



Identification de variations génétiques associées à la bicuspidie valvulaire aortique chez les hommes et les femmes

Mémoire

Natasha Dargis

Maîtrise en médecine expérimentale
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Natasha Dargis, 2015

Résumé

Introduction. La bicuspidie valvulaire aortique (BVA) est la malformation congénitale cardiaque la plus fréquente. Les causes et les origines génétiques de la BVA sont actuellement inconnues.

Objectif. Ce projet de recherche vise à identifier des variations génétiques impliquées dans le développement de la BVA chez les Canadiens français.

Méthodes. Neuf gènes candidats pour la BVA ont été séquencés chez 48 patients atteints. Des variations génétiques sélectionnées ont été génotypées chez 323 patients atteints de BVA et 584 contrôles et les fréquences alléliques ont été comparées entre les deux groupes.

Résultats. Une variation dans le gène *EGFR* (rs17290301) démontre une association avec la BVA. Différentes variations sont associées à la BVA spécifiquement chez les hommes (*EGFR* rs533525993 et *TEX26* rs12857479) et les femmes (*NOTCH1* rs61751489, *TGFBR2* rs1155705 et *NKX2-5* rs2277923).

Conclusions. Ces résultats supportent pour la première fois l'implication de variations génétiques spécifiques au genre dans le développement de la BVA.

Abstract

Introduction. Bicuspid aortic valve (BAV) is the most frequent congenital heart disease. Its etiology and genetic origins are still largely unknown.

Objective. This study sought to identify genetic variants associated with BAV in a French Canadian population.

Methods. Nine candidate genes for BAV were sequenced in 48 BAV patients. A selection of genetic variants was genotyped in 323 BAV patients and 584 controls and their allelic frequencies were compared between the two groups.

Results. A *EGFR* variant (rs17290301) was associated with BAV in this population. Gender-specific variants were also significantly associated with BAV (*EGFR* rs533525993 and *TEX26* rs12857479 in men and *NOTCH1* rs61751489, *TGFBR2* rs1155705 and *NKX2-5* rs2277923 in women).

Conclusions. These results suggest for the first time a possible implication of gender-specific variants in the development of BAV.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations et des sigles	ix
Remerciements.....	xi
Avant-propos	xiii
Chapitre 1 Introduction	1
1.1 Survol de l'embryogenèse du cœur et de la valve aortique chez l'humain	1
1.2 Bicuspidie valvulaire aortique	4
1.2.1 Prévalence.....	5
1.2.2 Diagnostic	6
1.2.3 Sous-types morphologiques	6
1.2.4 Évolution clinique.....	8
1.2.4.1 Sténose aortique calcifiante	8
1.2.4.2 Insuffisance aortique	9
1.2.4.3 Endocardite infectieuse	10
1.2.4.4 Dilatation et anévrisme de l'aorte thoracique ascendante	11
1.2.4.5 Dissection aortique	12
1.2.5 Interventions médicales	14
1.2.5.1 Interventions de type pharmacologique.....	14
1.2.5.2 Interventions de type chirurgical	15
1.2.5.3 Interventions de type percutané	16
1.2.6 Étiologie	18
1.3 Génétique de la BVA.....	20
1.3.1 Brève introduction à la génétique	20
1.3.1.1 Structure et fonction du génome humain et degré de similitude intra- et inter-espèces.....	20
1.3.1.2 Variations génétiques	21
1.3.1.3 Détection de variations génétiques par séquençage d'ADN.....	22
1.3.1.3.1 Séquençage de type Sanger.....	23
1.3.1.3.2 Séquençage de type nouvelle génération	24
1.3.1.4 Caractérisation de variations génétiques par génotypage d'ADN	25
1.3.2 Arguments en faveur de l'existence d'une composante génétique dans le développement de la BVA.....	27
1.3.2.1 Études de jumeaux.....	27
1.3.2.2 Études de familles	27
1.3.3 Gènes candidats pour expliquer la composante génétique de la BVA	28
1.3.3.1 NOTCH1.....	28
1.3.3.2 AXIN1/PDIA2.....	29
1.3.3.3 EGFR.....	31
1.3.3.4 ENG.....	31
1.3.3.5 GATA5.....	32
1.3.3.6 NKX2-5.....	33
1.3.3.7 NOS3.....	34

1.3.3.8 TGFBR2	34
1.3.3.9 Autres gènes	36
1.3.4 Limitations des études précédentes en génétique de la BVA et obstacles à l'avancement des connaissances	36
Chapitre 2 Objectifs et hypothèses.....	37
Chapitre 3 Matériel et méthodes	38
3.1 Sujets à l'étude	38
3.1.1 Sujets atteints de BVA	38
3.1.2 Sujets contrôles	38
3.2 Extraction d'ADN à partir du sang	38
3.3 Détection de variations génétiques par séquençage d'ADN de type nouvelle génération	39
3.4 Estimation de l'impact des variations génétiques à l'aide d'outils bio-informatiques	39
3.4.1 Combined Annotation Dependant Depletion	39
3.4.2 Polymorphism Phenotyping v2	40
3.5 Validation des variations génétiques par séquençage d'ADN de type Sanger	40
3.6 Caractérisation de variations par génotypage d'ADN	40
Chapitre 4 <i>Identification of Gender-specific Genetic Variants in Patients with Bicuspid Aortic Valve</i>	41
Chapitre 5 Conclusions et perspectives	87
Bibliographie.....	94
Ressources électroniques	121

