs d'atteints de 15 au maximum dans cette famille. Chaque paire d'individus a été comparée en utilisant le seuil de probabilité IBD0 de 0.2.

Les comparaisons des régions partagées par les individus atteints de la famille (paires concordantes) mais non partagées avec les individus sains (paires discordantes) sont présentées dans la figure 9.

Le tableau 1, résume les étapes de filtrage des variations à partir du séquençage d'exome.

	nombre de variations filtrées
variations non synonymes	14000
MAF <0,1% dans ExAC	900
MAF <10% dans base de données locale	400
partagées par les 3 patients séquencés	11
dans un haplotypes partagés par les 6 atteints en IBD	1

Table 1 : Analyses combinées des données de séquençage d'exome et des régions IBD identifiées.

Au final, une seule des 11 variations partagées par les 3 patients séquencés en exome se trouve dans un des intervalles partagé par un nombre maximal de patients atteints. La confrontation avec les paires discordantes a mis en évidence un haplotype partagé en regard du locus 4q32 (figure 10).

La variation chr4 : 156847208 C>T est située dans le gène *CTSO*. Cette variation est connue (rs374282693) mais reste rare car elle présente une MAF dans la population européenne non finlandaise de GnomAD de 0.00001734. Le score de conservation inter espèce GERP est haut(5,68). Cette variation est prédite par Polyphen 2 comme «probably damaging». Elle change une Valine en position 316 en Isoleucine (118 seq).

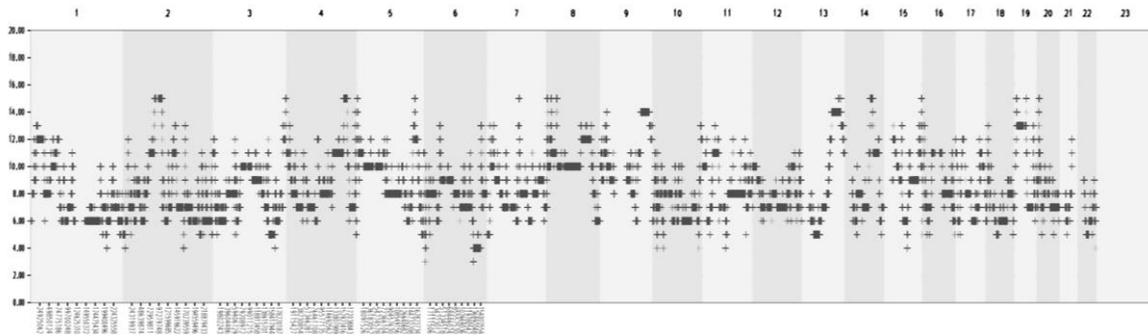


Figure 9: Représentation des régions IBD partagées par les individus atteints de la famille 39423. Chaque variation génétique génotypée (puces Affymetrix 250K) est représentée en fonction de sa position génomique (abscisse) et du nombre de paires d'individus atteints qui le partage (ordonnées).

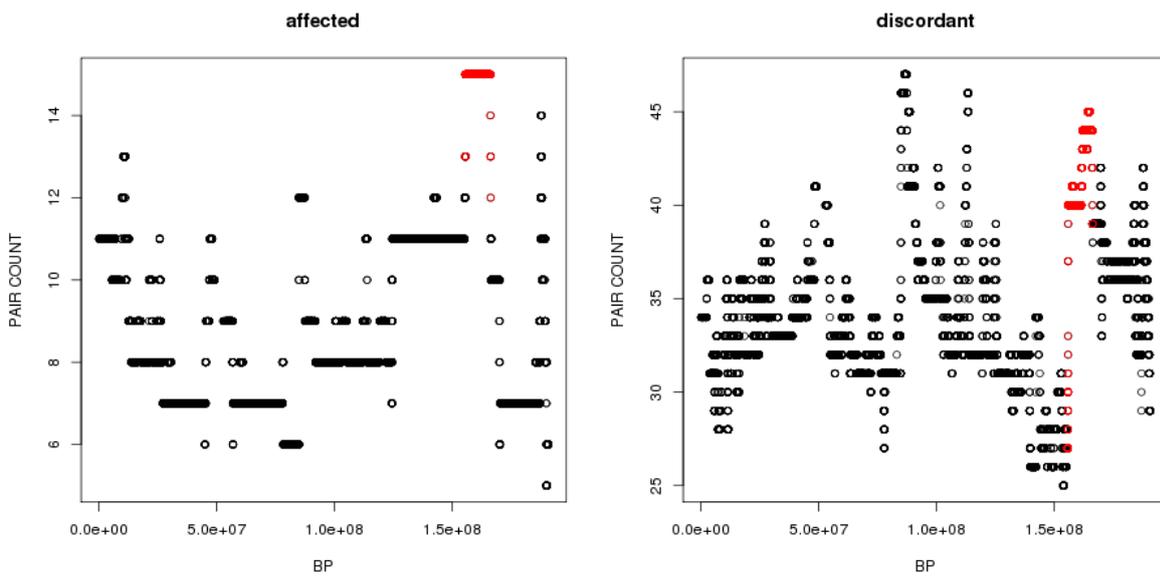


Figure 10: Focus sur le locus 4q32 partagé par un nombre maximum de paires concordantes.

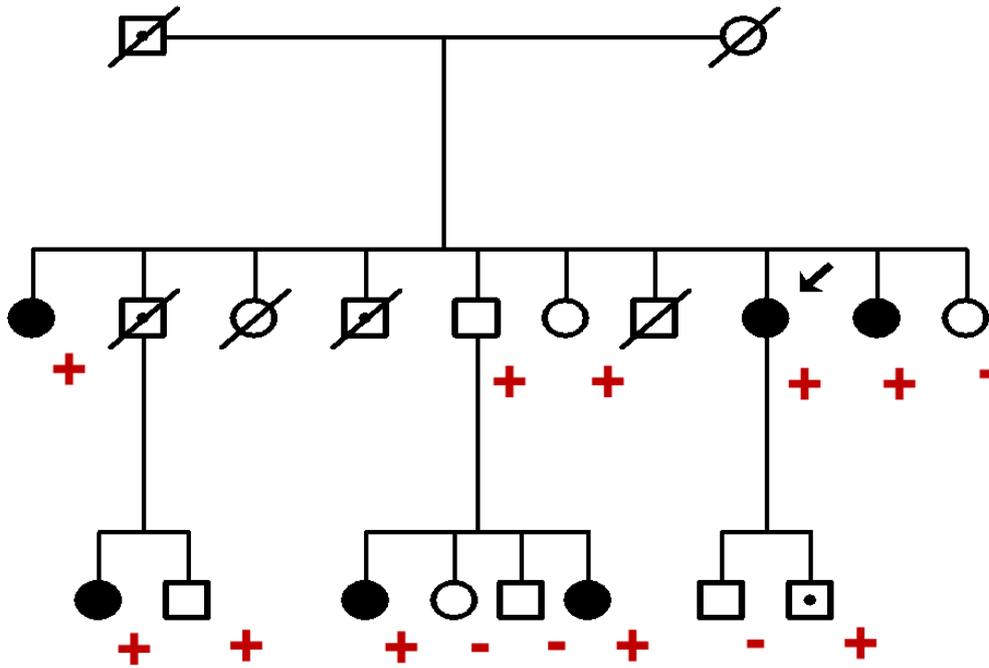


Figure 11: Pedigree de la famille 39423 et ségrégation de la variation génétique chr4:156847208 C>T au sein de celle-ci.

Au total dans la famille 39423, 6 patients sont porteurs de la variation génétique et d'un AIC, 4 patients ne présentent pas d'AIC et sont non porteurs de la variation mais 3 patients présentent la variation génétique mais ne sont pas porteurs d'AIC. (pénétrances incomplètes). L'ensemble de ce gène a été séquencé, dans la population de 95 patients présentant des antécédents familiaux.

Une autre variation non synonyme a été retrouvée (chr4 156874872 G>A). Cette variation reste rare car elle présente une MAF dans la population européenne non finlandaise de GnomAD de 0.0002667. Le score de conservation inter espèce GERP est haut(3,67). Cette variation est prédite par Polyphen 2 comme «probably damaging». C'est aussi une variation faux-sens qui change une Alanine en Valine en position 43.

Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure d'étudier la ségrégation de la pathologie et de cette variation génétique chez les apparentés de ces patients pour le moment.

Il est important de remarquer que *CTSO* se trouve dans un des seuls locus (4q32) qui apparait en déséquilibre de liaison dans la plus grande étude de liaison parue à ce jour incluant plus de 300 formes familiales d'AIC (43).

De plus deux publications récentes ont fait le lien entre les cathepsines et la formation des AIC. Aoki et al. ont étudié l'effet de la Cystatin C, un inhibiteur des cathepsines, sur la formation des AIC dans un modèle murin hypertendu. Ils ont montré que les cathepsines étaient surexprimées lors de la formation anévrismale et que la Cystatin C limitait l'incidence des AIC chez les rats. L'expression de cathepsine dans le tissu d'AIC humain aussi été retrouvée dans cette étude. Particulièrement, *CTSO* présenterait une expression cérébrale prédominante. Les auteurs suggèrent que les cathepsines sont impliquées dans le déséquilibre de formation/dégradation de la matrice extracellulaire de la paroi artérielle intracrânienne qui conduit aux AIC (128).

Une autre équipe a étudié les cathepsines sur le même type de modèle murin. Ils ont montré une nette majoration de la densité de cellules musculaires lisses par diminution de l'apoptose dans la paroi anévrismale après l'injection de siRNA bloquant les cathepsines (129).

Nous allons poursuivre très prochainement l'étude de l'implication des mutations retrouvés dans *CTSO* avec la physiopathologie anévrismale par des études fonctionnelles in vitro sur HUVEC dans un premier temps.

b) Analyse du séquençage d'exomes de 95 propositus issus de formes familiales d'AIC

Parmi les formes familiales d'AIC recrutées dans le projet GAIA, 95 propositus porteurs d'AIC ont bénéficié du séquençage d'exome. Nous allons donc rechercher si un enrichissement en variation rare et non synonymes apparaît dans certains gènes en comparaison à des bases de données témoins (FREX, PREGO). En effet, un balayage de l'ensemble des régions codantes sera ainsi effectué à la recherche de gènes pouvant présenter un taux de variation chez des porteurs d'AIC supérieur à celui des témoins sans AIC.

Si un enrichissement significatif est mis en évidence, la ségrégation de ces variations sera étudiée au sein des familles en question.

A ce jour, le séquençage par exome d'une telle bio-collection de formes familiales d'AIC n'a jamais été publié et pourrait s'avérer très informatif.

4. ARTICLE PUBLIÉ: IS THERE AN INHERITED ANATOMICAL CONFORMATION FAVORING ANEURYSMAL FORMATION OF THE ANTERIOR COMMUNICATING ARTERY?

Is there an inherited anatomical conformation favoring aneurysmal formation of the anterior communicating artery? (126)

Cet article constitue la première exploitation clinique et épidémiologique de la bio-collection constituée. Pour ce travail réalisé en 2015, nous n'avons pu inclure qu'une centaine de formes familiales d'AIC. C'est donc l'équivalent d'une étude pilote qui laisse entrevoir ce que nous pourrions aujourd'hui réaliser sur plusieurs centaines de familles.

Existe-t-il une transmission de prédisposition anatomique favorisant la survenue d'AIC dans les familles ? Les conformations du polygone de Willis se transmettent-elles chez l'humain ? Les contraintes hémodynamiques sont-elles seules responsables de la formation des AIC ? Malgré un échantillon de petite taille, toutes ces questions au sujet de la physiopathologie des AIC sont abordées dans cet article.

Grâce à au projet ICAN, nous disposons d'images natives pour chaque patient inclus et pouvant donc bénéficier de reconstructions complexes ou de mesures complémentaires semi-automatisées. Nous avons ainsi calqué sur les formes familiales, la méthodologie d'étude des AIC de l'artère communicante antérieure des formes sporadiques publiée dans Stroke en 2014 par Kaspera(130).

Nous avons étudié différents paramètres anatomiques du complexe antérieur dans trois populations différentes.

Tout d'abord des [1] patients porteurs d'AIC et ayant des antécédents familiaux d'AIC, [2] les frères et sœurs de ces patients qui ne sont pas porteurs d'AIC et enfin des [3]porteurs d'AIC mais qui n'ont pas d'antécédent familiaux d'AIC.

Les paramètres étudiés sont ; l'angle entre le segment A1 et le segment A2 de chaque côté et les diamètres des segments A1 de manière comparative (Figure 12).

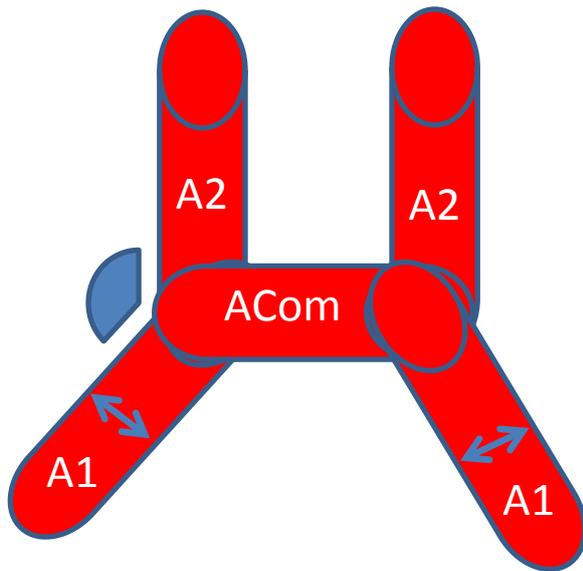


Figure 12 : Représentation schématique du complexe communicant antérieur du polygone artériel de Willis et des mesures réalisées.

Les AIC dit de « la communicante antérieure » sont bien des AIC de bifurcation et se développent préférentiellement à la bifurcation entre ACom-A2 d'un côté ou de l'autre (Figure 13).

Dans notre travail, nous confirmons les résultats de Kaspera et al. en montrant que les AIC de l'artère communicante antérieure se développent préférentiellement lorsqu'une asymétrie est présente entre les deux segment A1 (figure 13 A) et quand l'angle entre A1 et A2 est plus petit (figure 13 B). Cette géométrie et cette conformation anatomique majorent en effet les contraintes hémodynamiques sur la bifurcation ACom -A2.

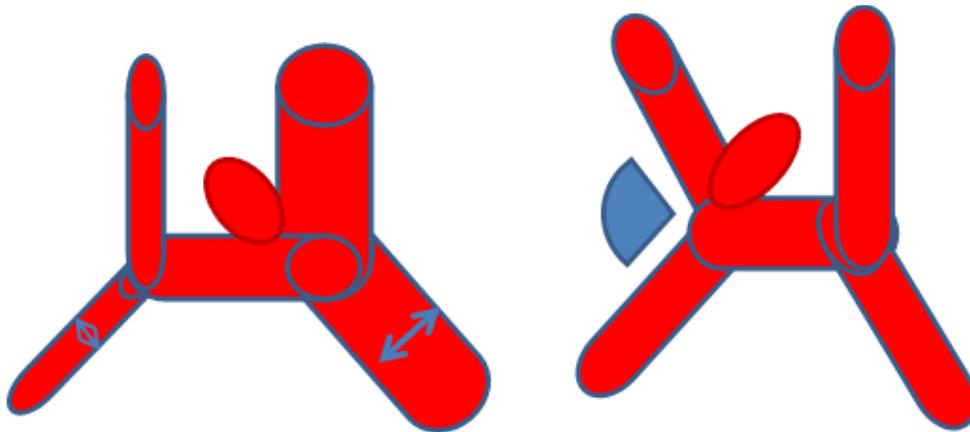


Figure 13 : A représentation d'une asymétrie de calibre des segments A1, B représentation d'une angulation inférieure d'A1-A2.

Notre travail est original car cette constatation est faite au sein même de familles présentant une agrégation de cas d'AIC. Nous montrons donc que, même dans un contexte familiale, il existe une conformation anatomique particulière chez les patients qui présente des AIC comparé à leurs apparentés sains.

Ce résultat a deux implications. Tout d'abord, dans la recherche des gènes impliqués dans les formes familiales d'AIC, il est judicieux de prêter attention aux gènes en lien avec le développement du polygone de Willis. Ensuite, la surveillance des apparentés qui ne présente pas encore d'AIC mais ces conformations anatomiques à risque doit être plus rigoureuse.

Is there an inherited anatomical conformation favoring aneurysmal formation of the anterior communicating artery?

Romain Bourcier, MD,¹⁻³ Cédric Lenoble, MD,¹ Béatrice Guyomarch-Delasalle, MSc,^{2,3} Benjamin Daumas-Duport, MD,¹ Chrysanthi Papagiannaki, MD,⁴ Richard Redon, PhD,^{2,3} and Hubert Desal, MD, PhD¹⁻³

¹Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, Hospital Guillaume et René Laennec; ²INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, CHU de Nantes; ³CNRS, UMR 6291, Université de Nantes, Nantes; and ⁴Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, CHU Rouen, Rouen, France

OBJECTIVE The pathophysiological mechanisms responsible for the formation of intracranial aneurysms (IAs) remain only partially elucidated. However, current evidence suggests a genetic component. The purpose of this study was to investigate the specific anatomical variations in the arterial complex that are associated with the presence of anterior communicating artery (ACoA) aneurysms in the familial forms of IAs.

METHODS This multicenter study investigated bifurcation IAs in patients who had a sporadic ACoA IA without a family history of IA (SACAA group), in patients who had an ACoA IA with a family history of IA (FACAA group), and in their healthy first-degree relatives (HFDRs). Through the use of MR angiography (MRA) reconstructions, the symmetry of the A₁ segments and the angle between the A₁ and A₂ segments were analyzed on 3D models for each group. These measurements were then compared among the 3 groups.

RESULTS Twenty-four patients with SACAA, 24 patients with FACAA, and 20 HFDRs were included in the study. Asymmetrical configuration of the A₁ segments was more frequent in the FACAA group than in the HFDR group ($p = 0.002$). The aneurysm-side A₁-A₂ angle was lower in the FACAA group ($p = 0.003$) and SACAA group ($p = 0.007$) than in the HFDR group. On the contralateral side, there was no difference in A₁-A₂ angles between groups.

CONCLUSIONS The anatomical shape of the ACoA complex seems to be similarly associated with the presence of ACoA IAs in both the FACAA and SACAA groups. This highlights the role played by hemodynamic constraints in aneurysm formation and questions the hypothesis of the hereditary character of these anatomical shapes.

<https://thejns.org/doi/abs/10.3171/2016.4.JNS153032>

KEY WORDS aneurysm; genetics; hemodynamics; anterior communicating artery; vascular disorders

DETECTION of incidental intracranial aneurysms (IAs) seems to be rising because of the increased accessibility and evolution of imaging techniques.^{21,31} The prevalence of IAs in a middle-aged population is 3%.⁴⁰ Many hypotheses about the acquired risk factors and the hemodynamic stress responsible for triggering their formation and evolution have been proposed but have not been unanimously accepted.¹³

Recently, other factors, such as congenital and genetic abnormalities, have been recognized to play an important role since a family history of IA is the most significant risk factor for an IA diagnosis in any individual.^{4,36} The presence of at least 2 first-degree relatives with IAs is defined as familial form aneurysms, which represent 7%–12.5% of the IA population.^{5,34}

The exact nature of this possible genetic predisposition

ABBREVIATIONS ACoA = anterior communicating artery; CTA = computed tomography angiography; CW = circle of Willis; FACAA = familial anterior communicating artery aneurysm; FIA = familial intracranial aneurysm; GAIA = genetics of intracranial aneurysm; HFDR = healthy first-degree relative; IA = intracranial aneurysm; MIP = maximum intensity projection; MRA = magnetic resonance angiography; PACS = picture archiving and communication system; SACAA = sporadic anterior communicating artery aneurysm; VAC = vascular asymmetry coefficient.

SUBMITTED December 28, 2015. **ACCEPTED** April 11, 2016.

INCLUDE WHEN CITING Published online June 17, 2016; DOI: 10.3171/2016.4.JNS153032.

leading to aneurysm formation has yet to be discovered.³⁵ Familial aneurysms are usually detected at specific locations for each family, which assumes a focal pathological process.²⁶

The interactions among organ development, angiogenesis, cell-matrix adhesion, and inflammatory or hemodynamic response in this process are as yet unknown. However, in patients with sporadic aneurysms, the effect of specific anatomical variations within the circle of Willis (CW) on the formation of IA has been well established.^{2,6-8,16}

The purpose of this study was to investigate specific anatomical variations within the anterior communicating artery (ACoA) complex that may be significantly associated with the presence of IAs. For this purpose we compared anatomical and structural characteristics of the ACoA complex, such as asymmetry and angle measurement, in 3 groups: patients with a familial ACoA aneurysm (FACAA), patients with a sporadic ACoA aneurysm (SACAA), and healthy first-degree relatives (HFDRs) of FACAA patients.

Methods

Study Population

Between April 2013 and June 2015, we prospectively included in our study 68 patients from multiple centers. These patients were divided into 3 groups: 1) patients with an aneurysm occurring within the ACoA or the A₁-A₂ junction and at least 1 first-degree relative harboring an IA, i.e., familial (FACAA); 2) first-degree relatives belonging to the same generation as the FACAA patients and having no aneurysm (HFDR); and 3) patients with an aneurysm within the ACoA or A₁-A₂ junction without a first-degree relative harboring an IA, i.e., sporadic (SACAA).

We used the following inclusion criteria: 1) all patients had to be age 20 or older; 2) patients with FACAA and SACAA had to have a saccular bifurcation IA in the ACoA and a measured major axis of at least 2 mm; and 3) FACAA patients and their HFDRs had to have at least 2 first-degree relatives (including the FACAA patient) suffering from an IA.

We excluded patients suffering from syndromic diseases known to have IA occurring therein: Marfan syndrome, Type II or IV Ehlers-Danlos syndrome, autosomal dominant polycystic kidney disease, and moyamoya syndrome. Dissecting aneurysms, mycotic aneurysms, or aneurysms associated with arteriovenous malformation were likewise excluded from the study.

Patients with SACAA were included in the study in the order in which they were admitted to the Diagnostic and Therapeutic Neuroradiology Department of the Nantes University Hospital Center. The recruitment of patients with FACAA and their HFDRs was performed by the Genetics of Intracranial Aneurysm (GAIA) clinical network in France (Nantes, Angers, Bordeaux, Rennes, Tours, Poitiers, and Créteil). Syndromic disorders and "atypical" IA phenotypes were ruled out by consultation with both a medical geneticist and an experienced interventional neuroradiologist in each recruiting center.

Patient information was gathered on history of smoking, alcohol consumption, and cardiovascular risk factors such as diabetes, high blood pressure, and high cholesterol. Patients were considered hypertensive if they were being treated with an antihypertensive drug or if they had systolic blood pressure of at least 140 mm Hg or diastolic blood pressure of at least 90 mm Hg. Patients were considered diabetic if they were being treated with oral anti-diabetic medication or insulin. Patients were considered to have dyslipidemia if they were being treated with a lipid-lowering drug or had a history of dyslipidemia.