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 Principaux types de BVA	7
Tableau 1.2. Syndromes génétiques incluant une prévalence de BVA plus élevée que celle de la population générale	19

Chapitre 3

Tableau 3.1. Sommaire des contrôles de la qualité du génotypage relatifs aux variations génétiques .	41
Tableau 3.2. Sommaire des contrôles de la qualité du génotypage relatifs aux échantillons d'ADN.....	41

Chapitre 4

Table 4.1. Demographic and clinical characteristics of the bicuspid aortic valve and tricuspid aortic valve study populations.....	56
Table 4.2. Number of genetic variants identified by next-generation sequencing and validated by Sanger sequencing	57
Table 4.3. Identification of 9 novel genetic variants in 48 patients with bicuspid aortic valve	58
Table 4.4. Identification of 19 potentially pathogenic genetic variants in 48 patients with bicuspid aortic valve	59
Table 4.5. Genetic variants associated with bicuspid aortic valve in a case-control population	60
Supplementary Table 4.1 Primer sequences and corresponding amplicon size designed for validating 66 genetic variants detected by next-generation sequencing	61
Supplementary Table 4.2 Selection of 89 genetic variants genotyped in 339 BAV patients and 606 control patients	64
Supplementary Table 4.3 Allele-specific primer sequences and corresponding amplicon size designed for genotyping NOTCH1 g.139417590C>T (G152S)	71
Supplementary Table 4.4 Demographic and clinical characteristics of the bicuspid aortic valve and tricuspid aortic valve study populations stratified by gender	72
Supplementary Table 4.5 Identification and assessment of pathogenicity for 217 DNA variants detected by next-generation sequencing of 9 genes in 48 patients with BAV	73

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1. Schéma représentant les structures principales du coeur humain en coupe frontale	1
Figure 1.2. Vue supérieure de la valve aortique montrant ses trois feuillets (ou valvules)	2
Figure 1.3. Schéma représentant le coeur sans les oreillettes en vue supérieure	2
Figure 1.4. Schéma représentant le développement embryonnaire du coeur	3
Figure 1.5. Schéma représentant le début de la division du coeur en quatre cavités au 28e jour de gestation	4
Figure 1.6. Schéma représentant une valve aortique tricuspide et une valve aortique bicuspide	5
Figure 1.7. Schéma représentant les trois principaux types de BVA	7
Figure 1.8. Schéma représentant une valve aortique normale et une valve aortique avec sténose aortique calcifiante	8
Figure 1.9. Schéma représentant différents types de dilatation de l'aorte ascendante chez les patients atteints de BVA	11
Figure 1.10. Schéma représentant les classifications des dissections aortiques selon les systèmes de De Bakey et de Stanford	13
Figure 1.11. Différents types de prothèses valvulaires	15
Figure 1.12. Différents types de prothèses valvulaires percutanées	17
Figure 1.13. Schéma représentant les principales composantes de l'ADN	20
Figure 1.14. Différents types de variations génétiques ponctuelles	22
Figure 1.15. Section d'un chromatogramme d'un fragment d'ADN suite au séquençage de type Sanger	24
Figure 1.16. Schéma représentant l'hybridation des trois types d'amorces à l'ADN matrice du génotypage à l'aide de la technologie GoldenGate et de l'appareil BeadXpress	26

Chapitre 4

Supplementary Figure 4.1 Flowchart diagram illustrating the major steps of the study	85
Supplementary Figure 4.2 DNA variants detected by targeted next-generation sequencing of 9 genes in 48 patients with BAV	87

Liste des abréviations et des sigles

ADAM17	A disintegrin and metalloproteinase 17
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALK2	Activin receptor-like kinase-2
ARA	Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine
AXIN1	Axis inhibitor 1
BVA	Bicuspidie valvulaire aortique
CADD	Combined Annotation Dependant Depletion
CHUL	Centre Hospitalier de l'Université Laval
dbSNP	Single nucleotide polymorphisms database
EGFR	Epithelial growth factor receptor
ENG	Endoglin
EVS	Exome Variant Server
ExAC	Exome Aggregation Consortium
IECA	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IUCPQ	Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval
MATR3	Matrin 3
NKX2-5	NK2 transcription factor related, locus 5
NOS3	Nitric oxide synthase 3
PDIA2	Protein disulfide isomerase family A, member 2
PGM	Séquenceur Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies)

PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping v2
TAVI	Implantation de valve aortique par voie percutanée (de l'anglais <i>transcatheter aortic valve implantation</i>)
TBX20	T-box 20
TEX26	Testis expressed 26
TGF- β	Transforming growth factor beta
TGFBR2	Transforming growth factor beta type 2 receptor
UTR	Région de l'ADN non traduite (de l'anglais <i>untranslated region</i>)

Remerciements

Je voudrais en tout premier lieu remercier mon directeur de recherche, Yohan Bossé. Yohan, je te suis reconnaissante de m'avoir laissé les rênes du projet bicuspidie et j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Tu as su me laisser l'autonomie dont j'avais besoin tout en étant disponible lorsque nécessaire. Tu es un exemple de dévouement et de persévérance comme j'en ai rarement vu.