This project received a favorable ethical rating from the Nantes Health Field Ethics Group (GNEDS) on July 18, 2013. This nonintervention research was approved by the French Committee for Personal Protection (CPP) on July 3, 2013. The protocol was submitted and accepted by the French Advisory Committee on Information Processing in Material Research in the Field of Health (CCTIRS) on August 1, 2013, and then by the French National Committee for Data Protection and Liberties (CNIL).

3D Model Reconstruction

Each patient's imaging was performed at the coordinating center (Nantes University Hospital Center) using a Siemens AERA 1.5-T machine (Sonata, Siemens). The 3D reconstructions were generated from images belonging to a time-of-flight MR angiography (MRA) sequence having the following parameters: TE 7 msec, TR 24 msec, flip angle 20°, FOV 180 mm, slice thickness 0.7 mm. Patients who were recruited to the study from associated recruiting centers had time-of-flight sequences performed on the University Hospital Center machines, which were deemed to be of sufficient quality to be usable and suitable for required measurements.

All of the images were recorded in DICOM format and transferred to a picture archiving and communication system (PACS) station (Carestream Health). The vascular compartment was isolated by automatic thresholding, and the vascular and aneurysmal contours were reconstructed by means of algorithmic smoothing. The 3D surface model of the aneurysm and the vessels of the anterior complex of the CW could then be manipulated freely within the PACS software. Diameters and angles were measured using the vascular study software from the PACS.

Definition of Morphological Parameters

We bilaterally studied the mean diameter and angles of the vessels within the anterior complex of the CW, including the A₁ and A₂ segments. The A₁ segment begins at the junction of the carotid artery and ends at the junction of the ACoA. The A₂ segment begins at the ACoA junction and ends at the rostrum-genu junction of the corpus callosum.

The A₁ and A₂ segments were automatically reconstructed on a 3D model, making the barycenter of the vessel visible (Figs. 1 and 2). Diameter measurements for the A₁ segment were performed on a cross-section of the vessel at a point equidistant from the carotid artery and A₁-A₂ junctions (Fig. 3). The PACS software automatically calculated maximum and minimum diameters. We used this information to

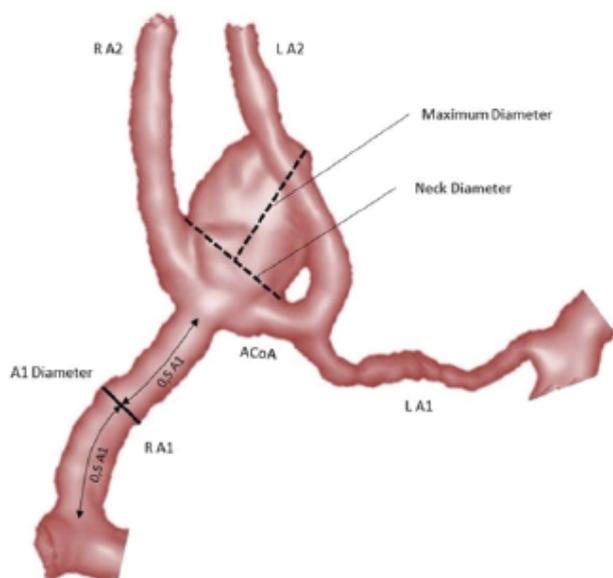


FIG. 1. Three-dimensional model of an ACoA aneurysm, frontal view, showing the diameter measurements. L = left; R = right.

calculate mean diameter, which is necessary for assessing the vascular asymmetry coefficient (VAC). The VAC corresponds to the difference between the mean diameters of the right and left segments and is expressed as the highest mean diameter percentage. When the VAC was less than 10%, the A_1 segments were classified as symmetrical. When the VAC was between 10% and 40%, the A_1 segments were classified as asymmetrical. When the VAC was greater than 40%, the A_1 segments were classified as hypoplastic. The A_1 segment

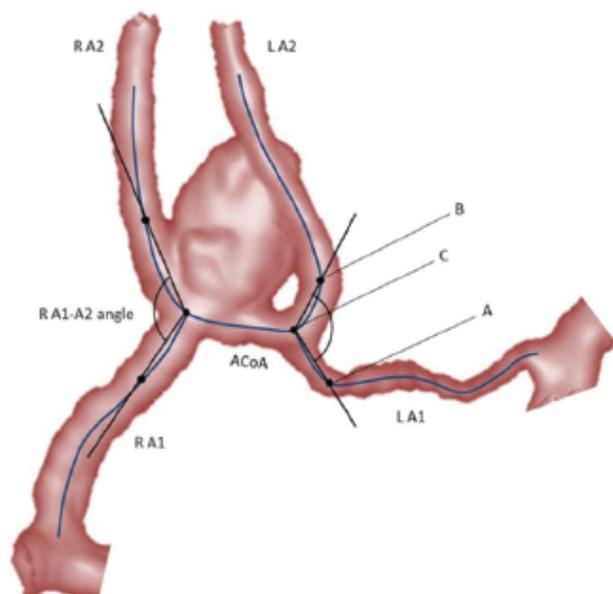


FIG. 2. Three-dimensional model of an ACoA aneurysm, frontal view, showing the angular analysis of vessels from the anterior complex of the CW. The barycenter of the section of greatest curvature along the A_1 segment (A), of greatest curvature along the A_2 segment (B), and of the A_1 - A_2 junction (C) are shown.

was described as “aplastic” when not detectable. This classification scheme and these measurements were based on the report by Kaspera et al.¹⁶

The A_1 - A_2 angle measurements were performed with reconstructions from maximum intensity projection images by using the plane spanning the distal portion of A_1 (from the greatest curvature) through the A_1 - A_2 junction and the proximal portion of A_2 (up to the greatest curvature). The arms of the angle were drawn from the points of greatest curvature along the A_1 and A_2 segments, located on the barycenter of the vessel. The apex of the angle was placed at the A_1 - A_2 junction and on the barycenter of the vessel. When there was aplasia of the A_1 segment, measurements were performed only on the contralateral segment.

We also measured the morphological parameters of the IA, including the major axis, the neck diameter, and its lateralization. The major axis was defined as the widest diameter on a cross-section of the IA, measured from the base of the IA. Lateralization of the IA was classified according to the side on which it grew and in relation to the A_1 - A_2 junction. The A_1 - A_2 angles were studied according to the side where the aneurysm was located. Given the lack of IAs in the HFDR group, we chose the narrower of the 2 angles for the purpose of conducting a comparative analysis of the 3 groups.

All measurements were performed by the same operator (C.L.).

Statistical Analysis

Descriptive analyses made it possible to compare the clinical and demographic characteristics of the 3 groups. Qualitative variables were tested using the chi-square test and Fisher's exact test. Quantitative variables were compared among the 3 groups with the Kruskal-Wallis test. Two-by-two comparisons were performed with the Mann-Whitney U-test. A Spearman correlation was used to analyze the correlation between 2 quantitative variables. The $p < 0.05$ threshold was considered significant. Statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS Inc.).

Results

A total of 24, 20, and 24 individuals were included from the FACAA, HFDR, and SACAA groups, respectively. Clinical and demographic information is shown in Table 1. The mean age overall was 53 ± 13 years. There was no difference in age ($p = 0.58$) or sex ratio ($p = 0.22$) among the 3 groups. Likewise, we found no significant difference among the 3 groups for cardiovascular risk factors, such as smoking ($p = 0.94$), diabetes ($p = 0.90$), and dyslipidemia ($p = 0.47$).

Morphological characteristics of the aneurysms are shown in Table 2. The intrinsic characteristics of the IA (e.g., major axis, neck) were similar between the FACAA and SACAA groups. The VAC values were statistically different among the 3 groups (20.5% vs 7.9% vs 14.7% for the FACAA, HFDR, and SACAA groups, respectively; $p = 0.045$) and favored more frequent asymmetrical formation in the FACAA group. The aneurysm-side A_1 - A_2 angles were also different among the 3 groups. Indeed, these appeared lower in the groups of patients with aneu-

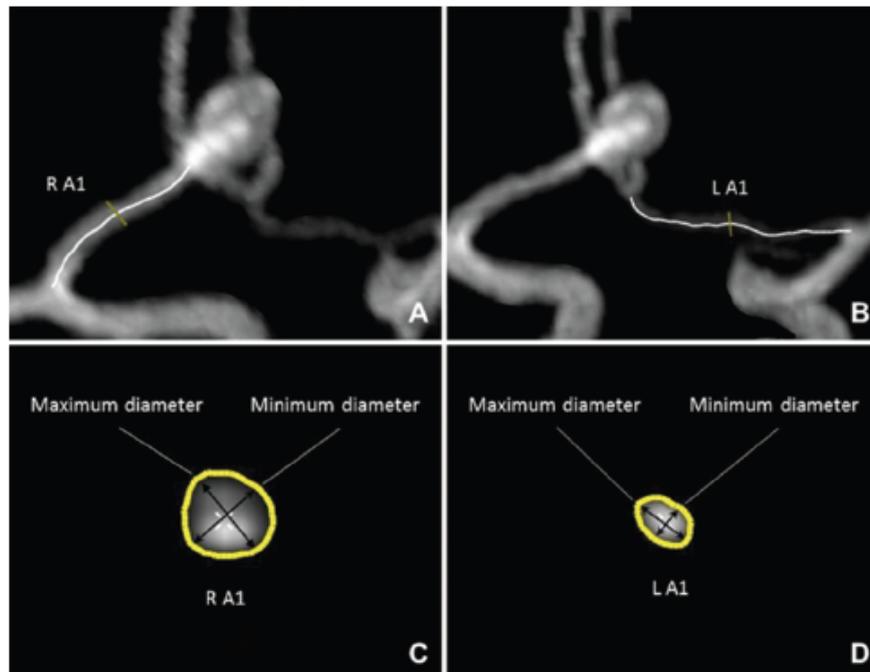


FIG. 3. Diameter measurements of the A₁ segment of the right and left anterior cerebral arteries.

rysms than in the HFDR group (105.69° and 105.11° for the FACAA and SACAA groups, respectively, vs 121.03° for the HFDR group; $p = 0.005$). On the other hand, the 3 groups had no difference in A₁-A₂ angle on the side opposite from the IA. In the FACAA and SACAA groups, there was no correlation between IA size and A₁-A₂ angle ($p = 0.55$).

Paired comparisons between groups are reported in Table 3. The VAC was significantly higher in the FACAA group than in the HFDR group (20.5% vs 7.9%, respectively; $p = 0.002$). Conversely, there was no significant difference in VAC values between the FACAA and SACAA groups ($p = 0.17$) or the SACAA and HFDR groups ($p = 0.15$). The A₁-A₂ angles on the IA side were significantly lower for both IA groups than those in the HFDR group. Indeed, we found this difference between the FACAA and HFDR groups (105.69° vs 121.03°, respectively; $p = 0.003$) and between the SACAA and HFDR groups (105.11° vs 121.03°, respectively; $p = 0.007$). The A₁-A₂ angles on the aneurysm side were not different ($p = 0.95$) between the FACAA and SACAA groups.

Discussion

Our work shows that anatomical formation of the anterior complex in patients with FACAA was different from that in their HFDRs. It has been previously demonstrated that the geometry of the affected arteries can contribute to the formation of the IA, independent of familial contributions.^{2,6-8,12,15,18,39} Specifically, the anatomy of the anterior complex of the CW can create a trend toward the formation of IAs in the ACoA.¹⁶ Indeed, IAs form preferentially

at arterial bifurcations and on tight vascular curvatures (having a low radius of curvature).⁸ Recent studies investigating the anterior complex of the CW using 3D computed tomography angiography (CTA) models found that the incidence of ACoA IA is linked to A₁-A₂ angles and the asymmetry between the A₁ segments.^{15,18} Kaspera et

TABLE 1. Clinical and demographic data for patients in the FACAA, HFDR, and SACAA groups

Parameter	FACAA Group	HFDR Group	SACAA Group	p Value
No. of patients	24	20	24	NA
No. of women (%)	13 (54)	13 (65)	9 (38)	0.22*
Mean age in yrs (SD)	54 ± 13	55 ± 15	51 ± 11	0.58†
Smoking status, no. (%)				0.94*
Still smoking	6 (25)	6 (30)	6 (25)	
Quit smoking <3 yrs	3 (13)	1 (5)	1 (4)	
Quit smoking >3 yrs	4 (17)	5 (25)	1 (4)	
Never smoked	8 (33)	8 (40)	9 (38)	
Alcohol consumption, no. (%)				0.06*
≤150 g/wk	11 (46)	10 (50)	0 (0)	
>150 g/wk	2 (8)	2 (10)	3 (13)	
High blood pressure, no. (%)	11 (46)	6 (30)	9 (37)	0.56*
Diabetes, no. (%)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0.90*
Dyslipidemia, no. (%)	6 (25)	6 (30)	3 (13)	0.47*

NA = not applicable.

* Chi-square test or Fisher's exact test.

† Kruskal-Wallis test.

TABLE 2. Measurements of the anterior complex of the CW for patients in the FACAA, HFDR, and SACAA groups

Parameter	FACAA	HFDR	SACAA	p Value
No. of patients	24	20	24	NA
Major axis of aneurysm in mm*	4.3 (3.2–7)		5 (4–6.4)	0.41†
Aneurysm neck in mm*	3 (2–3.3)		3 (2.2–3.3)	0.51†
Aneurysm side on lt‡	13 (54%)		11 (46%)	
Total no. of aneurysms‡				0.19†
1	13 (54%)		20 (83%)	
2	7 (29%)		3 (13%)	
3	3 (13%)		1 (4%)	
4	1 (4%)		0 (0%)	
VAC in %	20.5 (10.6–29.5)	7.9 (5.2–15.6)	14.7 (7.2–21.1)	0.045§
Configuration of A ₁ segments‡				0.03§
Symmetry	4 (17%)	12 (60%)	6 (25%)	
Asymmetry	12 (50%)	8 (40%)	14 (58%)	
Hypoplasia	4 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	
Aplasia	4 (17%)	0 (0%)	4 (17%)	
A ₁ -A ₂ angle in degrees*				
Aneurysm side	105.69 (95.46–116.98)	121.03 (113.83–127.99)	105.11 (86.21–121.42)	0.005§
Side opposite from aneurysm	113.51 (97.99–129.19)	121.03 (113.83–127.99)	120.80 (94.65–129.61)	0.57§

* Value expressed as median (interquartile range).

† Mann-Whitney U-test.

‡ Value expressed as number (%).

§ Kruskal-Wallis test.

al. have shown that an A₁-A₂ angle $\leq 100^\circ$ and A₁ segment asymmetry $> 40\%$ were the main risk factors associated with the development of an ACoA IA.¹⁶ Numerous studies using 3D fluid mechanics models have shown that an increase in the asymmetry of the A₁ segments would cause a significant increase in hemodynamic stress and wall-shear stress at the junction of the A₁ segment and the ACoA.^{38,43} Abnormal wall-shear stress induces an endothelial response mediated by proinflammatory factors, from metalloproteinase activation to smooth muscle cell death to extracellular matrix degradation to vascular remodeling.^{14,19,28,29,32,41}

Our results show that the angle of the A₁-A₂ segment is narrower in the FACAA group than in the HFDR group; furthermore, the FACAA group also had a higher VAC than the HFDR group. These findings suggest 2 hypotheses. The first is that, for patients with FACAA, the anatomical form of the anterior complex of the CW may be inherited and thus favor the clustering of IA cases within families. For patients in our study, this anatomical form would favor ACoA IA formation. Previous studies have

shown cases of identical aneurysm location in members of the same family or in twins.^{1,3,17,25,27} Indeed, the Familial Intracranial Aneurysm (FIA) study reported a high agreement of aneurysm location among IA patients belonging to the same family.²⁶ These observations may thus suggest that anatomical vulnerability to aneurysm formation is hereditary. The FIA study did not draw conclusions regarding ACoA IAs because this agreement was not observable for ACoA IA location in the FIA study.²⁶ This hypothesis will be the subject of future work studying the CW in subsequent generations of families with IA.

The second hypothesis suggested by our results is that familial ACoA IA development may have no innate origin. Only hemodynamic factors are responsible for aneurysm development, and the anatomical form of the anterior complex of the CW would not be heritable. Hemodynamic forces would thus have a direct, mechanical effect on ACoA IA formation. Within the same family, ACoA IA formation could be related to other aneurysm locations (e.g., middle cerebral artery, posterior communicating artery, and so forth) that, on the other hand,

TABLE 3. Comparison of the VAC and A₁-A₂ angle on the aneurysm side for patients in the FACAA, HFDR, and SACAA groups*

Parameter	FACAA	HFDR	SACAA	FACAA vs HFDR, p Value	FACAA vs SACAA, p Value	SACAA vs HFDR, p Value
VAC in %	20.5 (10.6–29.5)	7.9 (5.2–15.6)	14.7 (7.2–21.1)	0.002†	0.17†	0.15†
A ₁ -A ₂ angle on IA side (degrees)	105.69 (95.46–116.98)	121.03 (113.83–127.99)	105.11 (86.21–121.42)	0.003†	0.95†	0.007†

* Values expressed as medians (interquartile range).

† Mann-Whitney U-test.

may be genetically determined. However, it does seem that hereditary transmission of the CW shape occurs in animals. Mongolian gerbils were used as animal models for cerebral ischemia because of their spontaneous variations in the CW.²³ Indeed, Du et al. noticed that the CW shapes in gerbils are transmittable from 1 generation to another, and that there is a close relationship between the anterior vascular complex of the mothers and that of their offspring.^{11,24} In generating transgenic mice in which the Notch signaling pathway was eliminated, Proweller et al. observed anomalies in the cerebrovascular structures of the mice, including interruption of the CW, particularly within the anterior complex.^{33,44}

However, given studies performed at a premature embryonic stage, it has also been suggested that anatomical variations in the CW are genetically determined in humans.^{9,30} Indeed, the frequency of different CW shapes varies according to ethnic group.¹⁰ But at this time, there is no evidence regarding any gene that may be linked with CW shape in humans.

MRA was the testing and measurement tool used for this study. Preexisting data confirm its validity as a tool for screening IAs. Indeed, there is excellent agreement among observers regarding its IA characterization.^{20,27,42} In our study, experienced interventional neuroradiologists from each center phenotyped the IAs in order to exclusively identify patients with saccular bifurcation IA. The major asset of our study was having access to imaging data for each patient. This allowed us to analyze specific anatomical variations in patients with or without IAs.

Our study focused on IAs of the ACoA, but our strategy could be applied to all other bifurcation IA locations as well. Nonetheless, the clinical interest of our study is to help practitioners recognize the importance of carefully examining the shape of the CW in patients tested for IAs. Monitoring these patients will undoubtedly have to be tailored to whether the CW has any high-risk shape.

Our results suggest that, for patients with FACAA, hemodynamic factors are just as important as heritable factors if there is no link to these latter factors. More fundamentally, for studies of familial IA, the selection of candidate genes or pathways could be oriented toward the different developmental pathways of the CW. We suggest a novel approach to understanding the physiopathology of IAs. We also agree with the conclusions made by Lee et al. in their study of over 200 mirror-like IAs.²² They showed that the frequency of mirror-like IAs varies depending on the location, with mirror-like IAs being overrepresented among intracavernous IAs, for example. It suggests that different pathophysiological mechanisms may be at the root of the different aneurysm locations. Genome-wide association studies undoubtedly need to focus further on particular IA phenotypes.

Our work entailed certain limitations. To limit irradiation while also considering spatial resolution, we chose MRA for our GAIA protocol for testing familial forms of IA. To maximize comparability among the groups, the MRA images of the SACAA group were also chosen. In any case, most morphological studies of the same type as ours use CTA, whose spatial resolution is apparently better than MRA. This constitutes a limitation more applicable

to measurement of the A_1 - A_2 angles than to measurement of the A_1 diameter ratios, which is, by definition, comparative and relative.

We did not observe any significant difference between the anatomical shapes of the anterior complex of the CW for patients in the FACAA or SACAA groups. This could be attributed to a lack of statistical power from the small number of patients. Furthermore, heritability cannot be totally excluded in sporadic cases. Likewise, among the HFDRs, certain individuals with small aneurysms could have been unidentified and thus not properly classified. Moreover, although the HFDR group members did not present with any IAs during the study period, we cannot rule out the possibility of an IA developing later on.

Another limitation was our inclusion of patients with previously formed IA. Consequently, hemodynamic parameters at the start of IA formation may have been slightly different from those measured during the time of the study. At this time, no study has shown how the presence of an IA can influence affected arteries. However, in the FACAA and SACAA groups, there was no correlation between IA size and A_1 - A_2 angle.

The selection of the SACAA and HFDR groups constitutes a limitation of this study. We made an effort to recruit patients with SACAA as they came into our medical center from among the patients listed as having IA.

Conclusions

Our work points out the importance of the anatomical shape of the anterior complex of the CW in ACoA IA formation. In particular, we have shown that, even within the context of familial IA, the angular (A_1 - A_2) shapes and asymmetry of the A_1 segments are associated with the presence of ACoA IA. This leads us to raise 2 novel hypotheses: either susceptibility to IA formation is linked to anatomical shape inherited within a given family, or within the particular context of the ACoA, IA formation is not inherited and is mostly induced by hemodynamic constraints. Either hypothesis should be verified by studying larger samples and more IA locations.

Acknowledgments

We thank Hervé Le Marec, Stéphanie Chatel, Emmanuelle Bourcereau, and Gervaise Loirand for their contributions to the organization of the GAIA project (INSERM, UMR1087, l'institut du thorax, CHU de Nantes). We also thank the GAIA investigators for their contributions to patient recruitment: Anne Pasco (University Hospital of Angers); Stéphane Velasco and Samy Boucebcı (University Hospital of Poitiers); Denis Herbretreau and Richard Bibi (University Hospital of Tours); Jean Christophe Ferre and Hélène Raoult (University Hospital of Rennes); Sophie Gallas (University Hospital of Créteil); Jérôme Berge and Xavier Barreau (University Hospital of Bordeaux); and the Genavie Foundation.

References

1. Acosta-Rua GJ: Familial incidence of ruptured intracranial aneurysms. Report of 12 cases. *Arch Neurol* 35:675-677, 1978
2. Baharoglu MI, Lauric A, Safain MG, Hippelheuser J, Wu C, Malek AM: Widening and high inclination of the middle

- cerebral artery bifurcation are associated with presence of aneurysms. *Stroke* 45:2649–2655, 2014
3. Bannerman RM, Ingall GB, Graf CJ: The familial occurrence of intracranial aneurysms. *Neurology* 20:283–292, 1970
 4. Bourcier R, Redon R, Desal H: Genetic investigations on intracranial aneurysm: update and perspectives. *J Neuroradiol* 42:67–71, 2015
 5. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R: The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med* 326:733–736, 1992
 6. Can A, Ho AL, Dammers R, Dirven CMF, Du R: Morphological parameters associated with middle cerebral artery aneurysms. *Neurosurgery* 76:721–727, 2015
 7. Can A, Ho AL, Emmer BJ, Dammers R, Dirven CMF, Du R: Association between vascular anatomy and posterior communicating artery aneurysms. *World Neurosurg* 84:1251–1255, 2015
 8. Can A, Mouminah A, Ho AL, Du R: Effect of vascular anatomy on the formation of basilar tip aneurysms. *Neurosurgery* 76:62–66, 2015
 9. Crompton MR: The pathology of ruptured middle-cerebral aneurysms with special reference to the differences between the sexes. *Lancet* 2:421–425, 1962
 10. De Silva KRD, Silva R, Gunasekera WSL, Jayasekera RW: Prevalence of typical circle of Willis and the variation in the anterior communicating artery: A study of a Sri Lankan population. *Ann Indian Acad Neurol* 12:157–161, 2009
 11. Du XY, Zhu XD, Dong G, Lu J, Wang Y, Zeng L, et al: Characteristics of circle of Willis variations in the Mongolian gerbil and a newly established ischemia-prone gerbil group. *ILAR J* 52:E1–E7, 2011
 12. Endo S, Furuichi S, Takaba M, Hirashima Y, Nishijima M, Takaku A: Clinical study of enlarged infundibular dilation of the origin of the posterior communicating artery. *J Neurosurg* 83:421–425, 1995
 13. Francis SE, Tu J, Qian Y, Avolio AP: A combination of genetic, molecular and haemodynamic risk factors contributes to the formation, enlargement and rupture of brain aneurysms. *J Clin Neurosci* 20:912–918, 2013
 14. Frösen J, Tulamo R, Paetau A, Laaksamo E, Korja M, Laakso A, et al: Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 123:773–786, 2012
 15. Ingebrigtsen T, Morgan MK, Faulder K, Ingebrigtsen L, Sparr T, Schirmer H: Bifurcation geometry and the presence of cerebral artery aneurysms. *J Neurosurg* 101:108–113, 2004
 16. Kaspera W, Ładziński P, Larysz P, Hebda A, Ptaszkiewicz K, Kopera M, et al: Morphological, hemodynamic, and clinical independent risk factors for anterior communicating artery aneurysms. *Stroke* 45:2906–2911, 2014
 17. Kasuya H, Onda H, Takeshita M, Hori T, Takakura K: Clinical features of intracranial aneurysms in siblings. *Neurosurgery* 46:1301–1306, 2000
 18. Kasuya H, Shimizu T, Nakaya K, Sasahara A, Hori T, Takakura K: Angles between A1 and A2 segments of the anterior cerebral artery visualized by three-dimensional computed tomographic angiography and association of anterior communicating artery aneurysms. *Neurosurgery* 45:89–94, 1999
 19. Kolega J, Gao L, Mandelbaum M, Mocco J, Siddiqui AH, Natarajan SK, et al: Cellular and molecular responses of the basilar terminus to hemodynamics during intracranial aneurysm initiation in a rabbit model. *J Vasc Res* 48:429–442, 2011
 20. Korogi Y, Takahashi M, Mabuchi N, Miki H, Fujiwara S, Horikawa Y, et al: Intracranial aneurysms: diagnostic accuracy of three-dimensional, Fourier transform, time-of-flight MR angiography. *Radiology* 193:181–186, 1994
 21. Krisecek B, Inoue I: The genetics of intracranial aneurysms. *J Hum Genet* 51:587–594, 2006
 22. Lee YJ, Parreira T, Matouk CC, Menezes R, Mandell DM, terBrugge KG, et al: Clinical characteristics and preferential location of intracranial mirror aneurysms: a comparison with non-mirror multiple and single aneurysms. *Neuroradiology* 57:35–40, 2015
 23. Levine S, Payan H: Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol* 16:255–262, 1966
 24. Li Z, Huo X, Zhang S, Lu J, Li C, Guo M, et al: Selection of genes associated with variations in the Circle of Willis in gerbils using suppression subtractive hybridization. *PLoS One* 10:e0127355, 2015
 25. Lozano AM, Leblanc R: Familial intracranial aneurysms. *J Neurosurg* 66:522–528, 1987
 26. Mackey J, Brown RD Jr, Moomaw CJ, Hornung R, Sauerbeck L, Woo D, et al: Familial intracranial aneurysms: is anatomic vulnerability heritable? *Stroke* 44:38–42, 2013
 27. Maeder PP, Meuli RA, de Tribolet N: Three-dimensional volume rendering for magnetic resonance angiography in the screening and preoperative workup of intracranial aneurysms. *J Neurosurg* 85:1050–1055, 1996
 28. Malek AM, Alper SL, Izumo S: Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282:2035–2042, 1999
 29. Metaxa E, Tremmel M, Natarajan SK, Xiang J, Paluch RA, Mandelbaum M, et al: Characterization of critical hemodynamics contributing to aneurysmal remodeling at the basilar terminus in a rabbit model. *Stroke* 41:1774–1782, 2010
 30. Milenković Z, Vucetić R, Puzić M: Asymmetry and anomalies of the circle of Willis in fetal brain. Microsurgical study and functional remarks. *Surg Neurol* 24:563–570, 1985
 31. Morita A, Fujiwara S, Hashi K, Ohtsu H, Kirino T: Risk of rupture associated with intact cerebral aneurysms in the Japanese population: a systematic review of the literature from Japan. *J Neurosurg* 102:601–606, 2005
 32. Ota R, Kurihara C, Tsou TL, Young WL, Yeghiazarians Y, Chang M, et al: Roles of matrix metalloproteinases in flow-induced outward vascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1547–1558, 2009
 33. Proweller A, Wright AC, Horng D, Cheng L, Lu MM, Lepore JJ, et al: Notch signaling in vascular smooth muscle cells is required to pattern the cerebral vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16275–16280, 2007
 34. Rinkel GJ, Djibuti M, Algra A, van Gijn J: Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. *Stroke* 29:251–256, 1998
 35. Ruigrok YM, Rinkel GJE: Genetics of intracranial aneurysms. *Stroke* 39:1049–1055, 2008
 36. Ruigrok YM, Rinkel GJE, Wijmenga C: Genetics of intracranial aneurysms. *Lancet Neurol* 4:179–189, 2005
 37. ter Laan M, Kerstjens-Frederikse WS, Metzemaekers JDM, van Dijk JMC, Groen RJM: Concordant symptomatic intracranial aneurysm in a monozygotic twin: a case report and review of the literature. *Twin Res Hum Genet* 12:295–300, 2009
 38. Ujiie H, Liepsch DW, Goetz M, Yamaguchi R, Yonetani H, Takakura K: Hemodynamic study of the anterior communicating artery. *Stroke* 27:2086–2094, 1996
 39. VanderArk GD, Kempe LC: Classification of anterior communicating aneurysms as a basis for surgical approach. *J Neurosurg* 32:300–303, 1970
 40. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ: Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 10:626–636, 2011
 41. Wang Z, Kolega J, Hoi Y, Gao L, Swartz DD, Levy EI, et al: Molecular alterations associated with aneurysmal remodeling

- are localized in the high hemodynamic stress region of a created carotid bifurcation. *Neurosurgery* 65:169–178, 2009
42. Wilcock D, Jaspán T, Holland I, Cherryman G, Worthington B: Comparison of magnetic resonance angiography with conventional angiography in the detection of intracranial aneurysms in patients presenting with subarachnoid haemorrhage. *Clin Radiol* 51:330–334, 1996
 43. Xu L, Zhang F, Wang H, Yu Y: Contribution of the hemodynamics of A1 dysplasia or hypoplasia to anterior communicating artery aneurysms: a 3-dimensional numerical simulation study. *J Comput Assist Tomogr* 36:421–426, 2012
 44. Yang K, Banerjee S, Proweller A: Regulation of pre-natal circle of Willis assembly by vascular smooth muscle Notch signaling. *Dev Biol* 381:107–120, 2013

Disclosures

The authors report no conflict of interest concerning the materi-

als or methods used in this study or the findings specified in this paper.

Author Contributions

Conception and design: Bourcier. Acquisition of data: Bourcier, Lenoble. Analysis and interpretation of data: Bourcier, Lenoble, Guyomarch-Delasalle. Drafting the article: Bourcier, Lenoble, Desal. Critically revising the article: Bourcier, Daumas-Duport, Papagiannaki, Redon, Desal. Approved the final version of the manuscript on behalf of all authors: Bourcier. Statistical analysis: Guyomarch-Delasalle. Study supervision: Bourcier.

Correspondence

Romain Bourcier, Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, CHU Nantes HGRL, Nantes F-44000, France. email: romain.bourcier2@gmail.com.

5. APPROCHE EPIDEMIO-GEOGRAPHIQUE

Les fichiers fournis par les départements d'informations médicales (DIM) nous ont permis d'obtenir les villes de naissances de 2088 patients porteurs d'AIC. Celui de CEPIDC, nous a donné le lieu de résidence de plus de 700 patients décédés d'une cause liée à un AIC.

Un cas d'AIC défini comme un sujet décédé qui présente parmi les causes initiales ou associées de décès un des codes CIM10 relatifs aux AIC. Le nombre de décès observés (CEPIDC) ou d'hospitalisations (DIM) (O_i) est calculé dans toutes les zones postales. Les cas attendus pour la zone i (E_i) sont calculés en appliquant à la structure de population de la zone en question les taux d'hospitalisation spécifiques par âge d'une population de référence (hospitalisation-type), dans notre cas la population régionale (internal standardization). Pour le CEPIDC, le taux de mortalité considéré pour la standardisation et le calcul des cas attendus est calculé au niveau national. L'indice comparatif de morbidité Standardized Morbidity Ratio (SMR) est une mesure de comparaison calculé comme le rapport entre les effectifs (O_i) les cas attendus (E_i). Un SMR supérieur à 1 indique un nombre d'hospitalisations ou de décès dus à la maladie plus élevé dans la zone étudiée par rapport à la population de référence (moyenne régionale dans notre analyse).

Dans les figures 14 et 15, les zones avec un SMR significativement supérieur à la moyenne régionale sont indiquées par leur nom.

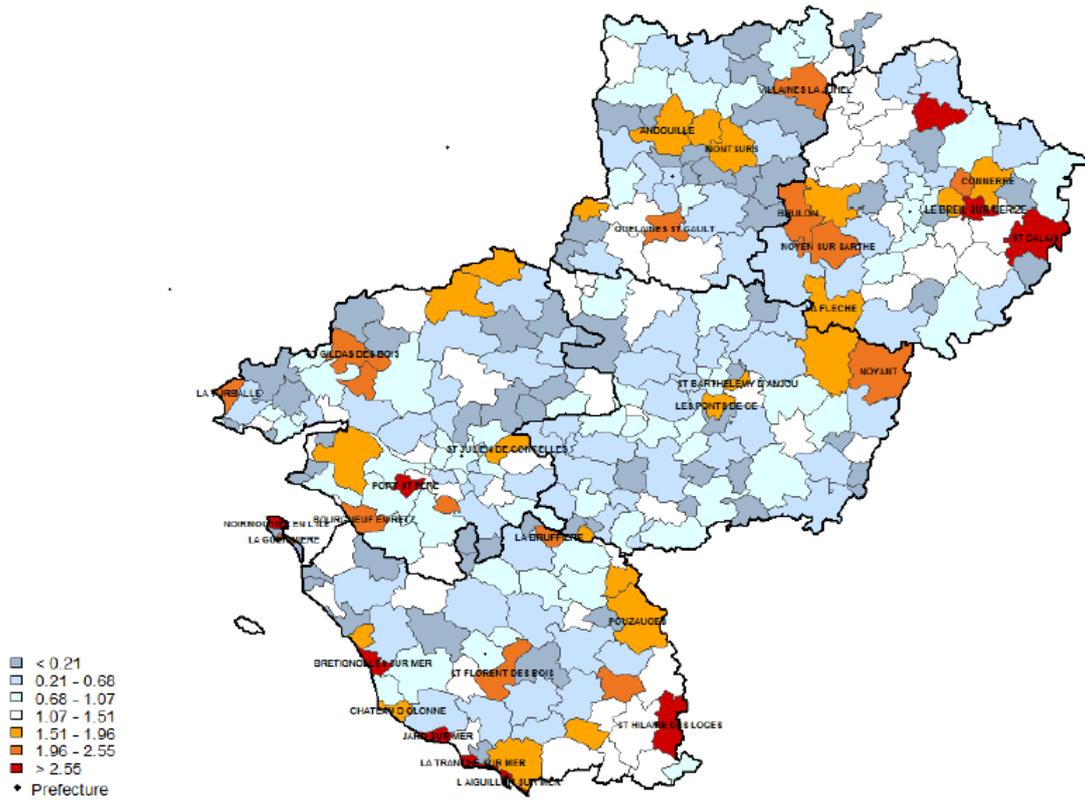


Figure 14 : Indice comparatif (SMR) de personnes décédées pour AIC, par groupe de communes de domicile

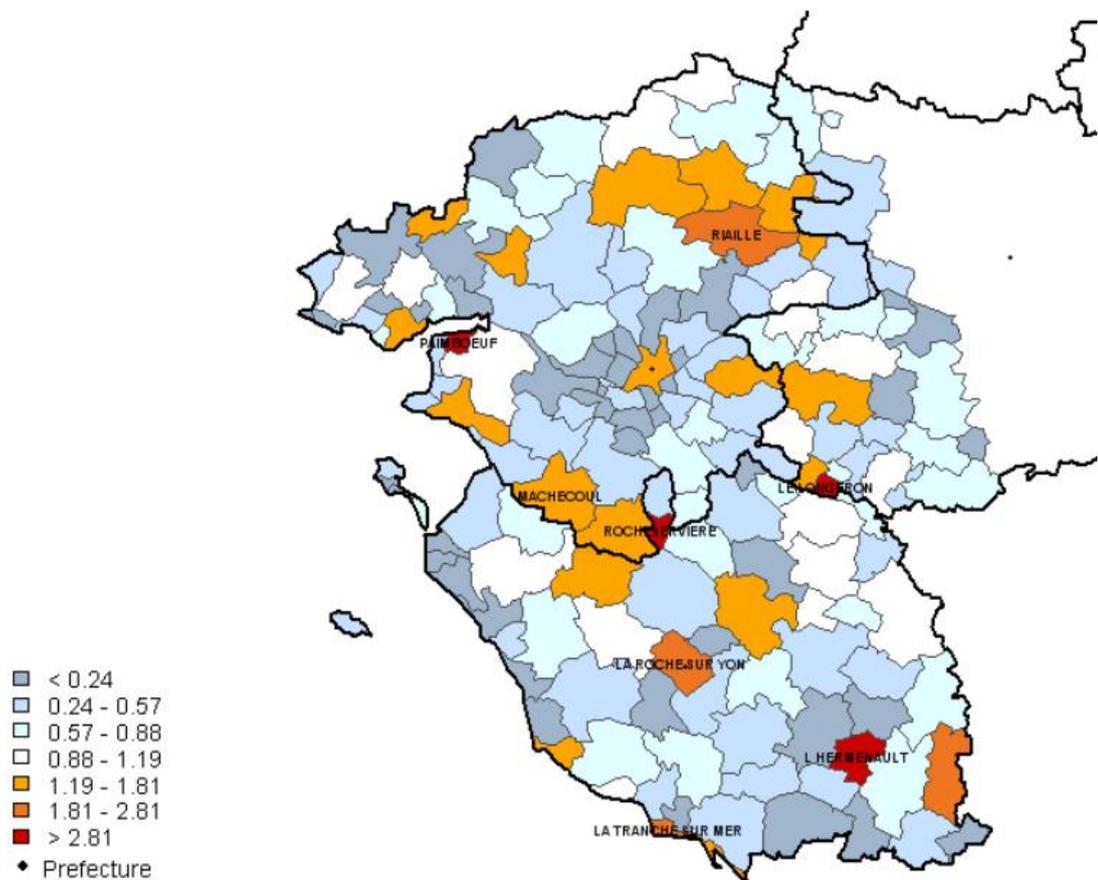


Figure 15 :Indice comparatif (SMR) de personnes hospitalisées dans les DIM avec un diagnostic d'AIC, par groupe de communes de naissance

nomGeo	Nombred'AIC	p_value	ORest
LE LONGERON	5	0.0095	4.38
LA ROCHE SUR YON	107	0	5.9
L HERMENAULT	8	2.00E-04	6.59
ROCHESERVIERE	7	0.0013	5.03

Table 2 : Clusters AIC significatifs pour le fichier DIM

nomGeo	Nombred'AIC	p_value	ORest
LA TURBALLE	5	0.004	10.44
ST CALAIS	6	0.0027	7.34
JARD SUR MER	3	0.0635	5.75

Table 3 : Clusters AIC significatifs pour le fichier CEPIDC

Dans les tableaux 1 et 2, les clusters déterminés dans le scan test sont indiqués (tous significatifs au moins à 0,05), ainsi que leur résultat au test exact (p-value et OR estimé) pour les principales communes repérées. La figure 16 présente la mise en commun de ces clusters DIM et CEPIDC.

Cette approche a été rendue possible par la relative sédentarité des populations observées, notamment dans les zones rurales jusqu'il y a quelques années. Ceci étant, une telle approche est encore possible à ce jour mais perdra en efficacité dans les années à venir. En effet, la plupart des patients de nos fichiers sont nés il y a au moins 50 ans. A cette époque, on pouvait encore espérer, dans des départements comme la Vendée retrouver des cousins dans une zones géographique limitée (la paroisse d'à côté). Ce projet pourrait toutefois être étendu à l'ensemble du territoire français dans le cadre du projet ICAN. Il devra faire l'objet d'une demande CNIL préalable afin de régler les problèmes d'anonymisation des données médicales inhérentes à ce travail.

Des « hot spots » semblent présents en Vendée (85), ce territoire rural est le siège d'isolats génétiques relativement conservées au cours des époques. En effet, et comme cela a été vérifié dans des pathologies telles que le rétrécissement aortique et les troubles de conduction (131,132), ce territoire rural est le siège d'isolats génétiques relativement conservées au cours des époques.

Nous allons maintenant utiliser ces cartographies afin d'optimiser le recrutement de larges familles d'AIC.

B. ARTICLE PUBLIÉ:

UNDERSTANDING THE PATHOPHYSIOLOGY OF INTRACRANIAL ANEURYSM : THE ICAN PROJECT

Le but du projet ICAN est l'identification des voies de signalisation biologiques d'intérêts, pour mieux comprendre la physiopathologie des AIC et proposer une prise en charge personnalisée des formes non rompues d'AIC (familiaux mais aussi sporadiques). Il nous est apparu essentiel de constituer une bio-collection nationale permettant de valider les résultats de nos travaux génétiques et fonctionnels initiés par le projet GAIA sur un large échantillon de malades porteurs d'AIC. Grâce à nos résultats préliminaires, nous avons obtenu un financement ANR-PRTS en 2015 pour mettre en place cette bio-collection nationale. Le projet, initialement centré sur les formes familiales et la génétique, s'est déployé pour inclure aussi les cas sporadiques d'AIC. Nous sommes la seule équipe française travaillant sous cet angle génétique et fonctionnel sur la physiopathologie des AIC et nous avons donc rassemblé un réseau national comptant la quasi-totalité des centres où des AIC sont pris en charge en France (27 centres). Les CHU de Angers, Besançon, Bordeaux, Brest, Clairval, Clermont Ferrand, Colmar, Dijon, La Fondation Rothschild, Grenoble, Le Kremlin Bicêtre, La Pitié Salpêtrière, Lille, Limoges, Montpellier, Nancy, Poitiers, Reims, Rennes, Rouen, Saint Anne, Toulouse et de Tours assurent le recrutement des cas sporadiques et familiaux d'AIC. Nous avons impliqué des neuroradiologues, des neurologues, des neurochirurgiens mais aussi des généticiens et des biologistes vasculaires dans le projet.

En Juillet 2017 et en moins de 10 mois, plus de 1200 patients ont été inclus dans la biocollection nationale ICAN. A terme, nous espérons atteindre les 3000 inclusions

La définition des phénotypes anévrismaux est un élément fondamental de notre protocole. Comme Krings et al, nous pensons qu'une lésion anévrismale au simple sens de dilatation vasculaire peut être le symptôme de différentes maladies (133).

Dans nos projets GAIA puis ICAN, le sujet est bien la physiopathologie des dilatations sacculaires développées au niveau des bifurcations intracrâniennes chez des patients *a priori* indemne de toute autre pathologie systémique. C'est donc une maladie pariétale qui implique la media (134). Ce type d'AIC est sans doute le plus commun et réellement le cas typique face auquel nous sommes confrontés dans notre pratique clinique.

Cette définition exclut donc en premier lieu, les dissections intracrâniennes. Une dissection intracrâniennes correspondant à la survenue d'un hématome dans la paroi de l'artère (135). Parfois, cet hématome qui s'insinue entre la media et l'adventice, conduit à la formation d'une dilatation sacculaire très semblable à un AIC dit "typique". Un des points forts de notre protocole réside dans l'expertise des recruteurs qui sont tous des spécialistes de la pathologie neurovasculaire, capables dans les cas difficiles, de différencier un AIC typique d'une dissection.

Il a toutefois été nécessaire de proposer un phénotype intermédiaire. Malgré le progrès des modalités d'imagerie, il reste difficile d'authentifier un AIC typique devant une lésion de moins de 2 mm (24).

De plus, afin de préciser au mieux le phénotype de certains patients, nous avons établi une collaboration avec des spécialistes en Cardiologie, Ophtalmologie et Médecine vasculaire. En effet, les patients porteurs d'AIC et issus des familles qui agrègent plus de 4 cas bénéficient d'examen complémentaires non invasifs pour rechercher des anomalies vasculaires associées et asymptomatiques. Il est possible que nous découvriions des associations syndromiques encore ignorées mais qui orienteraient vers une voie physiopathologique. C'est pourquoi nous proposons aux patients en questions, un fond d'œil, une échographie trans-thoracique et des artères digestives, et une mesure de la fonction endothéliale.

Nous nous sommes attachés à recueillir de manière très précise les éléments cliniques en lien avec les facteurs de risques environnementaux déjà décrits dans la littérature (11,86). En particulier une quantification précise du tabagisme des patients inclus est demandée et mise en lien avec la date de découverte de l'AIC. Pour l'hypertension artérielle la démarche est plus difficile et nous avons renoncé à une quantification de

l'intensité de celle-ci. Ainsi, seul le statut du patient et son éventuel traitement de ce facteur de risque majeur des AIC sont colligés dans notre étude.

Afin de ne pas alourdir le processus d'inclusion et pour faciliter les extractions de données, nous avons privilégié les questions fermées dans notre CRF. Nous avons donc dû choisir quels étaient les traitements pertinents à recueillir dans notre CRF chez les patients inclus dans ICAN.

Au vu de l'implication bien documentée des processus d'inflammation au sens large (76,136), il était essentiel de savoir si ces patients avait été traités au long cours par des anti-inflammatoires. De même, une littérature assez contradictoire mais riche fait le lien entre les statines et la formation d'AIC (137–139). Enfin compte tenu de la prévalence de la maladie chez la femme ménopausée et des effets des œstrogènes sur la physiopathologie des AIC, les patientes recevant un traitement hormonal substitutif de la ménopause ont été colligées (11,140,141).