Marie-Annick Clavel et Benoit Arsenault, merci d'avoir pris un peu de votre temps que je sais très précieux pour évaluer ce mémoire. Vous êtes de jeunes chercheurs prometteurs et sincèrement inspirants.

Mes travaux de maîtrise ont été réalisés avec l'aide du soutien financier de plusieurs organismes que je me dois de reconnaître et de remercier chaleureusement: l'Université Laval, le Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval (CRIUCPQ), les Fonds de recherche Québec – Santé (FRQS), l'Association des chercheuses et chercheurs étudiant à la Faculté de médecine de l'Université Laval (ACCEM), les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et la Fondation des maladies du cœur du Canada.

Un immense merci aux collaborateurs de ce projet, tout particulièrement les docteurs Patrick Mathieu et Philippe Pibarot. Vos précieux conseils et votre contribution furent plus qu'appréciés.

À tous les membres du laboratoire (Nathalie, Josée, Cyndi, Laura, Gabrielle, Sandra, Olga, Emilie, Jean-Christophe, Maxime «Baboune» et Joël), merci infiniment pour les deux dernières années. Avec vous, j'ai appris, discuté, voyagé, ri à en pleurer et mangé beaucoup (trop) de dessert et de bacon. Il y a peu d'équipes de recherche aussi soudée, performante, stimulante et amusante que la nôtre.

Nicho, tu es mon frère préféré (!) et ton soutien et ton affection n'ont pas de prix à mes yeux. Maman et Papa, vous avez été présents tout au long de ce parcours malgré la distance qui nous sépare. Merci Maman pour tes *pep-talks* dans les moments plus difficiles. Papa, ton humour («As-tu reçu ton prix Nobel depuis la dernière fois qu'on s'est parlé?») et «Va rédiger dans la garde-robe, c'est paisible, je te le dis!») et ton esprit terre à terre me font simplement du bien. À vous deux, vous êtes une source intarissable de support et d'enthousiasme face à tout ce que j'entreprends. Je suis privilégiée d'être témoin d'un amour aussi solide, vrai et beau que le vôtre.

À mes amis, scientifiques ou non, merci pour vos encouragements, votre intérêt pour mes recherches et vos conseils rassurants dans les moments de doute malgré la distance ou les horaires chargés.

Olivier, tu apportes un équilibre à ma vie. Durant cette aventure qu'a été la maîtrise, tu as su être à l'écoute et me supporter, me conseiller et me rassurer. Ton inépuisable soif de connaissances jumelée à ton désir d'aider les gens fera de toi un médecin-chercheur exceptionnel. Merci de remplir mon quotidien d'amour, de rires et de moments mémorables.

Avant-propos

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette maîtrise ont été effectués à l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval (IUCPQ). Les résultats découlant de ces travaux font l'objet d'un manuscrit scientifique intitulé «*Identification of Gender-specific Genetic Variants in Patients with Bicuspid Aortic Valve*» accepté pour publication le 11 novembre 2015 par l'*American Journal of Cardiology*. Ce manuscrit est inclus dans le présent mémoire et consiste en une copie conforme de la version acceptée pour publication.

L'auteure du mémoire est également le premier auteur du manuscrit. Cette dernière a effectué la sélection des patients, a participé à la préparation des échantillons biologiques et des expériences de séquençage et de génotypage, a assuré l'analyse et l'interprétation des résultats et a rédigé le manuscrit. Maxime Lamontagne, étudiant au doctorat sous la supervision du docteur Yohan Bossé, a participé à l'analyse et à l'interprétation des résultats et a conçu la figure présentée dans le manuscrit. Nathalie Gaudreault, professionnelle de recherche pour le docteur Yohan Bossé, a contribué à la préparation des échantillons biologiques et des expériences de séquençage et de génotypage. Laura Sbarra et Cyndi Henry, professionnelles de recherche pour le docteur Yohan Bossé, ont participé à la préparation des échantillons biologiques et des expériences de séquençage. Les docteurs Patrick Mathieu et Philippe Pibarot sont tous deux professeurs titulaires de la Faculté de médecine de l'Université Laval et chercheurs à l'IUCPQ. Ils ont collaboré à la conception et à l'élaboration de l'étude ainsi qu'au recrutement des patients. Le docteur Yohan Bossé est professeur agrégé au département de médecine moléculaire de l'Université Laval et chercheur à l'IUCPQ. Il a conçu et assuré la coordination de l'étude ainsi que la collecte des échantillons biologiques et a également participé à la rédaction du manuscrit. Tous les coauteurs ont lu, révisé et approuvé le manuscrit accepté pour publication.

Chapitre 1 Introduction

1.1 Survol de l'embryogenèse du cœur et de la valve aortique chez l'humain

Battant normalement de 60 à 100 fois par minute au repos, le cœur humain assure l'éjection du sang dans la circulation pulmonaire et systémique. L'accomplissement de cette fonction essentielle est possible grâce au réseau de cavités musculaires, de valves, de vaisseaux et autres structures qui composent le cœur (Figure 1.1).