Nous avons aussi choisi, toujours dans un souci de simplicité pour les médecins recruteurs, de ne pas colliger d'éléments quantitatifs morphométriques précis sur les AIC des patients inclus. Dans notre CRF, nous leur demandons simplement de préciser la localisation et le grand axe de l'AIC. Ces deux éléments sont facilement accessibles au médecin sans mesure ou manipulation supplémentaires sur les images. Nous comptons sur l'ensemble des imageries natives, transférées sur le serveur SHANOIR, pour réaliser des mesures précises et spécifiques des AIC et des artères porteuses. Nous détaillons ces éléments dans le projet d'imagerie ICAN et du modèle murin *ANGPTL6* KI (cf: Développement du volet imagerie des anévrismes intracrâniens).

Notre projet a trois atouts majeurs, comparé aux projets concurrents :

Tout d'abord, nous nous appuyons sur un recrutement de grande ampleur mais national qui limite l'hétérogénéité génétique et permet de constituer de grande famille dans des zones sédentaires.

Ensuite, le recrutement est effectué par des experts de la pathologie anévrismale intracrânienne dans des centres référents de neuroradiologie interventionnelle et nous disposons de l'ensemble des données d'imagerie pour vérifier les inclusions.

Enfin, nous colligeons des données cliniques, biologiques et d'imagerie quantitative, qui pourront faire l'objet d'un traitement croisé.

Le principal concurrent de notre projet est conduit depuis 2005 par le consortium FIA (142). Ce consortium regroupe des équipes de Nouvelle Zélande, des Etats Unis, d'Allemagne, des Pays Bas et d'Australie. De nombreuses publications ont été produites par ce groupe très actif (43,55,61,63,69). Leurs modalités de recrutement, diffèrent par certains aspects des nôtres (142). Tout d'abord, en raison des contraintes économiques, le dépistage des apparentés au 1^{er} degré ne s'effectue que chez patients de plus de 30 ans, tabagiques ou hypertendus. De notre côté, nous pouvons nous appuyer sur des publications validant en Europe l'intérêt, en terme de coût, d'une démarche de dépistage. Cette démarche est validée chez des patient apparentés au 1^{er} degré quand deux ruptures d'AIC sont survenues dans une famille (37). D'autre part, FIA suit une cohorte et un recueil d'information est fait par téléphone tous les ans chez les participants. Pour le moment, ICAN est une biocollection mais nous avons l'ambition de la faire évoluer rapidement en cohorte nationale.

Romain Bourcier, MD, MSc^{*,†}
 Stéphanie Chatel, PhD[‡]
 Emmanuelle Bourcereau,
 BSc[‡]
 Solène Jouan, BSc[‡]
 Hervé Le Marec, MD, PhD^{*,§}
 Benjamin Daumas-Duport,
 MD, MSc^{*}
 Mathieu Sevin-Allouet, MD,
 PhD[¶]
 Benoit Guillon, MD[¶]
 Vincent Roualdes, MD, MSc^{||}
 Tanguy Riem, MD^{||}
 Bertrand Isidor, MD, MSc[#]
 Pierre Lebranchu, MD, PhD^{**}
 Jérôme Connault, MD,
 MSc^{**}
 Thierry Le Tourneau, MD,
 PhD^{*,§}
 Alban Gaignard, PhD[‡]
 Gervaise Lolrand, PhD[‡]
 Richard Redon, PhD[‡]
 Hubert Desal, MD, PhD^{*,†},
 on behalf of the ICAN
 Investigators

^{*}Neuroradiological Department, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, Nantes, France; [†]L'institut du thorax Nantes, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Nantes, France; [‡]Cardiology Department, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, Nantes, France; [§]Neurology Department, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, Nantes, France; [¶]Neurosurgery Department, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, Nantes, France; ^{||}Clinical genetics Department, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, Nantes, France; [#]Ophthalmologic Department, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, Nantes, France; ^{**}L'institut du thorax Nantes, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

Correspondence:

Romain Bourcier, MD,
 Centre Hospitalier
 Universitaire de Nantes,
 Bd Jacques Monod,
 44000 Nantes, France.
 E-mail: Romain.bourcier2@gmail.com

Received, July 14, 2016.
 Accepted, February 22, 2017.

Copyright © 2016 by the
 Congress of Neurological Surgeons

Understanding the Pathophysiology of Intracranial Aneurysm: The ICAN Project

BACKGROUND: Understanding the pathophysiologic mechanism of intracranial aneurysm (IA) formation is a prerequisite to assess the potential risk of rupture. Nowadays, there are neither reliable biomarkers nor diagnostic tools to predict the formation or the evolution of IA. Increasing evidence suggests a genetic component of IA but genetics studies have failed to identify genetic variation causally related to IA.

OBJECTIVE: To develop diagnostic and predictive tools for the risk of IA formation and rupture.

METHODS: The French ICAN project is a noninterventional nationwide and multicentric research program. Each typical IA of bifurcation will be included. For familial forms, further IA screening will be applied among first-degree relatives. By accurate phenotype description with high-throughput genetic screening, we aim to identify new genes involved in IA. These potential genetic markers will be tested in large groups of patients. Any relevant pathway identified will be further explored in a large cohort of sporadic carriers of IA, which will be well documented with clinical, biological, and imaging data.

EXPECTED OUTCOMES: Discovering genetic risk factors, better understanding the pathophysiology, and identifying molecular mechanisms responsible for IA formation will be essential bases for the development of biomarkers and identification of therapeutic targets.

DISCUSSION: Our protocol has many assets. A nationwide recruitment allows for the inclusion of large pedigrees with familial forms of IA. It will combine accurate phenotyping and comprehensive imaging with high-throughput genetic screening. Last, it will enable exploiting metadata to explore new pathophysiological pathways of interest by crossing clinical, genetic, biological, and imaging information.

KEY WORDS: Aneurysm, Familial, Genetics, Pathophysiology

Neurosurgery 80:621–626, 2017

DOI:10.1093/neuros/nyw135

www.neurosurgery-online.com

GENERAL INFORMATION

Study Dates

May 2016 to May 2019; this study is ongoing.

Funding Agencies

This study was supported by a grant from the National Research Agency and the French Ministry of Health (ANR-DGOS 2015), Agence Nationale de la Recherche, 50, avenue Daumesnil, 75012 PARIS, 01.78.09.80.00—DGOS 14 Avenue Duquesne, 75007 Paris, France, 01 40 56 60 00, The French Regional

Council of Pays de la Loire (RFI VaCaRMe), Hôtel de la région 1, rue de la Loire 44966 Nantes Cedex 9, 02 28 20 50 00, and The Fondation GENAVIE 8 Quai Moncoussu, 44000 Nantes, France, 02 28 08 01 13.

Registry

(Clinical Trial) RC15_0304.

Investigators

The project management is ensured by Dr. Romain Bourcier, MD, and Pr. Hubert Desal, MD, PhD, from the Department of Neuro-radiology of the Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, 8 Quai Moncoussu, 44000 Nantes, France.

L'institut du thorax, INSERM Unit 1087, CNRS, Centre Hospitalier Universitaire of

ABBREVIATIONS: IA, intracranial aneurysm; MRI, magnetic resonance imaging; FAIR, Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable

Nantes, 8 Quai Moncoussu, 44000 Nantes, France, 02 28 08 01 13, particularly director Richard Redon, PhD, ensures the genetic analysis. The codirector of the unit, Gervaise Loirand, PhD, is responsible of the functional analysis for candidate genes.

The ICAN study group is constituted in France of 1 coordinating center (Centre Hospitalier Universitaire of Nantes), 1 genotyping center (L'institut du thorax, INSERM Unit 1087, CNRS, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes), and 22 clinical centers of recruitment.

RATIONALE AND BACKGROUND INFORMATION

Intracranial aneurysms (IA) are acquired cerebrovascular abnormalities affecting 3% of the general population (mean age 50 years).¹ They are characterized by a localized dilation and wall thinning in typical locations in intracranial arteries.² The most notorious and deleterious complication of an IA is the rupture, resulting in subarachnoid hemorrhage that can lead to severe disability and death.³ Unfortunately, there are neither reliable biomarkers nor diagnostic tools to predict the formation and/or the evolution of an IA in any given individual. Current treatments are more or less invasive (microsurgical or endovascular treatment) with a risk of procedural morbidity/mortality.⁴

Although the pathogenesis of IA has been the subject of several studies for many years, the mechanisms underlying their formation, growth, and eventual rupture are largely unknown.⁵ IA are mostly acquired lesions resulting from a defective vascular wall response to local hemodynamic stress.⁶ The structural deterioration of the arterial wall involves inflammation and tissue degeneration with degradation of the extracellular matrix and smooth muscle cell apoptosis.⁷ Risk factors such as hypertension, female sex, increasing age, cigarette smoking, excessive alcohol consumption, and familial history of aneurysm predispose to IA formation and rupture.⁸ Furthermore, increasing evidence suggest a genetic component of IA formation.⁹ Genome-wide association studies and subsequent replication case-control studies identified variants on chromosomes 4q31-23, 8q11, and 9p21.3 that were strongly associated with IA formation.¹⁰ However, these loci explain only 5% of the familial inheritance cases.¹¹

STUDY GOALS AND OBJECTIVES

Our project addresses the urgent and obvious need to develop diagnostic and predictive tools of risk of IA formation and rupture. Discovering genetic risk factors, better understanding the pathophysiology and identifying molecular mechanisms responsible for IA formation will be essential bases for the development of biomarkers and identification of therapeutic targets.

STUDY DESIGN

For this global project including observational and basic science research, we have developed a nationwide collaborative project gathering neuroradiologists, neurologists, neurosurgeons, geneti-

cists, cardiologists, ophthalmologists, vascular specialists, and biologists.

IA Phenotype Definition

A typical IA is defined as a saccular arterial dilatation occurring at a bifurcation of the intracranial vasculature. Neuroradiological phenotyping is performed in each center by experienced interventional neuroradiologists, neurologists, and neurosurgeons, in order to exclude other IA types and to recruit only the typical saccular bifurcation IA.

IA are recorded as follows for all the cases included in the study:

- “Certain”
 - if an imaging exam demonstrates a **typical IA of bifurcation whatever the measurement**,
 - or
 - if medical records document the presence of a **typical IA of bifurcation** on cerebral angiogram, operative report, or autopsy.
- “Uncertain”
 - if an imaging exam demonstrates **an ectasia measuring < 2 mm**,
 - or
 - if medical records document the presence of a **subarachnoid hemorrhage without traumatism** on cerebral angiogram, operative report, or autopsy.

Inclusion and Exclusion Criteria

Inclusion Criteria

- Familial cases of IA: subject carrying a certain IA and at least 1 first-degree relative with a certain IA (no age limit).
- Healthy first-degree relatives: subject of 20 years or more and having at least 2 first-degree relatives with a certain IA. For these, a magnetic resonance imaging (MRI) screening will be proposed.
- Sporadic cases of IA: subject aged 20 years or more with a certain IA.

Exclusion Criteria

- A mycotic, fusiform-shaped, or dissecting IA, an IA in relation with an arteriovenous malformation.
- A family history of polycystic kidney disease, Ehlers–Danlos syndrome, Marfan’s syndrom, fibromuscular dysplasia, or Moyamoya disease.
- A failure to obtain informed consent.

METHODOLOGY

Recruitment Process

Recruitment of Familial Cases and Relatives

Once a potential family is identified, the proband is asked to complete a family history questionnaire; study information sheets and recruitment letters are provided for later distribution to additional family members. Each relative expressing his/her interest to the proband is then contacted by phone.

If he/she meets the inclusion criteria, MRI screening and blood sampling are proposed. In order to optimize the recruitment of large families, only clinical centers with extensive experience in clinical management and IA imaging were selected as recruitment sites.

For each family selected for primary genetic investigations (ie, exome sequencing), the IA phenotype will be further assessed. First, a medical genetics consultant will check whether IA occurrence may result from any syndromic disease (such as Marfan disease or vascular forms of Ehlers–Danlos). Then eye fundus, transthoracic echocardiography, noninvasive analysis of endothelial dysfunction, and echography Doppler analysis of peripheral arteries (subclavians, radials, femorals, renals, digestives, etc.) will be carried out in order to test any other vascular malformation or variation potentially linked to the presence of IA, thus constituting a syndrome yet unknown.

Recruitment of Sporadic Cases

A patient with a **certain and typical IA of bifurcation** seen in consultation will be included, regardless of a history of rupture or treatment.

Data Recorded

Clinical Data

Data related to environmental risk factors are collected for each included patient. Smoking history is recorded as:

- never smoked,
- stopped smoking for more than 3 years,
- stopped smoking for less than 3 years or current smoker.

If the patient was a current or former cigarette smoker, the number of pack-years prior to diagnosis of IA is evaluated.

Parameters as high blood pressure defined as a past history of hypertension prior to the diagnosis of IA, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, alcohol consumption, body mass index, history of migraine (according to the International Headache Society) or of cryptogenic cephalalgia, medical treatment by statins, antiplatelet agents, vitamin K antagonists, long-term intake of anti-inflammatory drugs and hormone replacement therapy are recorded.

History of ruptured IA, stroke, carotid stenosis, ischemic heart disease, lower limbs occlusive arterial disease, cancer, hematologic disorder is also recorded.

Biological Data

The bio collection will consist of blood sampling taken from each included patient; 2 tubes for DNA analysis and 2 tubes for serum extraction.

Imaging Data

IA imaging in first-degree relatives is assured by MRI/MR angiography with the following protocol: MR angiography time of flight, fluid attenuated inversion recovery (FLAIR), gradient echo T2-weighted imaging. The sensitivity of MRI in detecting

IA ranges from 81% to 95%.^{12–20} The interobserver consistency, particularly for IA > 3 mm, is good to excellent (kappa 0.59–0.82).^{13,15–17,19,21}

Angiographic imaging will allow recording all parameters regarding the aneurysm form (height, width, neck size, the presence of lobulation, or wall irregularities) and the parent artery diameter.

Any cervical loop of the carotid artery, hypoplastic first segment of the anterior cerebral artery, basilar or vertebral fenestration, and fetal type of posterior cerebral artery will also be registered.

On the FLAIR imaging sequences, the presence of vascular white matter disease (graded according to the Fazekas classification²²), territorial ischemic sequelae, inflammatory white matter disease, atypical white matter disease evocative of Col4a1 mutation, or Fabry disease will be noted.

On gradient echo T2-weighted imaging, we will quantify the presence of microbleeds in the deep or superficial brain parenchyma.

Some patients, particularly the sporadic cases of IA, that had independently undergone MRI, computed tomography angiography or digital subtraction angiography for their standard clinical care will be reviewed in a blinded manner by neuroradiologists from the coordinating center. Imaging files will be uploaded on a global server for each included patient (SHANOIR).

DISCUSSION

National Recruitments In France

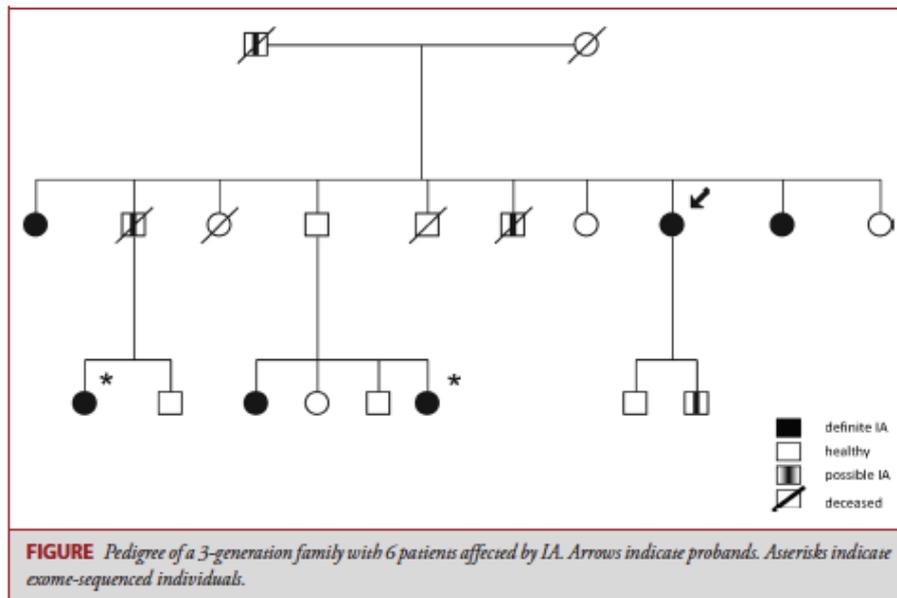
Because populations living in rural areas of western France have been sedentary for centuries, this geographical area is a preferred location to detect and recruit large families with hereditary diseases. By a systematic research of familial history of IA, we have already recruited more than 100 families. We have then selected 4 large families with 4 or more relatives harboring IA for primary genetic investigations based on whole exome sequencing (Figure). In relation with our network, we will also ensure the recruitment of sporadic IA (without familial screening) to constitute a collection of clinical, biological, genetic, but also imaging data of patients with IA.

Whole Exome Sequencing

Whole exome sequencing allows systematic detection of genetic variation across the whole coding portion of the human genome. By this method, one can list the rare genetic variants that are shared between several related individuals affected by IA. The coding portion of the genome is captured, then sequenced. After read alignment and variant calling, a series of filters is applied.

Further Testing of Candidate Genes

In a second step, any candidate genes selected through whole exome sequencing on familial cases are further tested on an extended group of unrelated familial IA carrier, which is currently under construction through our clinical network. In order to test



the presence of rare variants associated with IA in this cohort, rare-variants association studies will be performed.

In addition, the most promising candidates are subjected to preliminary functional investigations, to check whether their biological activity is relevant to the pathophysiology of IA.

Exploiting Diverse and Massive Datasets

Discovering or validating novel risk factors in IA relies in the setup of a data infrastructure capable of jointly exploiting diverse and possibly massive datasets (whole exome sequencing, multi-modality imaging, and clinical data). Based on such a linked data infrastructure, we can imagine *in silico* validation scenarios, ie, algorithms, querying and combining diverse clinical features (age, hypertension, and smoking habits) with circulating or quantitative imaging biomarkers. Following the FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable) data principle and technically adopting a Linked Data approach (structured metadata, reference controlled vocabularies, or ontologies) will allow: (i) to query, filter, and join these heterogeneous datasets from multiple viewpoints, and (ii) to open data reuse perspectives, beyond the project timeframe and beyond its initial objectives.

Conclusion

We launch an ambitious multicenter project (ICAN) addressing the pathophysiology of IA. To date, no transmitted variation related to familial forms of IA has been published. Our protocol has many assets. First, our nationwide recruitment allows for the inclusion of large pedigrees with familial forms of IA. Second, it will combine accurate phenotyping and comprehensive imaging with high-throughput genetic screening. Last, it will enable exploiting metadata to explore new pathophysiological

pathways of interest by crossing clinical, genetic, biological, and imaging information. This should lead us to identify the biological pathways involved in the formation of IA. Currently, no blood test has been established to help in diagnosing IA, and there is still no way to predict the natural history of an IA. Discovering relevant biomarkers would undoubtedly facilitate early detection, risk assessment, and therapeutic monitoring of IA.

TRIAL STATUS

This is an ongoing study.

SAFETY CONSIDERATIONS

No adverse event is expected in this noninterventional study.

FOLLOW-UP

We are building a biocollection but in the close follow-up and depending on the grants obtained, this project will probably become a cohort study with a follow-up corresponding to the recommendation for IA management.

EXPECTED OUTCOMES OF THE STUDY

Discovering biomarkers correlated with the presence of IA should allow better detection and prevention of IA rupture. In the longer term, our systematic nationwide collection of each typical IA of bifurcation together with the registration of clinical, biological, genetic, and morphological data will allow

deciphering the pathophysiology of this orphan, frequent, and serious cerebrovascular disease.

DURATION OF THE PROJECT

We have initially scheduled a recruitment period of 3 years (May 2016 to May 2019), but according to the evolution of the project, we can move towards a cohort study making the project more sustainable.

PROJECT MANAGEMENT

The project management is ensured by Dr. Romain Bourcier, MD, and Pr. Hubert Desal, MD, PhD, from the Department of Neuroradiology of the Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, 8 Quai Moncoussu, 44000 Nantes, France.

L'institut du thorax, INSERM Unit 1087, CNRS, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes, 8 Quai Moncoussu, 44000 Nantes, France, 02 28 08 01 13, particularly director Richard Redon, PhD, ensures the genetic analysis. The codirector of the unit, Gervaise Loirand, PhD, is responsible of the functional analysis for candidate genes.

The ICAN study group is constituted in France of 1 coordinating center (Centre Hospitalier Universitaire of Nantes), 1 genotyping center (L'institut du thorax, INSERM Unit 1087, CNRS, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes), and 22 clinical centers of recruitment.

ETHICS

The ICAN project is a noninterventional clinical research, approved by the Institutional Review Boards (Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé, Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) and Ethics Committees of Nantes. Informed written consent has been obtained from all patients and the biobank called Génétique et biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires, respiratoires et leur facteur de risques is approved by the French Ministry of Research (n° DC-2011-1399) and by the Comité de Protection des Personnes.

Disclosures

This study was supported by a grant from the National Research Agency and the French Ministry of Health (ANR-DGOS 2015), INSERM, the French Regional Council of Pays de la Loire, and the GENAVIE Foundation. The authors have no personal, financial, or institutional interest in any of the drugs, materials, or devices described in this article.

REFERENCES

1. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2011;10:626-636.
2. Laaksamo E, Ramachandran M, Frösen J, et al. Intracellular signaling pathways and size, shape, and rupture history of human intracranial aneurysms. *Neurosurgery.* 2012;70:1565-1572.

3. Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, Linn FHH, De Rooij NK, Rinkel GJE. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2009;8:635-642.
4. Pierot L, Spelle L, Vitry F. Immediate clinical outcome of patients harboring unruptured intracranial aneurysms treated by endovascular approach: results of the ATENA study. *Stroke.* 2008;39:2497-2504.
5. Huttunen T, Von und zuFraunberg M, Frösen J, et al. Saccular intracranial aneurysm disease: distribution of site, size, and age suggests different etiologies for aneurysm formation and rupture in 316 familial and 1454 sporadic eastern Finnish patients. *Neurosurgery.* 2010;66:631-638.
6. Bacigaluppi S, Piccinelli M, Antiga L, et al. Factors affecting formation and rupture of intracranial saccular aneurysms. *Neurosurg Rev.* 2014;37:1-14.
7. Frösen J. Smooth muscle cells and the formation, degeneration, and rupture of saccular intracranial aneurysm wall—a review of current pathophysiological knowledge. *Transl Stroke Res.* 2014;5:347-356.
8. Vlak MHM, Rinkel GJE, Greebe P, Algra A. Independent risk factors for intracranial aneurysms and their joint effect: a case-control study. *Stroke.* 2013;44:984-987.
9. Bourcier R, Redon R, Desal H. Genetic investigations on intracranial aneurysm: update and perspectives. *J Neurovascul.* 2015;42:67-71.
10. Alg VS, Sofat R, Houlden H, Werring DJ. Genetic risk factors for intracranial aneurysms: a meta-analysis in more than 116,000 individuals. *Neurology.* 2013;80:2154-2165.
11. Yasuno K, Bakircioğlu M, Low S-K, et al. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:19707-19712.
12. Huston J, Nichols DA, Luetmer PH, et al. Blinded prospective evaluation of sensitivity of MR angiography to known intracranial aneurysms: importance of aneurysm size. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1994;15:1607-1614.
13. Korogi Y, Takahashi M, Mabuchi N, et al. Intracranial aneurysms: diagnostic accuracy of three-dimensional, Fourier transform, time-of-flight MR angiography. *Radiology.* 1994;193:181-186.
14. Korogi Y, Takahashi M, Mabuchi N, et al. Intracranial aneurysms: diagnostic accuracy of three-dimensional, Fourier transform, time-of-flight MR angiography. *Radiology.* 1994;193:181-186.
15. Wilcock D, Jaspan T, Holland I, Cherryman G, Worthington B. Comparison of magnetic resonance angiography with conventional angiography in the detection of intracranial aneurysms in patients presenting with subarachnoid haemorrhage. *Clin Radiol.* 1996;51:330-334.
16. Maeder PP, Meuli RA, De Tribolet N. Three-dimensional volume rendering for magnetic resonance angiography in the screening and preoperative workup of intracranial aneurysms. *J Neurosurg.* 1996;85:1050-1055.
17. Harrison MJ, Johnson BA, Gardner GM, Welling BG. Preliminary results on the management of unruptured intracranial aneurysms with magnetic resonance angiography and computed tomographic angiography. *Neurosurgery.* 1997;40:947-955.
18. Grandin CB, Mathurin P, Duprez T, et al. Diagnosis of intracranial aneurysms: accuracy of MR angiography at 0.5 T. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1998;19:245-252.
19. Cloft HJ, Kallmes DF, Kallmes MH, Goldstein JH, Jensen ME, Dion JE. Prevalence of cerebral aneurysms in patients with fibromuscular dysplasia: a reassessment. *J Neurosurg.* 1998;88:436-440.
20. Brown BM, Soldevilla F. MR angiography and surgery for unruptured familial intracranial aneurysms in persons with a family history of cerebral aneurysms. *AJR Am J Roentgenol.* 1999;173:133-138.
21. Korogi Y, Takahashi M, Mabuchi N, et al. Intracranial aneurysms: diagnostic accuracy of MR angiography with evaluation of maximum intensity projection and source images. *Radiology.* 1996;199:156-162.
22. Fazekas F, Alavi A, Chawluk JB, et al. Comparison of CT, MR, and PET in Alzheimer's dementia and normal aging. *J Nucl Med.* 1989;30:1607-1615.

Acknowledgments

We thank Stéphanie Bonnaud, Beatrice Guyomarch-Delasalle, Solena Le Scourneac, Matilde Karakachoff, Sandrine Heurtelise Chrétien, Christian Dina, Floriane Simonet, Pierre Lindenbaum, Vimla Mayoura, Séverine Abramatic, Guenola Costes, Maud Rosso, Aurélie Thollet, Antoine Rimbart, Portero Vincent,

Xavier Daumy, Cedric Lenoble, and Alexis Mole. We are also grateful to the Clinical Investigation Center 1413 of Nantes (Guenola Costes, Aurélie Thollet, and Vincent Probst) and the Biological Resource Center (CRB) of CHU Nantes. The ICAN investigators are composed of Bourcier R, Daumas-Duport B, Lenoble C, Alexandre PL, Auffray-Calvier E, Aguilar J, Desal H (University Hospital of Nantes); Pasco A, Berthier E (University Hospital of Angers); Chivot C (University Hospital of Amiens); Velasco S, Boucebeci S (University Hospital of Poitiers); Herbreteau D, Bibi R, Narata AP (University Hospital of Tours); Papagiannaki C (University Hospital of Rouen); Ferré JC, Raoult H, Eugène F, Gauvrit JY (University Hospital of Rennes); Berge J, Barreau X, Marnat G (University Hospital of Bordeaux); Januel AC, Bonneville F, Cognard C, Michelozzi C (University Hospital of Toulouse); Ricolfi F, Thouant P (University Hospital of Dijon); Biondi B (University Hospital of Besançon); Anxionnat R, Tonnellet

R, Derelle AL, Barbier C, Bracard S (University Hospital of Nancy); Salem S, Mounayer C (University Hospital of Limoges); Tahon F, Krainik A (University Hospital of Grenoble); Bintner B, Molho M (University Hospital of La Réunion); Clarençon F, Degos V (La Pitié Salpêtrière—Paris); Labeyrie MA, (Lariboisière—Paris); Naggara O, Trystram D, Rodriguez-Regent C, Ben Hassen W, Boulouis G, Meder JF (Saint Anne Hospital—Paris); Protin M, Redjem H, Blanc R (La FondationRothschild—Paris); SpelleL, Caroff J, Saliou G, Rouchaud A, Ikka L, Moret J (Le Kremlin Bicêtre—Paris); Gentric JC (University Hospital of Brest); Costalat V, Darganzil C, Ecker O (University Hospital of Montpellier); Kazemi A, Lestrade L, Leclerc X (University Hospital of Lille); Musacchio M, Lebedinsky PA (University Hospital of Colmar); Garnier-Viarouge MP (Hospital of LaRoche Sur Yon); Lévrier O (Hospital of Clairval); Aggour M (University Hospital of saint Etienne);

III. CONCLUSION

A ce jour, aucun test biologique ou génétique ne permet d'identifier des patients présentant une majoration du risque relatif de formation d'AIC. Grâce à l'application de stratégie de séquençage d'exome sur les formes familiales d'AIC, *THSD 1*, *RNF213*, *ADAM TS1* voir *TMEM132B* sont récemment apparus comme de potentiels candidats. Pour le moment, les modèles murins ne confirment pas leur implication dans la physiopathologie des AIC. De plus, la formation des AIC est certainement un mécanisme polygénique ce qui implique entre autre, des disparités en fonction des populations étudiées.

Pour tenter de comprendre la physiopathologie anévrismale, notre travail prend comme « porte d'entrée » la génétique et les formes familiales. A l'aide d'approche de séquençage d'exomes sur des formes familiales et grâce à un travail de description phénotypique le plus précis possible, nous faisons émerger des gènes candidats (*ANGPLT6* et *CTSO*) mais aussi des voies de signalisation (développement du polygone de Willis) novateurs.

L'étude du modèle murin transgénique pour *ANGPLT6* et l'étude fonctionnelle in vitro de *CTSO* pourront étayer ces premiers résultats. Grâce à la mise en place d'une collection nationale et multimodale de données unique au monde, un travail de grande échelle sur l'imagerie des artères porteuses de patient porteurs d'AIC sera aussi bientôt conduit. Ces données et métadonnées cliniques, génétiques, biologiques et d'imageries bénéficieront des stratégies de traitement de « Big Data » afin de faire émerger de nouvelles voies de recherche dans la physiopathologie des AIC.

IV. PERSPECTIVES

A. DOSAGE SÉRIQUE D'ANGPTL6 DANS UNE LARGE POPULATION DE PORTEURS D'AIC ET DE TÉMOINS

Afin de valoriser et confirmer l'implication d'*ANGPTL6* dans la formation des AIC, nous devons envisager un screening à large échelle du taux de cette protéine dans une population de porteur d'AIC et de témoins (Etablissement français du sang). Une approche de génétique inverse pourra ensuite nous permettre de rechercher des variations génétiques d'*ANGPTL6* chez les patients dont les taux sanguins sont perturbés.

B. AUTRES EXPLOITATIONS DE LA BIOCOLLECTION ICAN

Nous avons intégré à ICAN une biocollection de cas pédiatriques d'AIC unique au monde. Le "potentiel génétique" des cas pédiatriques est évidemment énorme dans la mesure où ces enfants sont peu ou pas exposés aux facteurs de risques environnementaux d'AIC.

Parmi les patients recrutés dans ICAN, environ 100 patients sont des cas familiaux parfois reliés entre eux. Ainsi l'approche qui a mis en évidence *ANGPTL6* et *CTSO* par séquençage d'exome doit être appliquée afin de mettre en évidence de nouvelles variations génétiques dans ces familles.

Nous avons été contactés par un consortium international (ISGC), afin de mettre en place une collaboration sur une approche de type GWAS. Le génotypage de l'ensemble des patients porteurs d'AIC recrutés dans ICAN nous permettrait de "peser" dans ce consortium.

Nous disposons aussi de données cliniques de grandes valeurs chez les porteurs d'AIC recrutés dans ICAN (quantitatives et précises). Celles-ci peuvent être comparées à une base de données de population. C'est l'occasion de mettre en place des stratégies de « machine learning » et de prédictions très novatrices dans cette pathologie.

C. DEVELOPPEMENT DU VOLET IMAGERIE

Pour les patients porteurs d'AIC inclus dans ICAN, nous disposons d'une imagerie de la vascularisation cérébrale « native » au format DICOM permettant des reconstructions multiples. Selon les cas, un angioscanner, une angioRM ou une artériographie cérébrale sont disponibles. Celles-ci peuvent être comparées à des bases de données d'imagerie en cours de constitution afin d'évaluer des particularités angio-architecturales qui pourraient favoriser la formation d'AIC

Par ailleurs, le modèle murin KI va aussi être étudié sur le plan angioarchitectural. Le micro-scanner constitue la modalité d'imagerie adéquate afin d'observer la vascularisation intracrânienne de notre modèle murin. Une collaboration avec l'UMR 1229 (RMeS, RegenerativeMedicine and Skeleton) nous permet d'obtenir des images de micro-scanner injecté présentant une bonne résolution spatiale (Figure 17).

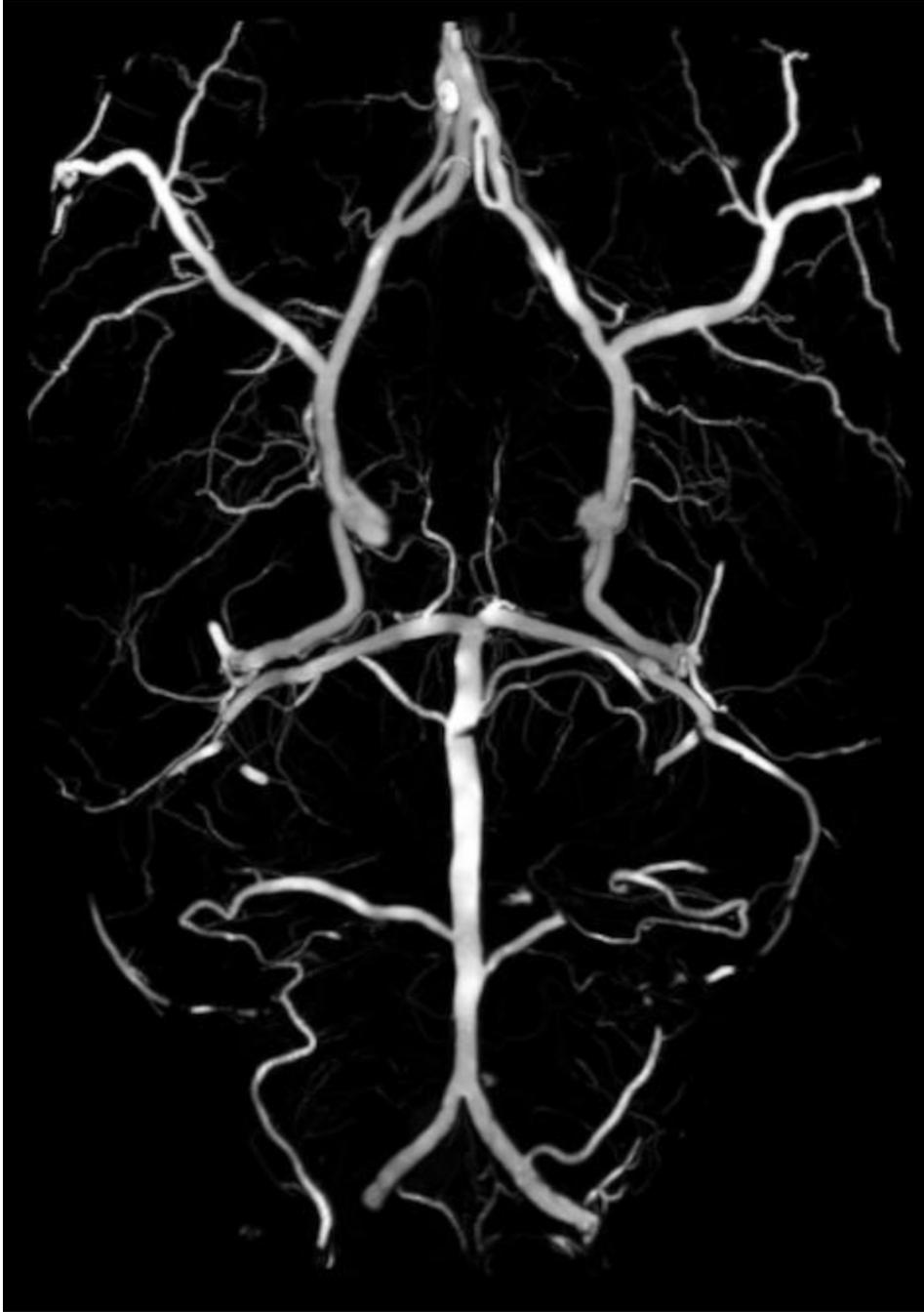


Figure 17 : Vue caudale de la vascularisation encéphalique d'un modèle murin en micro-scanner injecté au baryum.

L'analyse de ces imageries de la vascularisation cérébrale n'est actuellement pas automatisée et reste limitée à une interprétation visuelle et dépendante de l'observateur. Il semble important de s'intéresser à la reproductibilité et à l'automatisation des mesures. La mise en place d'une stratégie d'analyse semi-

automatique ou automatique des images de micro-scanner injectés murins mais aussi des patients porteurs d'AIC recrutés dans ICAN permettrait des mesures fiables, reproductibles et objectives de différents paramètres (tortuosités, angulations des bifurcations, diamètres des artères).

Cette analyse automatisée et reproductible rendra possible la production de données quantitatives pour un recoupement avec les données génétiques, biologiques et cliniques.

Nous disposons en effet d'une infrastructure capable d'exploiter conjointement les données massives recueillies mais aussi d'évaluer l'intérêt de scénarios in-silico, l'interrogation et la combinaison des caractéristiques cliniques avec celles des biomarqueurs biologiques ou d'imagerie. Une telle biocollection de données multimodales est donc une ressource inédite qui propulse la recherche au sujet des AIC dans l'ère des « Big data ».

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980 May;32(3):314–31.
2. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009 Oct 8;461(7265):747–53.
3. Tsuji S. Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. *Hum Mol Genet.* 2010 Apr 15;19(R1):R65-70.
4. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):860–921.
5. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research.* 2002 May 16;12(6):996–1006.
6. Karolchik D, Barber GP, Casper J, Clawson H, Cline MS, Diekhans M, et al. The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D764-770.
7. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature [Internet].* 2005 Jul 31 [cited 2017 May 26]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature03959>
8. Chakravarti A. Population genetics—making sense out of sequence. *Nature Genetics.* 1999 Jan;21:56–60.

9. Probst V, Wilde AAM, Barc J, Sacher F, Babuty D, Mabo P, et al. SCN5A Mutations and the Role of Genetic Background in the Pathophysiology of Brugada Syndrome. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2009 Dec 1;2(6):552–7.
10. Rinkel GJ, Djibuti M, Algra A, van Gijn J. Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. *Stroke*. 1998 Jan;29(1):251–6.
11. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2011 Jul;10(7):626–36.
12. Ronkainen A, Hernesniemi J, Ryynänen M. Familial subarachnoid hemorrhage in east Finland, 1977-1990. *Neurosurgery*. 1993 Nov;33(5):787-796-797.
13. Rhoton AL Jr, Saeki N, Perlmutter D, Zeal A. Microsurgical anatomy of common aneurysm sites. *Clin Neurosurg*. 1979;26:248–306.
14. Nieuwkamp DJ, de Gans K, Algra A, Albrecht KW, Boomstra S, Brouwers PJAM, et al. Timing of aneurysm surgery in subarachnoid haemorrhage--an observational study in The Netherlands. *Acta Neurochir (Wien)*. 2005 Aug;147(8):815–21.
15. Molyneux A, Kerr R, Stratton I, Sandercock P, Clarke M, Shrimpton J, et al. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. *Lancet*. 2002 Oct 26;360(9342):1267–74.
16. de Rooij SE, Abu-Hanna A, Levi M, de Jonge E. Identification of high-risk subgroups in very elderly intensive care unit patients. *Crit Care*. 2007;11(2):R33.
17. Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J 3rd, Meissner I, Brown RDJ, Piepgras DG, et al. Unruptured intracranial aneurysms: natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. *Lancet*. 2003 Jul 12;362(9378):103–10.
18. Clarke M. Systematic review of reviews of risk factors for intracranial aneurysms. *Neuroradiology*. 2008 Aug;50(8):653–64.

19. You S-H, Kong D-S, Kim J-S, Jeon P, Kim KH, Roh HK, et al. Characteristic features of unruptured intracranial aneurysms: predictive risk factors for aneurysm rupture. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2010 May;81(5):479–84.
20. Ujiie H, Tachibana H, Hiramatsu O, Hazel AL, Matsumoto T, Ogasawara Y, et al. Effects of size and shape (aspect ratio) on the hemodynamics of saccular aneurysms: a possible index for surgical treatment of intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 1999 Jul;45(1):119-129-130.
21. Rahman M, Smietana J, Hauck E, Hoh B, Hopkins N, Siddiqui A, et al. Size ratio correlates with intracranial aneurysm rupture status: a prospective study. *Stroke*. 2010 May;41(5):916–20.
22. Backes D, Rinkel GJE, Greving JP, Velthuis BK, Murayama Y, Takao H, et al. ELAPSS score for prediction of risk of growth of unruptured intracranial aneurysms. *Neurology*. 2017 Apr 25;88(17):1600–6.
23. Backes D, Vergouwen MDI, Tiel Groenestege AT, Bor ASE, Velthuis BK, Greving JP, et al. PHASES Score for Prediction of Intracranial Aneurysm Growth. *Stroke*. 2015 May;46(5):1221–6.
24. Korogi Y, Takahashi M, Mabuchi N, Miki H, Fujiwara S, Horikawa Y, et al. Intracranial aneurysms: diagnostic accuracy of three-dimensional, Fourier transform, time-of-flight MR angiography. *Radiology*. 1994 Oct;193(1):181–6.
25. Schwab KE, Gailloud P, Wyse G, Tamargo RJ. LIMITATIONS OF MAGNETIC RESONANCE IMAGING AND MAGNETIC RESONANCE ANGIOGRAPHY IN THE DIAGNOSIS OF INTRACRANIAL ANEURYSMS. *Neurosurgery*. 2008 Jul;63(1):29–35.
26. Rinkel GJE. Intracranial aneurysm screening: indications and advice for practice. *Lancet Neurol*. 2005 Feb;4(2):122–8.
27. Raaymakers TW. Aneurysms in relatives of patients with subarachnoid hemorrhage: frequency and risk factors. MARS Study Group. *Magnetic Resonance*

- Angiography in Relatives of patients with Subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 1999 Sep 22;53(5):982–8.
28. Pierot L, Spelle L, Vitry F. Immediate clinical outcome of patients harboring unruptured intracranial aneurysms treated by endovascular approach: results of the ATENA study. *Stroke*. 2008 Sep;39(9):2497–504.
 29. Gory B, Bonafé A, Pierot L, Spelle L, Berge J, Piotin M, et al. Safety and efficacy of flow-diverter stents in endovascular treatment of intracranial aneurysm: interest of the prospective DIVERSION observational study. *J Neuroradiol*. 2014 May;41(2):93–6.
 30. Saleme S, Iosif C, Ponomarjova S, Mendes G, Camilleri Y, Caire F, et al. Flow-diverting stents for intracranial bifurcation aneurysm treatment. *Neurosurgery*. 2014 Dec;75(6):623–631; quiz 631.
 31. Iosif C, Lecomte J-C, Pedrolo-Silveira E, Mendes G, Boncoeur Martel M-P, Saleme S, et al. Evaluation of ischemic lesion prevalence after endovascular treatment of intracranial aneurysms, as documented by 3-T diffusion-weighted imaging: a 2-year, single-center cohort study. *J Neurosurg*. 2017 Jun 9;1–10.
 32. Pierot L, Biondi A, Narata A-P, Mihalea C, Januel A-C, Metaxas G, et al. Should indications for WEB aneurysm treatment be enlarged? Report of a series of 20 patients with aneurysms in “atypical” locations for WEB treatment. *J Neuroradiol*. 2017 Jun;44(3):203–9.
 33. Farnoush A, Avolio A, Qian Y. Effect of Bifurcation Angle Configuration and Ratio of Daughter Diameters on Hemodynamics of Bifurcation Aneurysms. *American Journal of Neuroradiology*. 2013 Feb 1;34(2):391–6.
 34. Farnoush A, Avolio A, Qian Y. A growth model of saccular aneurysms based on hemodynamic and morphologic discriminant parameters for risk of rupture. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2014 Sep;21(9):1514–9.

35. Rouchaud A, Journé C, Louedec L, Ollivier V, Derkaoui M, Michel J-B, et al. Autologous mesenchymal stem cell endografting in experimental cerebrovascular aneurysms. *Neuroradiology*. 2013 Jun;55(6):741–9.
36. Bor ASE, Rinkel GJE, van Norden J, Wermer MJH. Long-term, serial screening for intracranial aneurysms in individuals with a family history of aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a cohort study. *Lancet Neurol*. 2014 Apr;13(4):385–92.
37. Bor ASE, Koffijberg H, Wermer MJH, Rinkel GJE. Optimal screening strategy for familial intracranial aneurysms: a cost-effectiveness analysis. *Neurology*. 2010 May 25;74(21):1671–9.
38. Bor ASE, Rinkel GJE, Adami J, Koffijberg H, Ekblom A, Buskens E, et al. Risk of subarachnoid haemorrhage according to number of affected relatives: a population based case-control study. *Brain*. 2008 Oct;131(Pt 10):2662–5.
39. Korja M, Silventoinen K, McCarron P, Zdravkovic S, Skytthe A, Haapanen A, et al. Genetic epidemiology of spontaneous subarachnoid hemorrhage: Nordic Twin Study. *Stroke*. 2010 Nov;41(11):2458–62.
40. Korja M, Kaprio J. Controversies in epidemiology of intracranial aneurysms and SAH. *Nature Reviews Neurology*. 2015 Dec 16;12(1):50–5.
41. Brown RD, Huston J, Hornung R, Foroud T, Kallmes DF, Kleindorfer D, et al. Screening for brain aneurysm in the Familial Intracranial Aneurysm study: frequency and predictors of lesion detection. *J Neurosurg*. 2008 Jun;108(6):1132–8.
42. Mackey J, Brown RD, Sauerbeck L, Hornung R, Moomaw CJ, Koller DL, et al. Affected Twins in the Familial Intracranial Aneurysm Study. *Cerebrovascular Diseases*. 2015;39(2):82–6.
43. Foroud T, Sauerbeck L, Brown R, Anderson C, Woo D, Kleindorfer D, et al. Genome screen in familial intracranial aneurysm. *BMC Med Genet*. 2009;10:3.