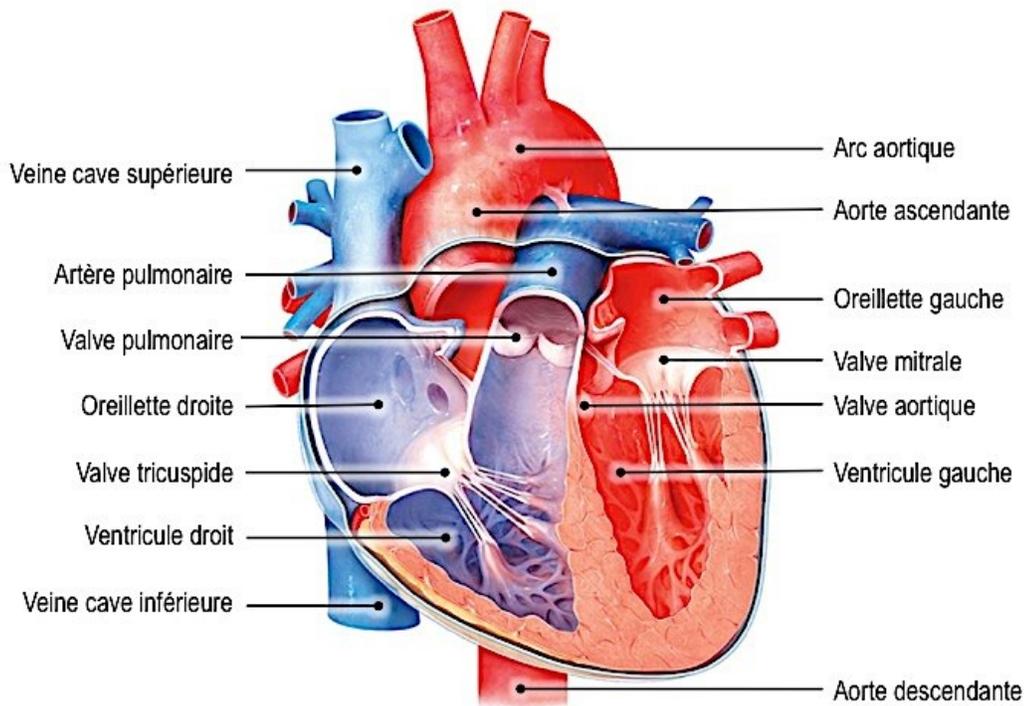


Figure 1.1. Schéma représentant les structures principales du cœur humain en coupe frontale
Figure adaptée de la *Anatomy and Physiology Visual Library 6.0* (edugen.com, copyright John Wiley and Sons Inc., 2012)

La valve aortique, qui sépare le ventricule gauche du cœur de l'aorte, fait partie des éléments indispensables au fonctionnement du système cardiovasculaire. Avec la valve pulmonaire, elle forme le groupe des valves dites semi-lunaires, qui sont composées de trois feuillets (ou valvules) (Figure 1.2). Les feuillets de la valve aortique sont attachés à l'anneau aortique par l'une de leurs extrémités. En réponse à la pression du ventricule gauche, la valve aortique s'ouvre et se ferme de façon cyclique afin de permettre l'expulsion du sang dans la circulation systémique et d'empêcher sa régurgitation dans le ventricule gauche (Figure 1.3).

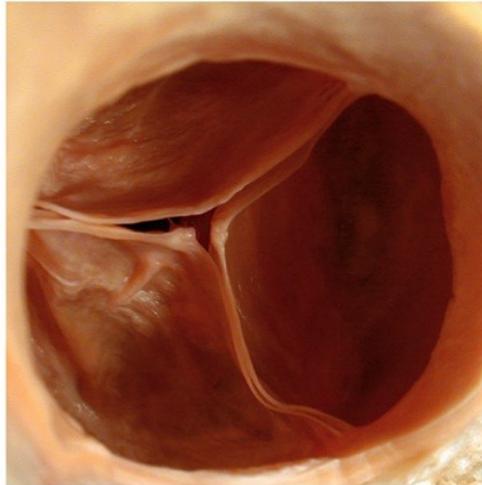


Figure 1.2. Vue supérieure de la valve aortique montrant ses trois feuillets (ou valvules)
 Figure adaptée de la *Anatomy and Physiology Visual Library 6.0* (edugen.com, copyright John Wiley and Sons Inc., 2012, dissection Shawn Miller, photographie Mark Nielsen)