44. Regalado ES, Guo D-C, Villamizar C, Avidan N, Gilchrist D, McGillivray B, et al. Exome sequencing identifies SMAD3 mutations as a cause of familial thoracic aortic aneurysm and dissection with intracranial and other arterial aneurysms. *Circ Res.* 2011 Sep 2;109(6):680–6.
45. Longstreth WT, Nelson LM, Koepsell TD, van Belle G. Subarachnoid hemorrhage and hormonal factors in women. A population-based case-control study. *Ann Intern Med.* 1994 Aug 1;121(3):168–73.
46. Thierry A, Ballivet J, Dumas R, Binnert D, Nivelon A, Foissac JC, et al. [Familial cases of intracranial aneurysms. Review of the literature and case report]. *Neurochirurgie.* 1972 Jun;18(3):267–76.
47. Nahed BV, Seker A, Guclu B, Ozturk AK, Finberg K, Hawkins AA, et al. Mapping a Mendelian form of intracranial aneurysm to 1p34.3-p36.13. *Am J Hum Genet.* 2005 Jan;76(1):172–9.
48. Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Takakura K, Hori T, Takeda J, et al. Genomewide-linkage and haplotype-association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7q11. *Am J Hum Genet.* 2001 Oct;69(4):804–19.
49. Olson JM, Vongpunsawad S, Kuivaniemi H, Ronkainen A, Hernesniemi J, Ryyänen M, et al. Search for intracranial aneurysm susceptibility gene(s) using Finnish families. *BMC Med Genet.* 2002 Aug 1;3:7.
50. van der Voet M, Olson JM, Kuivaniemi H, Dudek DM, Skunca M, Ronkainen A, et al. Intracranial aneurysms in Finnish families: confirmation of linkage and refinement of the interval to chromosome 19q13.3. *Am J Hum Genet.* 2004 Mar;74(3):564–71.
51. Farnham JM, Camp NJ, Neuhausen SL, Tsuruda J, Parker D, MacDonald J, et al. Confirmation of chromosome 7q11 locus for predisposition to intracranial aneurysm. *Hum Genet.* 2004 Feb;114(3):250–5.

52. Akagawa H, Tajima A, Sakamoto Y, Krischek B, Yoneyama T, Kasuya H, et al. A haplotype spanning two genes, ELN and LIMK1, decreases their transcripts and confers susceptibility to intracranial aneurysms. *Hum Mol Genet.* 2006 May 15;15(10):1722–34.
53. Ruigrok YM, Wijmenga C, Rinkel GJE, van't Slot R, Baas F, Wolfs M, et al. Genomewide linkage in a large Dutch family with intracranial aneurysms: replication of 2 loci for intracranial aneurysms to chromosome 1p36.11-p36.13 and Xp22.2-p22.32. *Stroke.* 2008 Apr;39(4):1096–102.
54. Biros E, Golledge J. Meta-analysis of whole-genome linkage scans for intracranial aneurysm. *Neurosci Lett.* 2008 Jan 24;431(1):31–5.
55. Foroud T, Sauerbeck L, Brown R, Anderson C, Woo D, Kleindorfer D, et al. Genome screen to detect linkage to intracranial aneurysm susceptibility genes: the Familial Intracranial Aneurysm (FIA) study. *Stroke.* 2008 May;39(5):1434–40.
56. Tromp G, Weinsheimer S, Ronkainen A, Kuivaniemi H. Molecular basis and genetic predisposition to intracranial aneurysm. *Annals of Medicine.* 2014 Dec;46(8):597–606.
57. Womack JE, Jang H-J, Lee MO. Genomics of complex traits. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Oct;1271:33–6.
58. Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Low S-K, Krischek B, Auburger G, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet.* 2010 May;42(5):420–5.
59. Bilguvar K, Yasuno K, Niemelä M, Ruigrok YM, von Und Zu Fraunberg M, van Duijn CM, et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1472–7.
60. Yasuno K, Bakircioğlu M, Low S-K, Bilgüvar K, Gaál E, Ruigrok YM, et al. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with

- intracranial aneurysm risk. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Dec 6;108(49):19707–12.
61. Foroud T, Koller DL, Lai D, Sauerbeck L, Anderson C, Ko N, et al. Genome-Wide Association Study of Intracranial Aneurysms Confirms Role of Anril and SOX17 in Disease Risk. *Stroke*. 2012 Nov;43(11):2846–52.
 62. Low S-K, Takahashi A, Cha P-C, Zembutsu H, Kamatani N, Kubo M, et al. Genome-wide association study for intracranial aneurysm in the Japanese population identifies three candidate susceptible loci and a functional genetic variant at EDNRA. *Hum Mol Genet*. 2012 May 1;21(9):2102–10.
 63. Foroud T, Lai D, Koller D, Van't Hof F, Kurki MI, Anderson CS, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies a new association on chromosome 7. *Stroke*. 2014 Nov;45(11):3194–9.
 64. Alg VS, Sofat R, Houlden H, Werring DJ. Genetic risk factors for intracranial aneurysms: a meta-analysis in more than 116,000 individuals. *Neurology*. 2013 Jun 4;80(23):2154–65.
 65. van 't Hof FNG, Kurki MI, Kleinloog R, de Bakker PIW, von und zu Fraunberg M, Jääskeläinen JE, et al. Genetic risk load according to the site of intracranial aneurysms. *Neurology*. 2014 Jul 1;83(1):34–9.
 66. Peymani A, Adams HHH, Cremers LGM, Krestin G, Hofman A, van Duijn CM, et al. Genetic Determinants of Unruptured Intracranial Aneurysms in the General Population. *Stroke*. 2015 Oct;46(10):2961–4.
 67. Bakir-Gungor B, Sezerman OU. The identification of pathway markers in intracranial aneurysm using genome-wide association data from two different populations. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e57022.
 68. Lee S, Kim I-K, Ahn JS, Woo D-C, Kim S-T, Song S, et al. Deficiency of Endothelium-Specific Transcription Factor Sox17 Induces Intracranial Aneurysm. *Circulation*. 2015 Mar 17;131(11):995–1005.

69. Foroud T, FIA Study Investigators. Whole exome sequencing of intracranial aneurysm. *Stroke*. 2013 Jun;44(6 Suppl 1):S26-28.
70. Farlow JL, Lin H, Sauerbeck L, Lai D, Koller DL, Pugh E, et al. Lessons Learned from Whole Exome Sequencing in Multiplex Families Affected by a Complex Genetic Disorder, Intracranial Aneurysm. Li Y, editor. *PLOS ONE*. 2015 Mar 24;10(3):e0121104.
71. Yan J, Hitomi T, Takenaka K, Kato M, Kobayashi H, Okuda H, et al. Genetic Study of Intracranial Aneurysms. *Stroke*. 2015 Mar;46(3):620–6.
72. Zhou S, Ambalavanan A, Rochefort D, Xie P, Bourassa CV, Hince P, et al. RNF213 Is Associated with Intracranial Aneurysms in the French-Canadian Population. *The American Journal of Human Genetics*. 2016 Nov;99(5):1072–85.
73. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*. 2011 Jan;56(1):34–40.
74. Santiago-Sim T, Fang X, Hennessy ML, Nalbach SV, DePalma SR, Lee MS, et al. *THSD1* (Thrombospondin Type 1 Domain Containing Protein 1) Mutation in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2016 Dec;47(12):3005–13.
75. Santiago-Sim T, Depalma SR, Ju KL, McDonough B, Seidman CE, Seidman JG, et al. Genomewide linkage in a large Caucasian family maps a new locus for intracranial aneurysms to chromosome 13q. *Stroke*. 2009 Mar;40(3 Suppl):S57-60.
76. Chalouhi N, Ali MS, Jabbour PM, Tjoumakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, et al. Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012 Sep;32(9):1659–76.
77. Brinjikji W, Ding YH, Kallmes DF, Kadirvel R. From bench to bedside: utility of the rabbit elastase aneurysm model in preclinical studies of intracranial aneurysm treatment. *J Neurointerv Surg*. 2016 May;8(5):521–5.

78. Frösen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemelä M, Hernesniemi J, et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke*. 2004 Oct;35(10):2287–93.
79. Gosgnach W, Messika-Zeitoun D, Gonzalez W, Philippe M, Michel JB. Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2000 Dec;279(6):C1880-1888.
80. Coutard M, Osborne-Pellegrin M, Fontaine V, Jacob M-P, Michel J-B. High-flow-induced arterial remodeling in rats with different susceptibilities to cerebral aneurysms. *J Vasc Res*. 2006;43(3):217–28.
81. Meng H, Wang Z, Hoi Y, Gao L, Metaxa E, Swartz DD, et al. Complex hemodynamics at the apex of an arterial bifurcation induces vascular remodeling resembling cerebral aneurysm initiation. *Stroke*. 2007 Jun;38(6):1924–31.
82. Tada Y, Yagi K, Kitazato KT, Tamura T, Kinouchi T, Shimada K, et al. Reduction of endothelial tight junction proteins is related to cerebral aneurysm formation in rats. *J Hypertens*. 2010 Sep;28(9):1883–91.
83. Fontaine V, Jacob M-P, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol*. 2002 Nov;161(5):1701–10.
84. Coutard M, Touat Z, Houard X, Leclercq A, Michel J-B. Thrombus versus wall biological activities in experimental aortic aneurysms. *J Vasc Res*. 2010;47(4):355–66.
85. Berge J, Blanco P, Rooryck C, Boursier R, Marnat G, Gariel F, et al. Understanding flow patterns and inflammatory status in intracranial aneurysms: Towards a personalized medicine. *J Neuroradiol*. 2016 Mar;43(2):141–7.

86. Vlak MHM, Rinkel GJE, Greebe P, Algra A. Independent risk factors for intracranial aneurysms and their joint effect: a case-control study. *Stroke*. 2013 Apr;44(4):984–7.
87. Yu L, Wang J, Wang S, Zhang D, Zhao Y, Wang R, et al. DNA methylation regulates gene expression in intracranial aneurysms. *World Neurosurg*. 2017 Apr 19;
88. Hou W-Z, Chen X-L, Wu W, Hang C-H. MicroRNA-370-3p inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation via targeting KDR/AKT signaling pathway in cerebral aneurysm. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Mar;21(5):1080–7.
89. Sun X, Lu J, Zhang L, Song H, Zhao L, Fan H, et al. Aberrant microRNA expression in peripheral plasma and mononuclear cells as specific blood-based biomarkers in schizophrenia patients. *J Clin Neurosci*. 2015 Mar;22(3):570–4.
90. Wang W-H, Wang Y-H, Zheng L-L, Li X-W, Hao F, Guo D. MicroRNA-29a: A potential biomarker in the development of intracranial aneurysm. *J Neurol Sci*. 2016 May 15;364:84–9.
91. Sima X, Sun H, Zhou P, You C, Cai B. Association between functional polymorphisms in the promoter of the miR-143/145 cluster and risk of intracranial aneurysm. *Sci Rep*. 2017 Mar 8;7:43633.
92. Li H, Wang W, Zhang L, Lan Q, Wang J, Cao Y, et al. Identification of a Long Noncoding RNA-Associated Competing Endogenous RNA Network in Intracranial Aneurysm. *World Neurosurg*. 2017 Jan;97:684–692.e4.
93. Roder C, Kasuya H, Harati A, Tatagiba M, Inoue I, Krischek B. Meta-analysis of microarray gene expression studies on intracranial aneurysms. *Neuroscience*. 2012 Jan 10;201:105–13.
94. Kleinloog R, Verweij BH, van der Vlies P, Deelen P, Swertz MA, de Munnick L, et al. RNA Sequencing Analysis of Intracranial Aneurysm Walls Reveals Involvement of Lysosomes and Immunoglobulins in Rupture. *Stroke*. 2016 May;47(5):1286–93.

95. van 't Hof FNG, Ruigrok YM, Medic J, Sanjabi B, van der Vlies P, Rinkel GJE, et al. Whole Blood Gene Expression Profiles of Patients with a Past Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0139352.
96. Oike Y, Ito Y, Maekawa H, Morisada T, Kubota Y, Akao M, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3760–5.
97. Santulli G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:4.
98. Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Jan;18(1):6–14.
99. Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, Kowalski J, Nagel M, Hass P, et al. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation in vivo. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):17281–90.
100. Ebert T, Kralisch S, Loessner U, Jessnitzer B, Stumvoll M, Fasshauer M, et al. Relationship between serum levels of angiopoietin-related growth factor and metabolic risk factors. *Horm Metab Res*. 2014 Sep;46(10):685–90.
101. Boztosun A, Deveci K, Klçl F, Söylemez MS, Muhtaroglu S, Müderris II. Serum levels of angiopoietin-related growth factor (AGF) are increased in polycystic ovary syndrome. *J Investig Med*. 2012 Jun;60(5):813–7.
102. Stepan H, Ebert T, Schrey S, Reisenbüchler C, Stein S, Lossner U, et al. Serum levels of angiopoietin-related growth factor are increased in preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2009 Mar;22(3):314–8.
103. Urano T, Ito Y, Akao M, Sawa T, Miyata K, Tabata M, et al. Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 May;28(5):827–34.

104. Zhang Y, Hu X, Tian R, Wei W, Hu W, Chen X, et al. Angiopoietin-related growth factor (AGF) supports adhesion, spreading, and migration of keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells through interaction with RGD-binding integrins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Aug 18;347(1):100–8.
105. Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, et al. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):400–8.
106. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2011 Jul;10(7):626–36.
107. Laaksamo E, Ramachandran M, Frösen J, Tulamo R, Baumann M, Friedlander RM, et al. Intracellular signaling pathways and size, shape, and rupture history of human intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 2012 Jun;70(6):1565-1572-1573.
108. Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, Linn FHH, de Rooij NK, Rinkel GJE. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2009 Jul;8(7):635–42.
109. Huttunen T, von und zu Fraunberg M, Frösen J, Lehecka M, Tromp G, Helin K, et al. Saccular intracranial aneurysm disease: distribution of site, size, and age suggests different etiologies for aneurysm formation and rupture in 316 familial and 1454 sporadic eastern Finnish patients. *Neurosurgery*. 2010 Apr;66(4):631–638; discussion 638.
110. Bacigaluppi S, Piccinelli M, Antiga L, Veneziani A, Passerini T, Rampini P, et al. Factors affecting formation and rupture of intracranial saccular aneurysms. *Neurosurg Rev*. 2014 Jan;37(1):1–14.
111. Frösen J. Smooth muscle cells and the formation, degeneration, and rupture of saccular intracranial aneurysm wall--a review of current pathophysiological knowledge. *Transl Stroke Res*. 2014 Jun;5(3):347–56.

112. Vlak MHM, Rinkel GJE, Greebe P, Algra A. Independent risk factors for intracranial aneurysms and their joint effect: a case-control study. *Stroke*. 2013 Apr;44(4):984–7.
113. Bourcier R, Redon R, Desal H. Genetic investigations on intracranial aneurysm: Update and perspectives. *J Neuroradiol*. 2015 Feb 9;
114. Alg VS, Sofat R, Houlden H, Werring DJ. Genetic risk factors for intracranial aneurysms: A meta-analysis in more than 116,000 individuals. *Neurology*. 2013 Jun 4;80(23):2154–65.
115. Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22542.
116. Bourcier R, Chatel S, Bourcereau E, Jouan S, Marec HL, Daumas-Duport B, et al. Understanding the Pathophysiology of Intracranial Aneurysm: The ICAN Project. *Neurosurgery*. 2017 Apr 1;80(4):621–6.
117. Lindenbaum P, Le Scouarnec S, Portero V, Redon R. Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinformatics*. 2011 Nov 15;27(22):3200–1.
118. Han L, Abney M. Identity by descent estimation with dense genome-wide genotype data. *Genetic Epidemiology*. 2011;n/a-n/a.
119. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*. 2013 Mar 1;14(2):178–92.
120. Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):70–9.

121. Kessler K, Borges LF, Ho-Tin-Noé B, Jondeau G, Michel J-B, Vranckx R. Angiogenesis and remodelling in human thoracic aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2014 Oct 1;104(1):147–59.
122. Li B, Li F, Chi L, Zhang L, Zhu S. The expression of SPARC in human intracranial aneurysms and its relationship with MMP-2/-9. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e58490.
123. Hoh BL, Hosaka K, Downes DP, Nowicki KW, Wilmer EN, Velat GJ, et al. Stromal cell-derived factor-1 promoted angiogenesis and inflammatory cell infiltration in aneurysm walls. *J Neurosurg.* 2014 Jan;120(1):73–86.
124. Leblanc GG, Golanov E, Awad IA, Young WL, Biology of Vascular Malformations of the Brain NINDS Workshop Collaborators. Biology of vascular malformations of the brain. *Stroke.* 2009 Dec;40(12):e694-702.
125. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999 Jun;126(14):3047–55.
126. Bourcier R, Lenoble C, Guyomarch-Delasalle B, Daumas-Duport B, Papagiannaki C, Redon R, et al. Is there an inherited anatomical conformation favoring aneurysmal formation of the anterior communicating artery? *J Neurosurg.* 2017 May;126(5):1598–605.
127. Mackey J, Brown RD Jr, Moomaw CJ, Hornung R, Sauerbeck L, Woo D, et al. Familial Intracranial Aneurysms: Is Anatomic Vulnerability Heritable? *Stroke.* 2013 Jan;44(1):38–42.
128. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Hashimoto N. Cathepsin B, K, and S Are Expressed in Cerebral Aneurysms and Promote the Progression of Cerebral Aneurysms. *Stroke.* 2008 Sep 1;39(9):2603–10.

129. Guo D, Wang Y-W, Ma J, Yan L, Li T-F, Han X-W, et al. Study on the role of Cathepsin B and JNK signaling pathway in the development of cerebral aneurysm. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016 May;9(5):499–502.
130. Kaspera W, Ładziński P, Larysz P, Hebda A, Ptaszkiewicz K, Kopera M, et al. Morphological, hemodynamic, and clinical independent risk factors for anterior communicating artery aneurysms. *Stroke*. 2014 Oct;45(10):2906–11.
131. Gourraud JB, Kyndt F, Fouchard S, Rendu E, Jaafar P, Gully C, et al. Identification of a strong genetic background for progressive cardiac conduction defect by epidemiological approach. *Heart*. 2012 Sep;98(17):1305–10.
132. Probst V, Le Scouarnec S, Legendre A, Jousseau V, Jaafar P, Nguyen J-M, et al. Familial aggregation of calcific aortic valve stenosis in the western part of France. *Circulation*. 2006 Feb 14;113(6):856–60.
133. Krings T, Lasjaunias PL, Geibprasert S, Pereira V, Hans FJ. The aneurysmal wall. The key to a subclassification of intracranial arterial aneurysm vasculopathies? *Interv Neuroradiol*. 2008 Sep 1;14 Suppl 1:39–47.
134. Canham PB, Finlay HM. Morphometry of medial gaps of human brain artery branches. *Stroke*. 2004 May;35(5):1153–7.
135. Bourcier R, Papagiannaki C, Bibi R, Cottier JP, Herbreteau D. Intracranial dissection: incidence and long term endovascular treatment results of a not so rare disease. *Clin Neurol Neurosurg*. 2012 Nov;114(9):1248–53.
136. Chalouhi N, Ali MS, Starke RM, Jabbour PM, Tjoumakaris SI, Gonzalez LF, et al. Cigarette smoke and inflammation: role in cerebral aneurysm formation and rupture. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:271582.
137. Brinjikji W, Yong Hong D, Dai D, Schroeder DJ, Kallmes DF, Kadirvel R. Statins are not associated with short-term improved aneurysm healing in a rabbit model of unruptured aneurysms. *J Neurointerv Surg*. 2017 Feb;9(2):200–3.

138. Tada Y, Kitazato KT, Yagi K, Shimada K, Matsushita N, Kinouchi T, et al. Statins promote the growth of experimentally induced cerebral aneurysms in estrogen-deficient rats. *Stroke*. 2011 Aug;42(8):2286–93.
139. Aoki T. Future prospects for the development of a novel medical therapy for intracranial aneurysm. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2016 Aug;148(2):86–91.
140. Tada Y, Wada K, Shimada K, Makino H, Liang EI, Murakami S, et al. Estrogen protects against intracranial aneurysm rupture in ovariectomized mice. *Hypertension*. 2014 Jun;63(6):1339–44.
141. Wu C, Liu Y, He M, Zhu L, You C. Single Operation with Simplified Incisions to Build an Experimental Cerebral Aneurysm Model by Induced Hemodynamic Stress and Estrogen Deficiency in Rats. *Turk Neurosurg*. 2016;26(1):62–8.
142. Broderick JP, Sauerbeck LR, Foroud T, Huston J, Pankratz N, Meissner I, et al. The Familial Intracranial Aneurysm (FIA) study protocol. *BMC Med Genet*. 2005 Apr 26;6:17.
143. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011 Aug 1;27(15):2156–8.
144. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research*. 2015 Jan 28;43(D1):D662–9.
145. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics*. 2010 Aug 15;26(16):2069–70.

VI. ANNEXES

A. REPONSES AUX APPELS D'OFFRES ET FINANCEMENTS OBTENUS

PHRC interrégional 2013

CHU LRSY-Nantes 2013

Année Recherche 2013

Groupe mutualité pasteur 2013

Paris Scientifique Région 2013

PHRC interrégional 2014

Année Recherche 2014

Fondation Génavie 2014, 15 000 obtenus pour le développement d'un modèle murin transgénique GAIA1 dans la cadre de la physiopathologie anévrismale

Paris Scientifique Région 2014

CHU cohorte 2015

Année Recherche 2015 financée par le CHU de Nantes et 20 000 euros obtenus Master 2.

ANR PRTS 2015, 400 000 euros obtenus pour le projet ICAN (partie DGOS)..

Biocollection CHU de Nantes 2016, 150 000 euros obtenus pour la biocollection ICAN

B. COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHÉES

GAIA 1 is involved in the aneurysmal formation in familial form of intracranial aneurysms.

R.Bourcier, R.Redon, S.Chatel, H.Desal. European Stroke Congress - Berlin - May 2017

Le projet ICAN : Comprendre la physiopathologie des anévrismes intracrâniens.

Bourcier R, Chatel S, Bourcereau E, Jouan S, Le Marec H, Daumas-Duport B, Sevin-Allouet M, Guillon B, Roualdes V, Riem T, Isidor B, Lebranchu P, Connault J, Le Tourneau T, Gaignard A, Loirand G, Redon R, Desal H and the ICAN Investigators. Société Française de Neuroradiologie 24^{ème} congrès - Paris - Avril 2016

Is there an inherited anatomical conformation favoring aneurysmal formation of the anterior communicating artery?

Bourcier R, Lenoble C, Guyomarch-Delasalle B, Daumas-Duport B, Papagiannaki C, Redon R, Desal H. European Society of NeuroRadiologie 18th congress – Belgrade - September 2016

Génétique des formes familiales d'anévrismes intracrâniens.

R.Bourcier, R.Redon, H.Desal. Société Française de Neuroradiologie - 23^{ème} congrès – Paris - Avril 2015.

Genetics of familial form of intracranial aneurysms.

R.Bourcier, R.Redon, S.Chatel, MP.Garnier-Viarouge, B.Isidor, B.Daumas-Duport, A.Lintia-Gaultier, E.Auffray-Calvier, F.Toulgoat, H.Desal. American society of Neuroradiology XXV congress - Montréal - April 2014

C. MATERIELS ET METHODES

1. GAIA HISTORIQUE ET LANCEMENT

Notre projet de recherche a débuté en 2013. Il était alors centré sur les formes familiales d'AIC et a été imaginé par les Pr. Hubert Desal et Pr. Hervé Le Marec, alors Directeur de l'Institut du Thorax et de l'Unité Inserm 1087. Hubert Desal avait bénéficié d'un premier financement afin de lancer le projet. Il avait été baptisé « Génétique des formes familiales d'Aic » (GAIA).