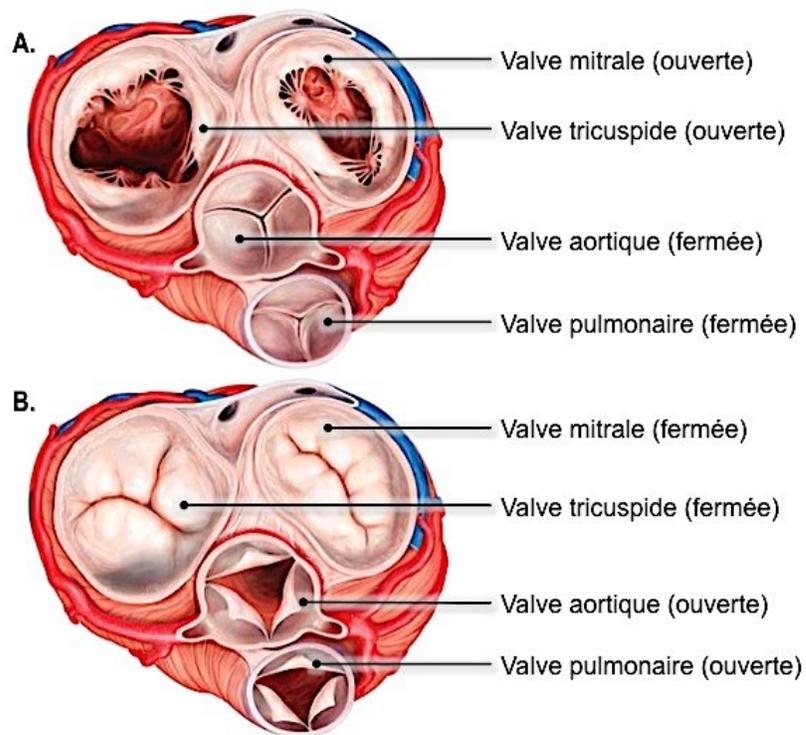


Figure 1.3. Schéma représentant le coeur sans les oreillettes en vue supérieure
 A. Les valves mitrale et tricuspide sont ouvertes, les valves aortique et pulmonaire fermées B. Les valves mitrale et tricuspide sont fermées, les valves aortique et pulmonaire ouvertes
 Figure adaptée de la *Anatomy and Physiology Visual Library 6.0* (edugen.com, copyright John Wiley and Sons Inc., 2012)

Sans surprise, la formation du cœur débute très tôt chez l'embryon humain. Il prend origine au niveau de la région cardiogénique située à l'extrémité qui deviendra ultimement la tête de l'embryon (Figure 1.4A)¹. Dès le 20^e jour de gestation, cet amas de cellules mésodermiques forme deux tubes endocardiques latéraux (Figure 1.4B) qui se fusionnent au 21^e jour afin de créer une seule entité : le tube cardiaque primitif (Figure 1.4C). Le jour suivant, le tube cardiaque primitif se compartimente en cinq régions distinctes qui donneront naissance au cœur à quatre chambres tel qu'on le connaît (Figure 1.4D). Ainsi, le sinus veineux formera entre autres l'oreillette droite et le nœud sinusal, l'oreillette primitive deviendra les oreillettes gauche et droite, le ventricule primitif se spécifiera en ventricule gauche, le bulbe primitif du cœur se transformera en ventricule droit et le tronc artériel évoluera en aorte ascendante et en tronc pulmonaire. Du 23^e au 28^e jour de gestation, le tube cardiaque primitif s'allonge et se replie (Figure 1.4E et F) pour atteindre sa conformation finale (Figure 1.4G).

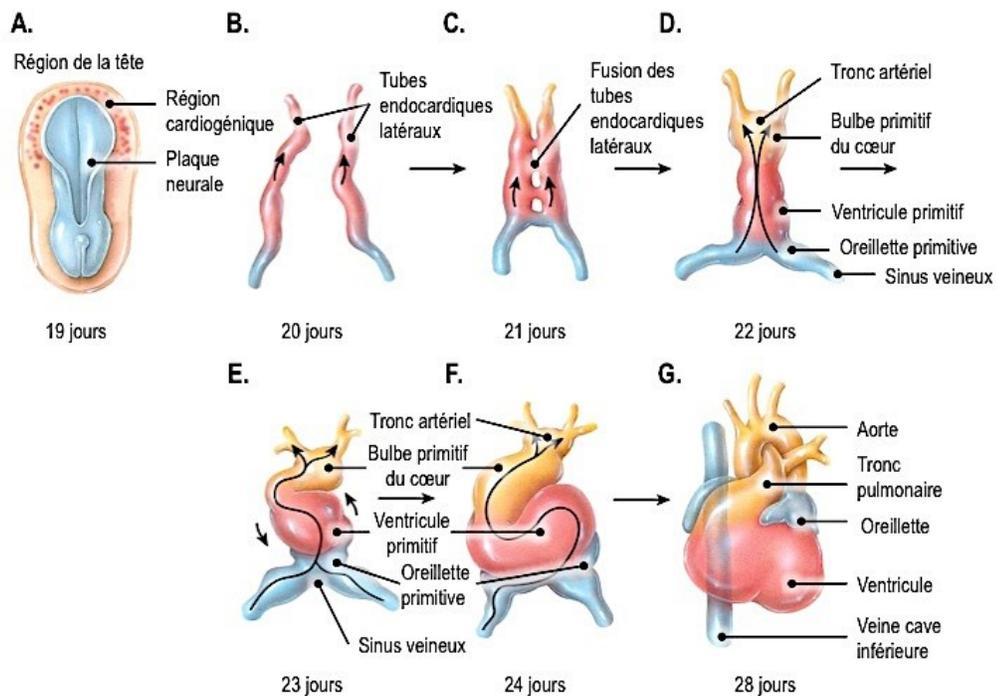


Figure 1.4. Schéma représentant le développement embryonnaire du cœur

A. Emplacement de la région cardiogénique B. Formation des tubes endocardiques latéraux C. Formation du tube cardiaque primitif D. Développement des régions du tube cardiaque primitif E et F Repliement du tube cardiaque primitif G. Conformation du cœur suite au repliement. Les flèches à l'intérieur des vignettes indiquent la direction de la circulation sanguine

Figure adaptée de la *Anatomy and Physiology Visual Library 6.0* (edugen.com, copyright John Wiley and Sons Inc., 2012)

La formation des cavités, des septa entre ces dernières et des valves cardiaques a lieu du 28^e jour à la 9^e semaine de grossesse. Une surproduction de matrice extracellulaire et une transition épithélio-

mésenchymateuse des cellules endocardiques fait apparaître deux replis (ou coussins) endocardiques dans le canal auriculoventriculaire et le tronc artériel (Figure 1.5)². Ces replis croissent jusqu'à fusionner, ce qui crée les valves mitrale et tricuspide au niveau du canal auriculoventriculaire et les valves aortique et pulmonaire au niveau du tronc artériel. Le développement des quatre valves cardiaques se termine par la formation des feuillets valvulaires, une étape impliquant la prolifération cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse et l'apoptose.

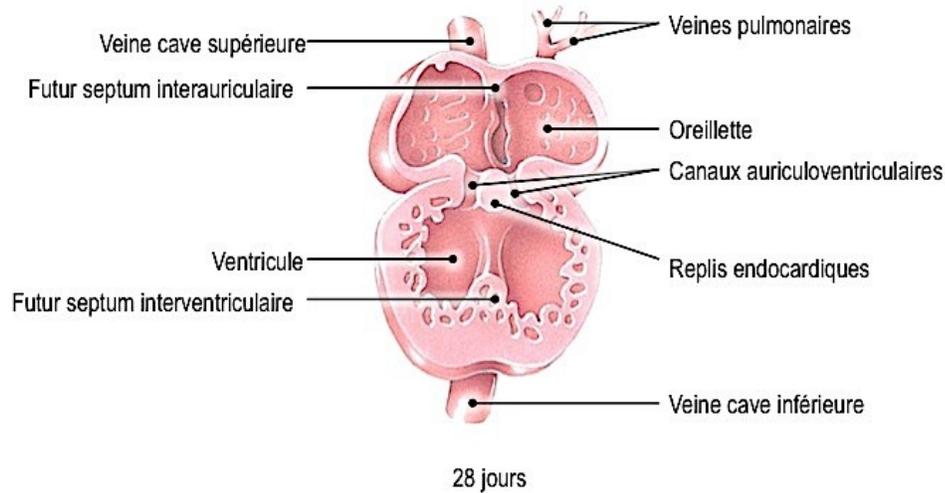


Figure 1.5. Schéma représentant le début de la division du cœur en quatre cavités au 28^e jour de gestation

Figure adaptée de la *Anatomy and Physiology Visual Library 6.0* (edugen.com, copyright John Wiley and Sons Inc., 2012)

1.2 Bicuspidie valvulaire aortique

La bicuspidie valvulaire aortique (BVA) est une malformation congénitale fréquente qui affecte la valve aortique. Résultant d'une déféctuosité survenant lors de l'embryogenèse, la BVA se traduit par une valve formée de deux feuillets (bicuspide) au lieu de trois (tricuspide) (Figure 1.6). De sévères complications valvulaires et aortiques affectent la majorité des patients atteints de BVA. La présentation et l'évolution clinique qui en découlent sont extrêmement hétérogènes et imprévisibles. De surcroît, son étiologie et ses fondements génétiques sont actuellement inconnus.

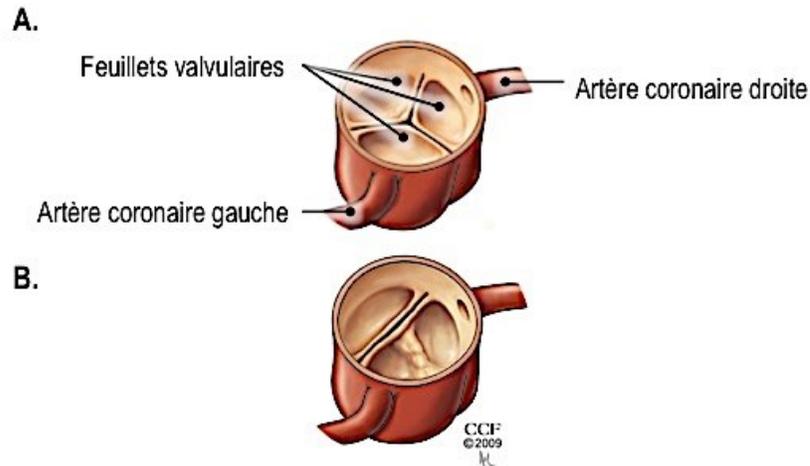


Figure 1.6. Schéma représentant une valve aortique tricuspide et une valve aortique bicuspide

A. Valve aortique tricuspide (à trois feuillets) B. Valve aortique bicuspide (à deux feuillets)

Figure adaptée de la page *Bicuspid Aortic Valve Disease* du site web de la *Cleveland Clinic* (<http://my.clevelandclinic.org/>)

1.2.1 Prévalence

De nombreuses études d'autopsies des années 1920 à 2000 ont estimé que 0,5 à 2,2% de la population mondiale est atteinte de BVA³. Cependant, il est possible que les cas de figure les plus bas sous-estiment la prévalence de la BVA en excluant les cas de nécropsie présentant plus d'une forme de malformation cardiaque. À l'inverse, les références démontrant les prévalences les plus élevées surestiment sans doute la présence de la BVA en incluant les valves remaniées suite à une atteinte rhumatismale de la valve.