L'étape initiale de ce projet visait au recrutement de familles présentant des porteurs d'AIC (>4 atteints). Nous avons donc initié ce recrutement des cas familiaux colligés depuis des années par le Pr. de Kersaint-Gilly puis par le Pr. Desal dans le service de Neuroradiologie Diagnostique et Interventionnelle. Pour cette étape passionnante mais très chronophage qui nécessite un contact direct ou téléphonique avec les patients et les familles des patients, j'ai rapidement été aidé par une assistante de recherche clinique, puis par une infirmière de recherche clinique. Nous avons identifié les patients atteints d'anévrismes intracrâniens avec antécédents familiaux d'AIC, puis nous avons réalisé une enquête exhaustive afin d'apprécier le caractère informatif de la famille (nombre significatif d'individus atteints sur plusieurs générations).

Les propositus des familles sélectionnées ont bénéficié d'une consultation de génétique médicale afin d'écartier une forme syndromique d'AIC. Un prélèvement sanguin a ensuite été transmis au laboratoire de génétique moléculaire de l'UMR 1087 afin d'y réaliser l'extraction d'ADN et les analyses moléculaires.

Au préalable, et avec l'aide de la DRCI, l'ensemble des formalités réglementaires eu égard à une recherche non interventionnelle (mais ayant attrait à la génétique) ont dû être remplies. Le protocole a été soumis à l'avis du CCTIRS, et le traitement informatisé a reçu l'autorisation de la CNIL.

En me plaçant à l'origine du processus de mise en place d'un projet de recherche translationnelle, j'ai pu participer à toutes les étapes qui mènent du patient (sa rencontre en consultation, le recueil de son consentement), du phénotypage clinique et l'imagerie, vers le travail de génétique moléculaire pure (PCR, séquençage de l'exome) en passant par l'ensemble des formalités nécessaires au financement et au respect des conditions légales de la recherche en génétique (avis éthique, déclaration CNIL, validation CCTIRS).

2. ASPECT TECHNIQUES DU SEQUENÇAGE D'EXOMES

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. Les prélèvements, sanguins ou salivaires, ont été réalisés chez les patients ayant signé un consentement éclairé et validé par un comité d'éthique. 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.

a) Séquençage d'exome complet

Pour la capture des parties codantes du génome, nous avons utilisé le kit Sure Select 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 Tape Station 2200 Agilent. Les fragments obtenus doivent alors avoir une taille entre 225 et 275 pb (Figure 18).

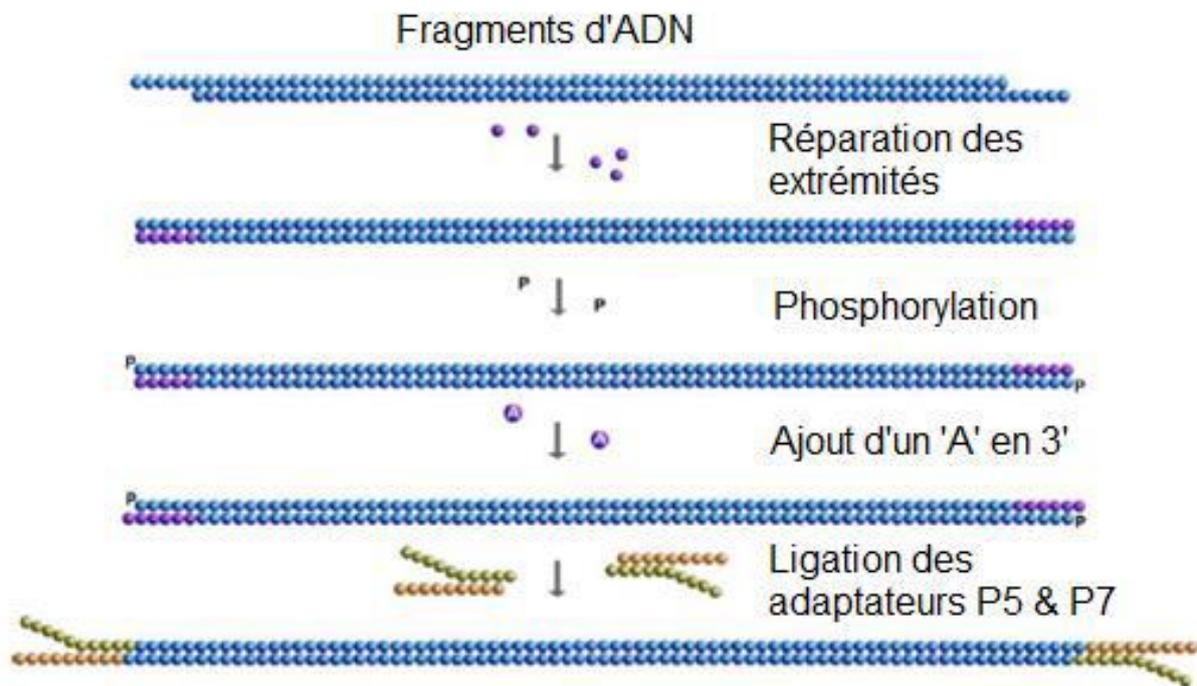


Figure 18 : Schéma de la préparation de la librairie pour un séquençage d'exome

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 ng/ μL . 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 (Sure Select 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.

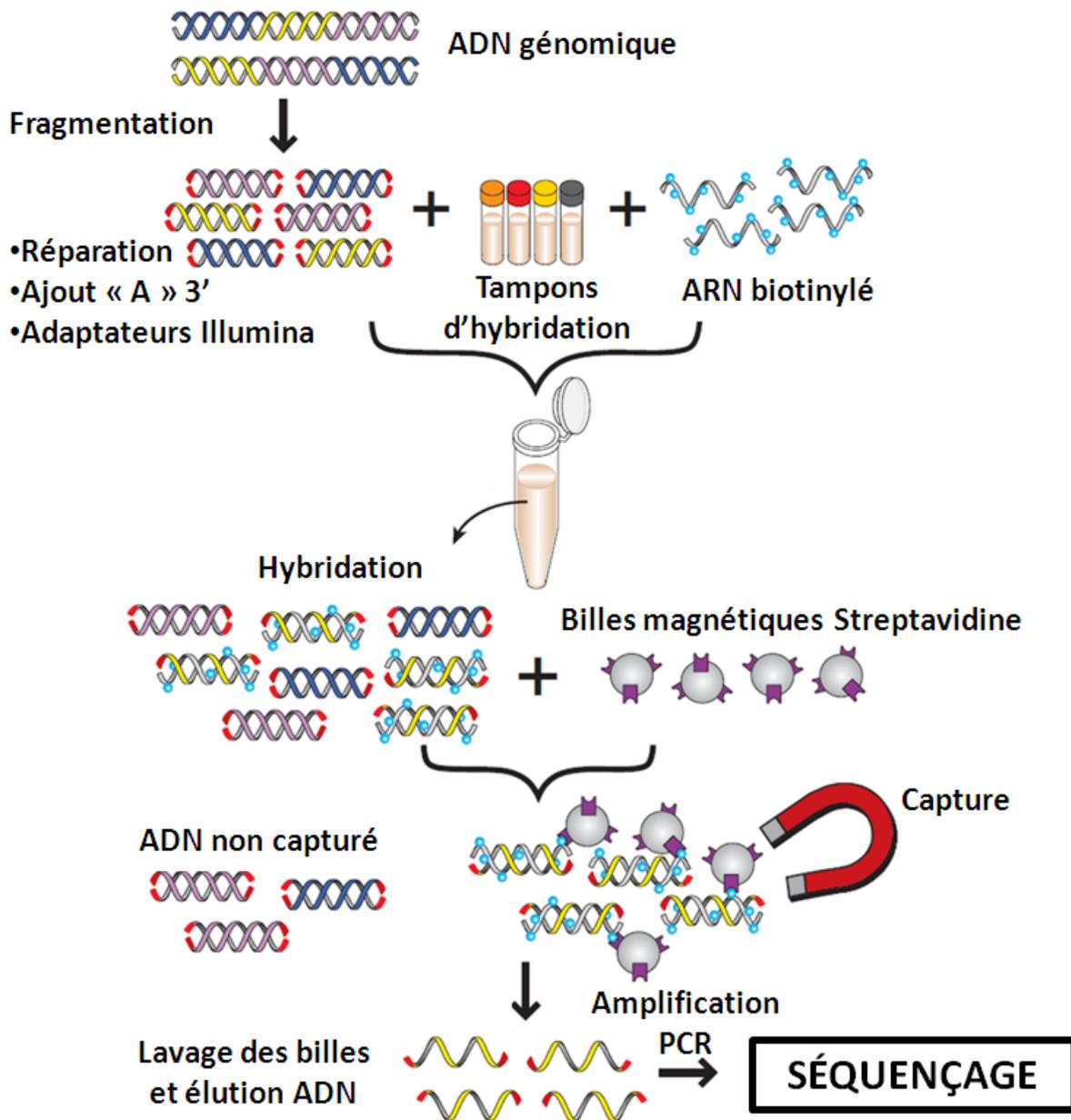


Figure 19: Représentation du principe de capture des régions codantes avant séquençage haut-débit.

Les sondes d'ARN biotinylées permettent de capturer les fragments qui contiennent des séquences d'intérêt, ici les séquences codantes du génome. L'utilisation de billes magnétiques couplées à de 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>)

b) Séquençage haut débit

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 20B). Les bibliothèques produites sont injectées dans une « flow-cell », lame de verre sur laquelle va se dérouler le séquençage (Figure 20.A).



Figure 20 : 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/volume5/issue06/features/>

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 mm^2 au sein de la « flow cell ». Génération des « clusters » L'injection des bibliothèques dans la « flow-cell » est réalisée en suivant un flux régulé 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 21 A. B.)

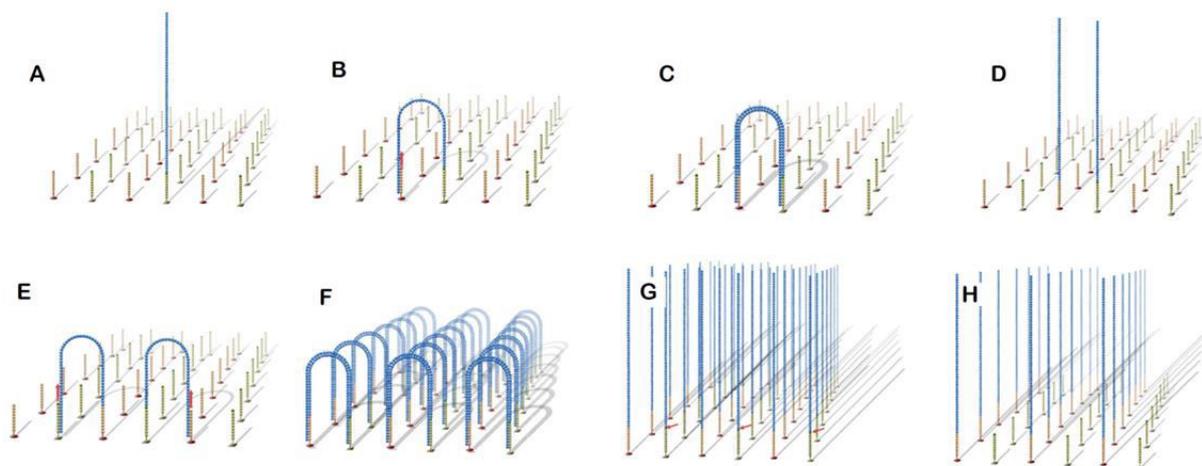


Figure 21 : Génération des clusters lors du séquençage Illumina

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 21B). 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 22). 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.

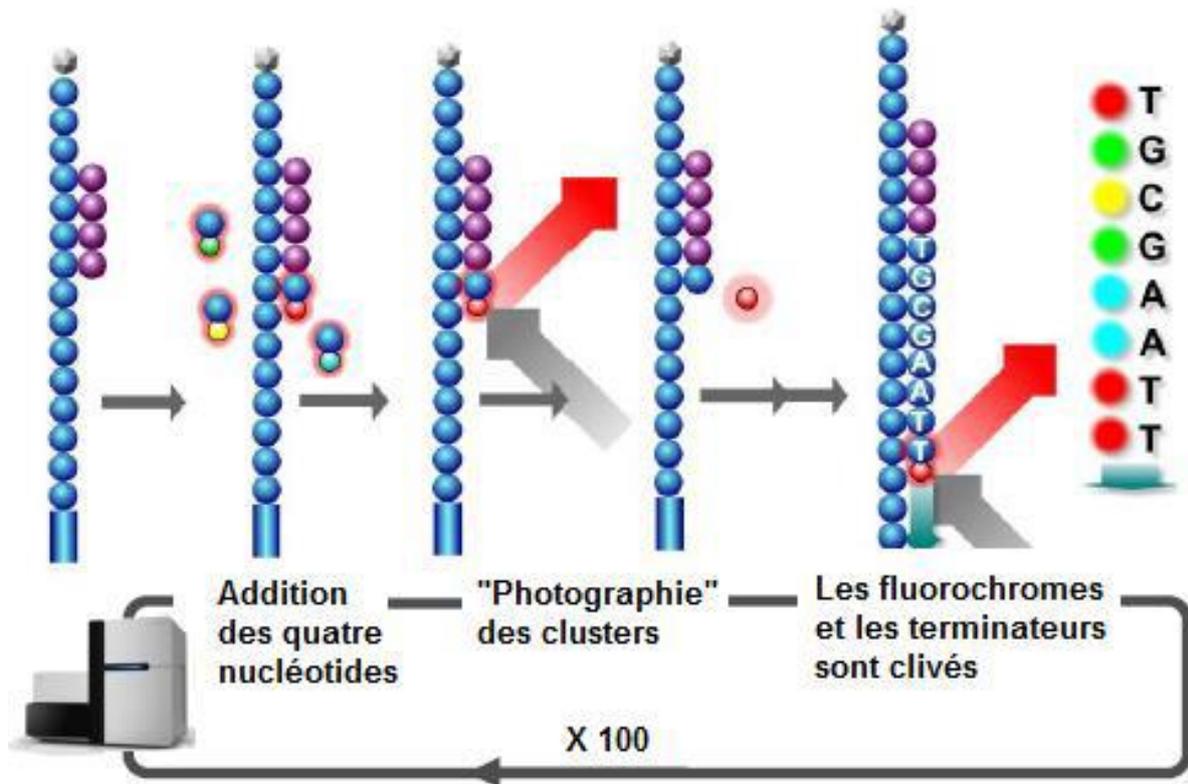


Figure 22 : Réaction de séquençage de la technologie Illumina.

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 23). 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'.

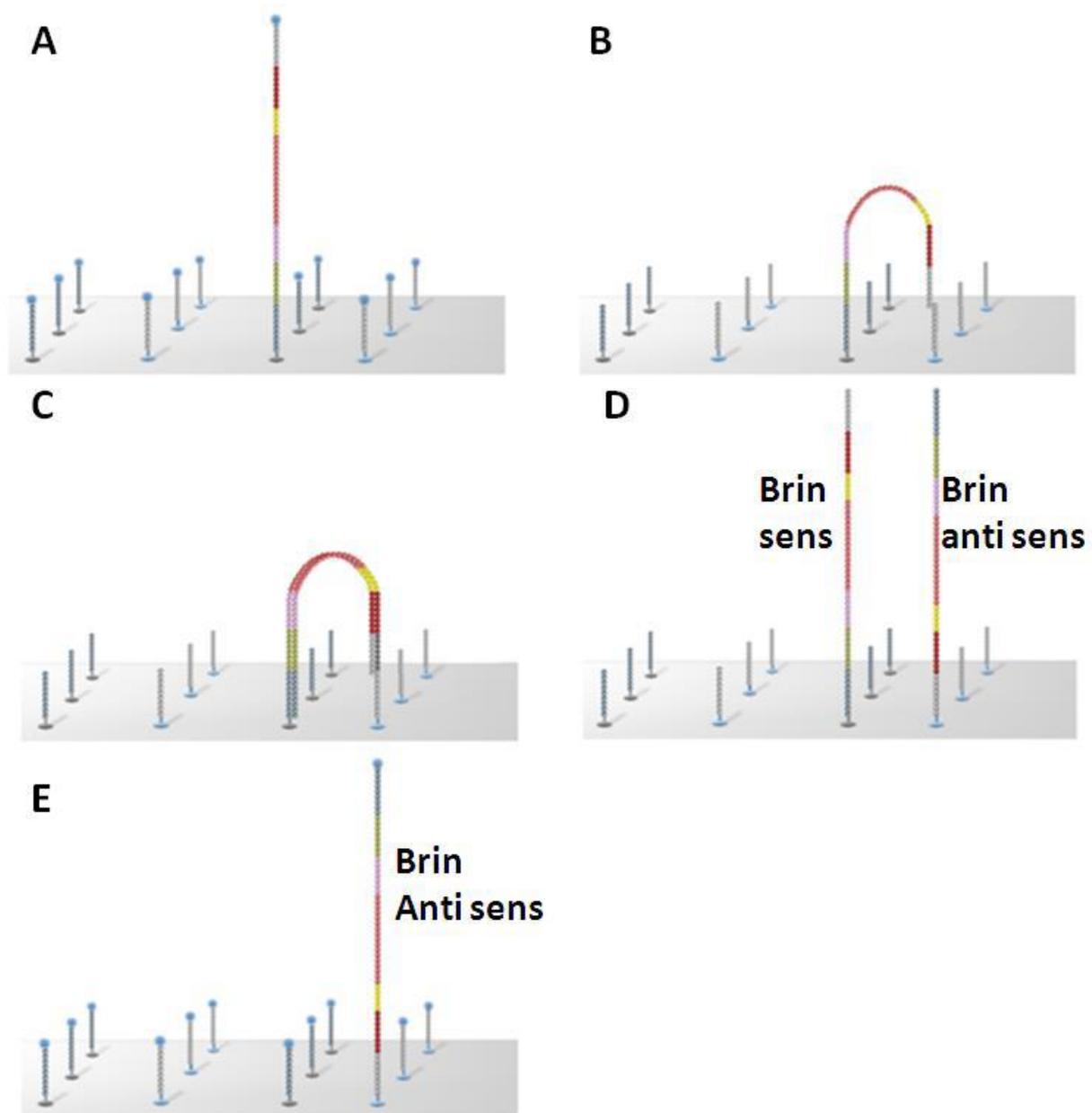


Figure 23 : Étape de « flip-flap » qui permet le séquençage des brins anti-sens par la technologie Illumina. Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

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 séquencés 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 ».

c) Alignement et annotation des variations

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 génome 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. La détection des variations a été réalisée grâce un algorithme : GATK Hapcaller (version 2.8). Le calling permet la genèse de fichiers VCF (« Variation génétique Call Format ») (143). 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 séquencé et pour chaque algorithme. Chaque ligne correspond à une variation génétique et chaque variation génétique est annotée avec de nombreuses informations relatives à ce variation génétique. On retrouve, la position génomique du variation génétique, son identifiant « rs » (si ce variation génétique 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 variation génétique, l'état du variation génétique (hétéro- ou homozygote) et une grande quantité d'informations relatives à celui-ci (score de conservation, fréquence allélique etc.) regroupées dans une même colonne. Les variations sont ensuite annotées en utilisant l'algorithme VEP (« Variation génétique Effect Predictor »). Cette annotation, basée sur la base de données Ensembl(144), permet de connaître l'effet prédit du variation génétique 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 variations recherchés. Les bases de données utilisées sont surtout ExAC et GnomAD.

d) Filtrage des variations

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 (117). Cet outil permet de contourner la difficulté du code informatique pour analyser ces fichiers contenant de nombreuses informations ne pouvant être gérées par des tableurs classiques. L'enchaînement de commandes est appelé «work flow».

Dans un premier temps, les fichiers 'variation génétique calling format' (VCF) générés par GATK Hapcaller sont traités et introduits dans le work flow. L'étape suivante consiste à conserver les variations ayant un effet fonctionnel potentiel sur la fonction de la protéine sur les bases des transcrits ENSEMBL et des annotations VEP (Variation génétique Effect Predictor) (145). Nous gardons ainsi les variations ayant des annotations non-synonymes et/ou impliquées dans les sites d'épissage des catégories suivantes (<http://www.sequenceontology.org/>) : (splice_donor_variation génétique (SO:0001575), splice_acceptor_variation génétique (SO:0001574), stop_gained (SO:0001587), frameshift_variation génétique (SO:0001589), stop_lost (SO:0001578), initiator_codon_variation génétique (SO:0001582), inframe_insertion (SO:0001821),

inframe_deletion (SO:0001822), missense_variation génétique (SO:0001583), transcript_amplification (SO:0001889), splice_region_variation génétique (SO:0001630), transcript_ablation (SO:0001893), incomplete_terminal_codon_variation génétique (SO:0001626), coding_sequence_variation génétique (SO:0001580).

Les variations sont considérées rares de manière empirique si la MAF est inférieure à 1%. Ainsi, nous utilisons successivement les bases de données externes puis des bases de données «internes». Nous utilisons la base de données de ExAC du Broad Institute (<http://exac.broadinstitute.org>) qui 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 avons choisi un seuil de 0,1% dans la sous population européenne non finlandaise (33 300 individus).

Nous utilisons ensuite une base données interne. Le but est de filtrer nos variations 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 GenomicRegulation) et 160 exomes de patients séquencés sur la plateforme génomique de Nantes (<http://www.pf-genomique.univ-nantes.fr/>). Le seuil de fréquence choisi pour ces deux bases est de 10% car elles contiennent des individus apparentés ainsi que des individus atteints de pathologies cardiaques diverses.

Dans le cas d'analyses familiales, nous focalisons notre analyse sur les variations partagés par les individus atteints séquencés. 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.

Suite aux analyses des données NGS les variations d'intérêts identifiés ont été vérifié par alignements des reads grâce à l'outil IGV « Integrative Genome Viewer » (119). 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 de la variation génétique.