Plus récemment, des études d'échocardiographie ont revu la prévalence de la BVA à la baisse, la situant entre 0,46 et 0,70%⁴⁻⁷. La BVA est considérée comme la cardiopathie congénitale la plus fréquente, loin devant les communications interventriculaires (la seconde malformation congénitale cardiaque la plus commune)⁸. La prévalence de la BVA est constante selon les régions géographiques et les origines ethniques, à l'exception des Afro-Américains, chez qui elle tend davantage vers 0,1 à 0,3%^{9,10}.

Les hommes constituent la majorité des individus atteints de BVA (environ 70 à 80% des cas). Certains chercheurs ont postulé une surreprésentation masculine dans les études échocardiographiques, mais le dépistage de la BVA chez les nouveau-nés et les enfants d'âge scolaire a également démontré un ratio de trois garçons pour une fille^{5,6}.

1.2.2 Diagnostic

Bien que la BVA soit une malformation congénitale, elle est asymptomatique en l'absence de complications valvulaires ou aortiques. À l'exception de quelques patients démontrant une dysfonction valvulaire ou aortique durant les premières années de vie, la présence de la BVA est constatée pour la première fois chez les patients dans la quarantaine ou la cinquantaine. De plus, comme les symptômes de la BVA sont non-spécifiques, son diagnostic est souvent le résultat d'une découverte fortuite.

Évidemment, le *gold standard* pour le diagnostic de la BVA consiste en l'observation visuelle directe de la valve lors d'une chirurgie de remplacement de la valve aortique ou de l'aorte ascendante¹¹. Cependant, il s'agit d'une approche pour le moins invasive, coûteuse et risquée. La BVA est donc habituellement diagnostiquée par échocardiographie transthoracique ou transoesophagienne¹² suite à la détection d'un souffle d'éjection systolique lors d'un examen de routine. Dans la majorité des cas, ces techniques d'imagerie médicale permettent une visualisation optimale de la valve aortique en court axe parasternal.

L'échocardiographie transthoracique et transoesophagienne ont été exhaustivement étudiées quant à leur habileté à diagnostiquer la BVA¹³⁻¹⁵. Comparativement à la méthode transthoracique, l'échocardiographie transoesophagienne est plus sensible, spécifique et précise pour détecter la BVA¹⁶. Toutefois, l'échocardiographie transthoracique est plus fréquemment utilisée en raison de son caractère moins invasif, la méthode transoesophagienne requérant l'insertion d'une sonde dans l'œsophage du patient. Il importe de noter que la précision de ces techniques est aussi diminuée chez les patients démontrant une calcification modérée ou sévère de la valve aortique¹⁵. Dans les cas où les images transthoraciques sont de mauvaise qualité, l'usage de la technique transoesophagienne ou d'autres méthodes plus performantes éprouvées chez les patients atteints de BVA (telles que l'imagerie par résonance magnétique cardiaque^{11,17-19} et la tomодensitométrie cardiaque¹⁹⁻²¹) est recommandé.

1.2.3 Sous-types morphologiques

Une valve aortique normale est composée de trois feuillets : le feuillet coronaire droit, le feuillet coronaire gauche et le feuillet non-coronaire. Les deux feuillets coronaires sont nommés ainsi car les artères coronaires prennent origine dans l'aorte ascendante, juste au-dessus de ces feuillets. Selon les feuillets impliqués dans la fusion, on dénote trois grands types de BVA (Tableau 1.1 et Figure 1.7).

Tableau 1.1 Principaux types de BVA

Type de BVA	Feuillets fusionnés	Prévalence
R-L	Coronaire droit (R) et coronaire gauche (L)	50 à 80%
R-NC	Coronaire droit (R) et non-coronaire (NC)	15 à 30%
L-NC	Coronaire gauche (L) et non-coronaire (NC)	1 à 15%