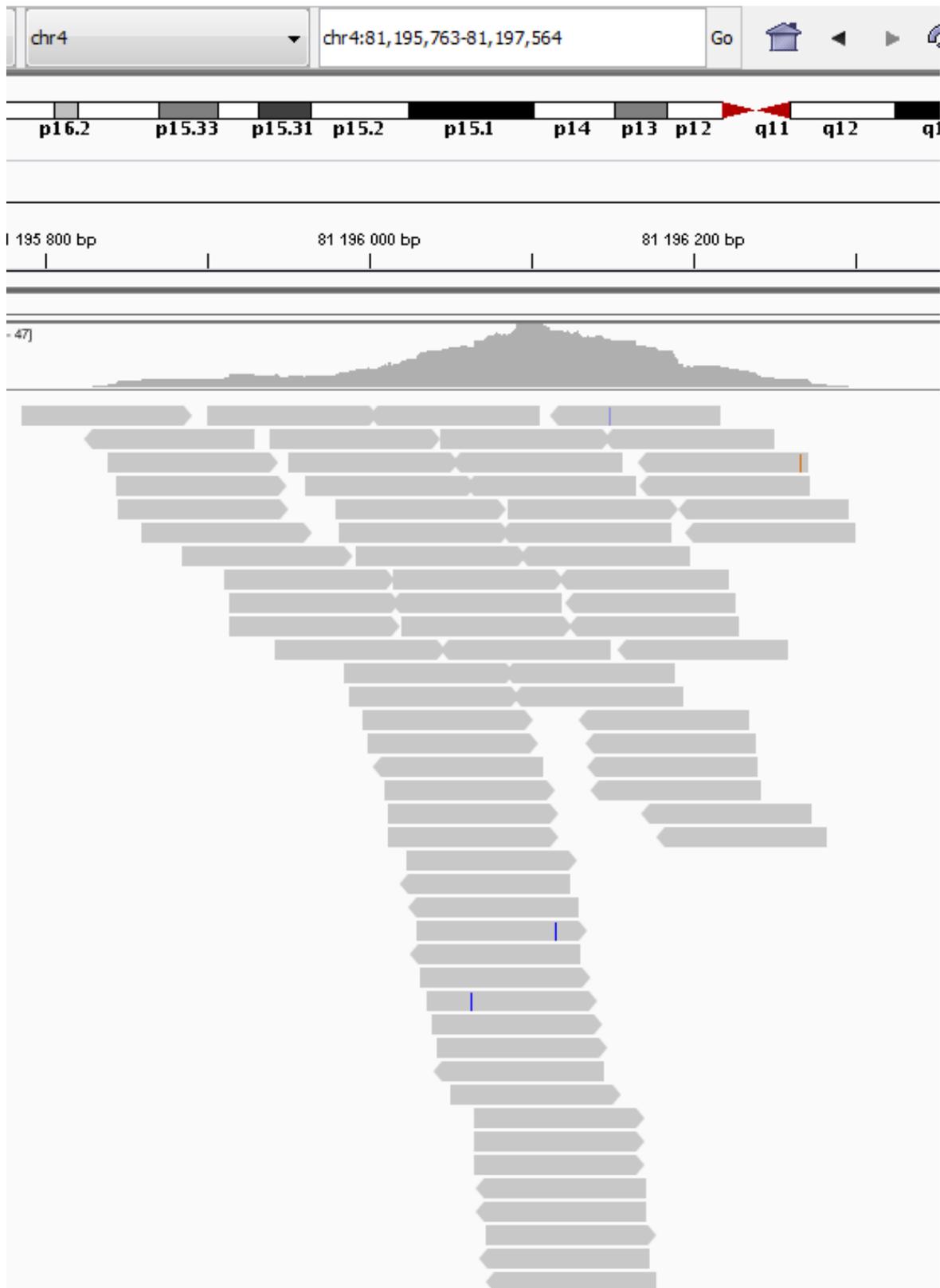


Figure 24 : Exemple de visualisation de l'alignement des reads de séquençage haut-débit grâce à l'outil IGV.

3. SEQUENÇAGE CAPILLAIRE

La validation des variations 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 BigDyeTerminator 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 (AppliedBiosystems) par une inspection visuelle.

4. GENOTYPAGE HAUT DEBIT

Le génotypage haut débit a été effectué sur les puces AxiomGenome-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 AxiomGenome-Wide CEU 1 permettent le génotypage de 567 097 variations 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 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 ($P < 10^{-5}$).

5. ETUDES D' 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 évènement de recombinaison. Ces analyses ont été réalisées avec l'algorithme « Identity By Descent Linkage Disequilibrium » 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 (118). 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 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 SNP, 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 SNP. 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).

6. APPROCHE EPIDEMIO-GEOGRAPHIQUE

Nous avons aussi mis en place une démarche visant à améliorer l'efficacité de notre recrutement de familles. Elle se fonde sur l'expérience des cardiologues qui ont utilisé un principe similaire afin de recruter des familles atteintes de troubles de la conduction cardiaque (131). Cette approche est basée sur l'hypothèse selon laquelle, dans une zone où la population est géographiquement stable, les descendants d'un ancêtre atteint d'une mutation restent dans cette zone sur plusieurs générations.

Deux fichiers regroupant des informations relatives aux dix dernières années sont considérés. Tout d'abord, celui des Départements d'Information Médicale (DIM) des CHU de Nantes, la Roche-sur-Yon, Cholet, Saint-Nazaire et Ancenis. A partir de ce dernier, nous déterminons le lieu de naissance des patients ayant été hospitalisé dans ces centres pour une pathologie en lien avec un AIC (ex : codes I60.3). Ensuite, nous utilisons le fichier du Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CEPIDC) qui recense au plan national les causes de mortalité et indique les lieux de domicile des personnes.

Afin de vérifier la robustesse des résultats obtenus pour chaque fichier, un test exact de Fisher réalisé autour des zones concernées par les clusters. Pour cela nous considérons chaque cluster individuellement et comparons la proportion des cas observés dans le cluster et la proportion des cas observés dans les zones géographiques limitrophes du cluster.

7. ICAN EN PRATIQUE

Une réunion de lancement du projet s'est déroulée le 30 mars 2016 lors de la réunion de la société française de Neuroradiologie. Nous avons proposé aux centres quatre niveaux de participation afin d'inclure l'ensemble des patients porteurs d'AIC typiques de bifurcations, rompus ou non, traités ou non:

Niveau 1.0 : Recrutement d'un patient porteur d'un AIC par famille pour analyse génétique

Niveau 1.A : Recrutement de tout porteur d'AIC pour analyse génétique

Niveau 1.B : Recrutement de tout porteur d'AIC pour analyse génétique et dosage des protéines circulantes

Niveau2 : Dépistage des apparentés au 1er degré des formes familiales d'AIC.

Le Niveau 1.0 diffère du niveau1.A par la fréquence des inclusions possible. En effet, les formes familiales représentent globalement 10% des cas. Le niveau 1.B (biocollection) nécessite un support paramédical (IRC ou TEC) et un équipement nécessaire à centrifugation, puis à la congélation du sérum. Enfin le niveau 2 nécessite une organisation de secrétariat pour offrir des plages IRM de dépistage. Un circuit de données et d'échantillons complexe mais très efficace a été mis en place afin d'assurer la sécurité, la traçabilité mais aussi l'anonymisation des patients et de leur prélèvements.

Le volet imagerie est venu enrichir cette bio-collection. En effet, les échanges dans le cadre du projet SyMeTRIC ont fait émerger l'absolue nécessité de compléter notre base de données (cliniques, génétiques, biologiques) avec la collection des images des AIC inclus. Le projet de gestion et de stockage des images a été discuté avec nos collaborateurs du CHU de Rennes qui ont mis à notre disposition leur serveur d'imagerie (SHANOIR). La centralisation, la gestion et la coordination des données d'imageries en

lien avec Rennes est assurée par une ARC du Centre d'Investigation Clinique de radiologie nantais (Solène Jouan).

L'ARC/TEC a en charge la vérification des consentements, la prise de sang, le transfert des données cliniques vers l'e-CRF, le téléchargement des images, le techniquage des tubes prélevés et l'expédition des consentements et de ces tubes à Nantes.

Nous avons proposé deux modalités d'inclusions, la première en consultation qui semblait un moment opportun pour informer le patient et remplir le CRF. Ce CRF peut en effet servir de trame à une première consultation ou de suivi d'un patient. Nous proposons donc aux secrétariats une lettre d'information type sur le projet ICAN à joindre à la convocation informant le patient que, s'il le souhaite et pour une participation optimale, il doit se rendre à jeun à cette consultation. D'autre part les inclusions sont possibles lors d'artériographies cérébrales, mais les prélèvements doivent être rapidement pris en charge par l'ARC/TEC qui est prévenu au préalable. Dans ce cas le recueil du consentement et CRF papier se fait « au lit du malade ».

Une fois la convention signée avec la direction de la recherche des centres associés. Nous sommes convenus d'une mise en place pour chacun des centres. Nous avons choisi de les réaliser à distance par conférence téléphonique. Notre discours s'articule de manière systématique autour de :

- 1- Une introduction générale et un rappel rapide au sujet du projet ICAN
- 2- L'explication du rôle du médecin en détaillant les points clefs du CRF
L'explication du rôle de l'ARC/TEC notamment pour les prélèvements biologiques
- 3- L'explication des modalités de transferts d'images

Au total cette réunion d'une heure environ a été tenue 27 fois et trois nouvelles mises en place sont prévues prochainement. Suite aux mises en place et afin de dynamiser la participation des centres, nous avons aussi un important rôle de communication et d'animation du projet. Ainsi, l'équipe ICAN a diffusé à ce jour 4 newsletters qui rendent compte du recrutement, passent des informations pratiques et donnent un caractère

conviviale et chaleureux au projet (utilisation bulles de bandes dessinées, photos, témoignage des participants). (cf. annexe). De même des affiches destinées aux patients dans les salles d'attente des centres associés ont été proposées (cf. annexes).

La négociation financière avec les centres associés à parfois été difficile. En effet, il s'agit bien d'un projet de recherche académique et relativement fondamental. Nous sommes ainsi bien loin des niveaux de rétribution proposés par les industriels. Notre argumentaire s'est appuyé sur l'intérêt scientifique du projet et nous avons à cœur de faire d'ICAN, un projet ouvert. Déjà deux études ancillaires, s'appuyant sur ICAN et bénéficiant du support légal et administratif établi vont démarrer. La première sur les cas pédiatriques d'AIC menée par les équipes de Necker et de Saint Anne. La seconde menée par le Kremlin Bicêtre traitera des dispositifs de diversion de flux et de leurs conséquences biologiques.

Les conventions signées avec les centres associés stipulent clairement que :

« Les praticiens des centres investigateurs qui seront à l'origine des idées conduisant à la publication pourront figurer dans les places de choix c'est-à-dire en premier ou dernier auteur de l'article en question. »

« Avec l'accord des investigateurs nantais, les données cliniques biologiques génétiques et d'imagerie de l'étude seront disponibles pour chacun des centres investigateurs ayant inclus des patients afin de produire des publications scientifiques ».

Nous nous sommes efforcés de proposer aux centres une organisation pratique et efficace en nous plaçant dans notre rôle de médecin afin de proposer une organisation fluide de l'inclusion. Notre souci permanent a été de limiter au maximum le rôle du médecin aux tâches qui requiert son expertise, c'est-à-dire la vérification des critères d'inclusion et le remplissage des données médicales d'un Case Report Form (CRF) optimisé. La faisabilité de notre projet a été un souci permanent et notre réflexion s'est appuyée sur notre expérience quotidienne de clinicien. La balance entre exhaustivité des données recueillies et contraintes pour les médecins recruteurs a parfois été difficile à équilibrer. C'est sans doute une des clefs du succès de notre bio-collection.

Devant le succès du recrutement, un financement complémentaire à l'Agence Nationale de la Recherche (ANR PRTS) était requis afin de pouvoir atteindre les objectifs fixés de recrutement (1500 patients/an). Nous avons ainsi obtenu un financement interne au CHU de Nantes destiné aux bio-collections en 2016. Nous rédigeons actuellement un accord de un consortium visant à clarifier les modalités de publications, de propriété intellectuelle et qui bénéficiera de la mise en place d'un conseil scientifique ICAN.

D. NEWSLETTER ICAN



Newsletter n° 4
mai 2017

ICAN

Comprendre la physiopathologie anévrismale

Chers co-investigateurs, chers ARCs,

Juste avant l'été, voici les dernières actualités du réseau ICAN : des infos nombreuses, des solutions pratiques, des modifications importantes, quelques points de vigilance et une arrivée dans notre équipe nantaise ! Voilà le sommaire de cette 4^e newsletter pour laquelle nous partageons le témoignage de l'équipe ICAN de Rouen.

Bonne lecture et à très bientôt,
L'équipe projet ICAN

*Veillez à bien inclure, si possible, **l'ensemble des patients atteints au sein d'une même famille** : si vous êtes face à un patient avec ATCD familial, il est important de l'inclure, mais il est tout aussi important, afin de rechercher le gène dans cette famille, d'inclure les autres patients atteints dans cette famille (voire de proposer un dépistage aux apparentés majeurs sains au premier degré, inclusions 1b uniquement dans ce cas).*



**INFO
PRELEVEMENTS**
par Emmanuelle



**INFOS
INCLUSIONS**
par Romain

*Deux modifications au protocole ICAN, ont été ajoutées. Elles traduisent notre souhait qu'ICAN serve de « vaisseau amiral » à des études spécifiques dont **vous** serez les investigateurs principaux. Les formulaires d'information ont été adaptés et vous les recevrez rapidement.*

- Les enfants porteurs d'AIC sont maintenant incluables dans ICAN. Ainsi Olivier Naggara de Sainte Anne et Necker, auquel s'associe Laurent Spelle du Kremlin Bicêtre, va lancer un travail sur les cas pédiatriques dont l'informativité génétique est évidemment grande.
- « BioFlow », étude menée par Jildaz Caroff et le Kremlin Bicêtre et s'intéressant aux effets biologiques des flow diverters va bientôt démarrer. Pour plus d'informations, vous pouvez le contacter mais pour le moment cette étude ne concerne que quelques centres.

Nous avons apporté 5 modifications simples au CRF que nous vous détaillons dans une notice jointe aux nouveaux documents.

*Ces modifications ont fait l'objet de courriers d'information auprès du CCTIRS et de la CNIL : nous vous demandons de bien vouloir en prendre note et d'utiliser **DES MAINTENANT** ce nouveau CRF ICAN. Ces nouveaux items sont effectifs sur l'eCRF.*



*Je m'appelle Aurélie Thollet, nouvelle arrivée dans l'équipe projet ICAN à Nantes.
Je prends le relais de Stéphanie Chatel en tant que chef de projet ICAN, je pourrai répondre à vos questions organisationnelles et générales.
A bientôt !*



**INFO
PROJET
par Aurélie**



**INFO
IMAGERIE
par Solène**

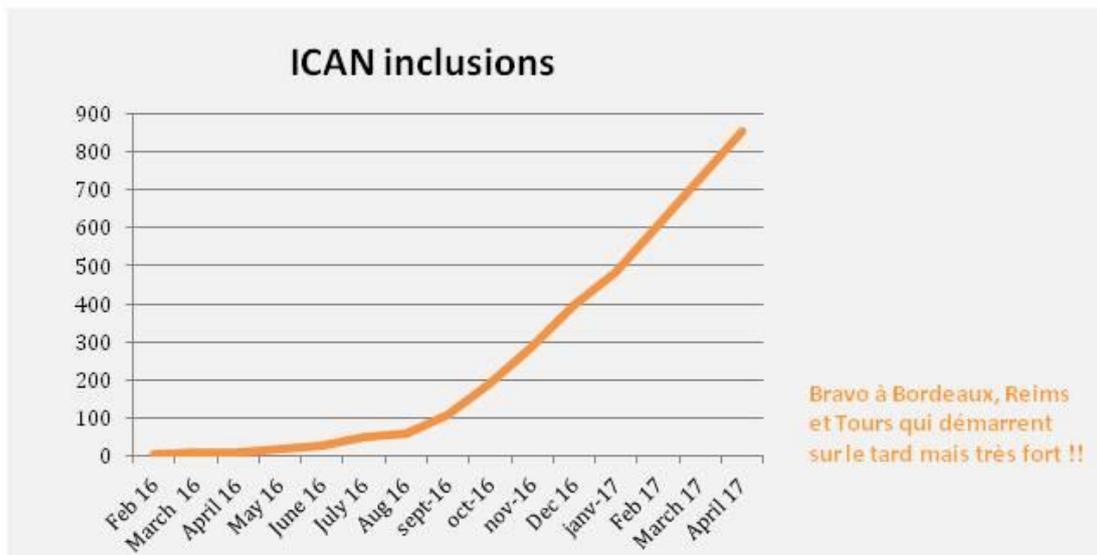
*Merci car la qualité des images transférées s'améliore depuis l'envoi de notre tutoriel.
Bravo à Rennes et Brest, c'est toujours très complet !*

Toutefois, 4 centres n'ont encore transféré aucune image (Dijon, Colmar, Montpellier et Clermont).

De manière générale, attention aux centres qui accumulent du retard sur les transferts par rapport au rythme des inclusions. Les inclusions ne seront complètes qu'après envoi des images.

N'hésitez pas à me contacter si vous avez des questions techniques sur la plateforme Shanoir.

Etat des lieux





Partage

La méthode ICAN de Rouen

1. une équipe restreinte facilitant la coordination
2. des parcours clairement identifiés
3. des procédures simples, connues de tous
4. des intervenants motivés !

L'équipe ICAN de Rouen



Dès la première inclusion, en septembre 2016, une équipe « ICAN » faisant intervenir des membres de différentes unités a été constituée afin de faciliter les inclusions et d'optimiser la qualité des données recueillies :

- une Neuro-Radiologue Interventionnelle, aidée par les manipulateurs du service d'Imagerie Neuro-vasculaire,
- 2 techniciennes de laboratoire de notre Centre d'Investigation Clinique,
- 2 Techniciens d'Etude Clinique du Pôle Imagerie.

Ces intervenants gèrent les différentes étapes du protocole :

- Les screenings et les inclusions sont exclusivement réalisés par la NRI qui rencontre l'ensemble des volontaires. Elle se charge de renseigner les documents sources et réalise les prélèvements artériels pendant les artériographies.
- Les patients vus en consultation sont prélevés par les TEC, qui préparent également l'ensemble des prélèvements, envoient les tubes EDTA à Nantes et transmettent les tubes secs au CIC.
- Les techniciennes du CIC se chargent du techniquage, du stockage à -20°C et de l'envoi groupé dans la carbo-glace. Le contrôle des documents sources, la saisie des données et la numérisation des documents dans Integralis, ainsi que l'upload des examens d'imagerie sur Shanoir sont réalisés par les TEC. Et si besoin, ils répondent aux queries d'Emmanuelle Bourcereau;-)

Les affiches ICAN en salle d'attente suscitent la curiosité de futurs volontaires qui, pour certains, se proposent spontanément. La majorité des patients sont très enthousiastes et donnent facilement leur accord, satisfaits de faire avancer la recherche dans ce domaine.

Prochaine newsletter ICAN : septembre 2017

Vos contacts projet

N'hésitez pas à nous contacter si vous avez une question ...

... d'ordre général

... sur le recrutement

... sur l'imagerie

... financière ou réglementaire



**Hubert
DESAL**
hubert.desal@chu-nantes.fr
02 40 16 56 30



**Romain
BOURCIER**
romain.bourcier@chu-nantes.fr
02 40 16 56 08



**Aurélie
THOLLET**
aurelie.thollet@chu-nantes.fr
02 40 16 52 79



**Emmanuelle
BOURCEREAU**
emmanuelle.bourcereau@chu-nantes.fr
02 40 16 59 80



**Solène
JOUAN**
solene.jouan@chu-nantes.fr
02 44 76 85 39



**Léa
FERRAND**
lea.ferrand@chu-nantes.fr
02 53 48 28 10



E. AFFICHE GAIA



Si vous êtes porteur d'un anévrisme intracrânien ET qu'un membre de votre famille a été victime d'une hémorragie cérébrale, d'une rupture d'anévrisme ou d'un décès brutal inexplicé : parlez-en au neuro-radiologue qui vous reçoit.

Il vous proposera de participer au **projet de recherche GAIA** dont l'objectif est **d'identifier les gènes responsables des formes familiales d'anévrismes intracrâniens**.

Cette recherche consiste en **une simple prise de sang** et **un dépistage par IRM des membres de votre famille**. Elle est menée par le service de neuro-radiologie diagnostique et interventionnelle du Pr Hubert Desal du CHU de Nantes et le laboratoire de recherche de *l'institut du thorax*, en collaboration avec les centres hospitaliers d'Angers, Bordeaux, Créteil, La Roche sur Yon, Poitiers, Rennes et Tours.



VACARME
VAlués des Maladies CArdiovasculaires,
Respiratoires et Métaboliques



Inserm



UNIVERSITÉ DE NANTES



© 2014-2015, 01/14/15

Thèse de Doctorat

Romain BOURCIER

Génétique et physiopathologie des formes familiales d'anévrismes intracrâniens

Résumé

Les anévrismes intracrâniens (AIC) se définissent par une hernie acquise de la paroi artérielle survenant préférentiellement à une bifurcation artérielle avec une prédilection topographique caractéristique au niveau des vaisseaux de la base du crâne. Peu d'études cliniques et/ou moléculaires ont abordé la place de la susceptibilité génétique dans des formes familiales d'AIC. Nous avons ici initié le recrutement de grandes familles atteintes d'AIC afin d'identifier les anomalies génétiques prédisposant aux anévrismes intracrâniens par une approche de séquençage d'exomes. Ce projet, nommé GAIA, a permis de recruter 4 familles présentant une forte agrégation de cas d'AIC. Au sein d'une famille, nous avons mis en évidence une variation génétique rare et délétère - partagée par les 5 membres atteints d'AIC - dans un gène codant pour une protéine circulante en lien avec l'angiogénèse. Cinq autres variations rares dans ce gène ont été mises en évidence dans une population de cas familiaux d'AIC, ce qui constitue un enrichissement significatif comparé aux bases de données en population générale. Le dosage de la protéine circulante montre des niveaux abaissés chez les patients de ces familles porteurs de ces variations comparés à leurs apparentés non porteurs. Nous poursuivons nos investigations génétiques sur les 3 autres grandes familles, ainsi que sur une centaine de noyaux familiaux d'AIC. En parallèle, afin d'identifier des voies de signalisation biologiques d'intérêt dans les formes familiales mais aussi sporadiques d'AIC, nous coordonnons dans le cadre du projet ICAN une bio-collection incluant déjà 1100 cas index, associée à une banque de données cliniques et d'imagerie.

Mots clés

GENETIQUE -----ANEVRISME---INTRACRANIEN----
FAMILIALE---PHYSIOPATHOLOGIE-----

Abstract

Intracranial Aneurysms (IA) are defined by an acquired hernia of the arterial wall arising on arterial bifurcations. There is a characteristic topographical predilection for the vessels of the skull base. Few studies have addressed the role of genetic factors in the familial forms of IA. We have conducted an original study thanks to biocollection built to identify one or more genetic variations causally related to IA formation. Our study used a high-throughput exome sequencing approach.

The GAIA project has enabled the recruitment of 4 families with a high burden of IA cases. In the 39458 family, a rare and deleterious genetic variation was shared by all IA carriers in a gene encoding for a circulating protein related to angiogenesis (ANGPTL6). In this gene, five other rare and deleterious variations have been found in a population of familial IA cases, which constitute a significant enrichment compared to general population databases. Furthermore, blood level of Angpt16 circulating protein is lowered in patients with these variations compared to their relatives with the wild-type allele.

We are currently analyzing the other 3 major families, as well as about 100 small cores of IA family. Furthermore, in order to identify biological signaling pathways of interest in the familial but also sporadic forms of IA, we have launched a nationwide bio-collection which has already included 1100 index cases.

Key Words

GENETICS -----ANEURYSM---INTRACRANIAL----
FAMILIAL---PATHOPHYSIOLOGY-----