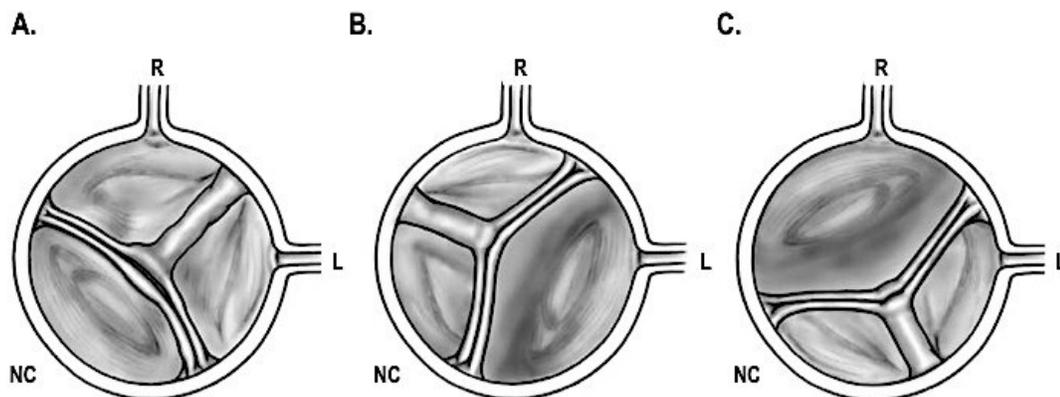


Figure 1.7. Schéma représentant les trois principaux types de BVA

A. Fusion des feuillets coronaire droit (R) et gauche (L) B. Fusion des feuillets coronaire droit et non-coronaire (NC) C. Fusion des feuillets coronaire gauche et non-coronaire

Figure adaptée de Michelena *et al.*, *Circulation* 2014 Jun 24;129(25):2691-704.

Les différents types de BVA semblent être des entités indépendantes causées par des déficiences distinctes. Alors que la BVA R-L découlerait d'une fusion anormale du tronc artériel, la BVA R-NC serait le résultat d'une erreur dans la transition épithélio-mésenchymateuse au niveau des replis endocardiques²².

Il a été postulé que les divers types de BVA engendrent des altérations hémodynamiques différentes qui sont responsables des phénotypes valvulaires et aortiques hétérogènes observés chez les patients atteints de BVA²³⁻²⁵. Selon les feuillets impliqués dans la fusion, le flot sanguin irrégulier éjecté dans l'aorte produit un stress mécanique substantiel au niveau de l'aorte et de la valve elle-même qui prédispose les patients à développer une insuffisance aortique, une sténose aortique calcifiante ou encore une dilatation de l'aorte. En effet, bien que le sujet fasse encore l'objet de controverse, la BVA R-L semble d'avantage associée à la dilatation de l'aorte ascendante²⁶⁻³¹ tandis que la BVA R-NC serait liée à un phénotype d'insuffisance et de sténose aortique calcifiante^{26-28,30-32}. Il ne semble pas y avoir un type de BVA affectant plus spécifiquement les hommes ou les femmes.

1.2.4 Évolution clinique

L'évolution clinique de la BVA est extrêmement hétérogène, allant du nouveau-né nécessitant une intervention durant les premières semaines de vie dû à des complications valvulaires ou aortiques sévères à l'octogénaire resté asymptomatique toute sa vie. Cependant, dans la majorité des cas de BVA, des complications affectant la qualité de vie se manifestent à l'âge adulte et nécessiteront une intervention médicale.

1.2.4.1 Sténose aortique calcifiante

Consistant en un rétrécissement de l'ouverture de la valve aortique causé par une accumulation de calcium sur les feuillets valvulaires, la sténose aortique calcifiante affecte approximativement 3% de la population occidentale âgée de 65 ans ou plus³³. Il s'agit de l'indication la plus commune pour le remplacement valvulaire aortique dans les pays développés.

La sténose aortique calcifiante est initiée par la présence de lipoprotéines au niveau de la valve aortique suivie d'une réaction inflammatoire et une oxydation des lipoprotéines³⁴. Il y a alors production de protéines inflammatoires et pro-calcifiantes, créant ainsi de la fibrose et de la calcification. Les feuillets valvulaires se rigidifient et l'ouverture de la valve s'en trouve diminuée (Figure 1.8). Les patients en viennent à éprouver de la dyspnée, de l'angine et des étourdissements, ce qui réduit considérablement leur qualité de vie. La combinaison de facteurs de risque classiques des maladies cardiovasculaires (sexe masculin, hypertension artérielle, hyperlipidémie, etc.) et de facteurs génétiques (gènes *VDR*, *NOTCH1*, *APOB* et *IL-10*)³⁵⁻³⁷ semble causer la pathologie.

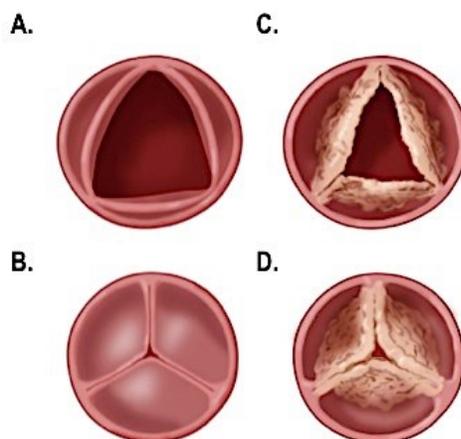


Figure 1.8. Schéma représentant une valve aortique normale et une valve aortique avec sténose aortique calcifiante

Valve aortique normale ouverte (A) et fermée (B). Valve aortique avec sténose aortique calcifiante ouverte (C) et fermée (D)

Figure adaptée de Monica Schroeder (<http://schroederillustration.com/>)

La sténose aortique calcifiante est sans contredit la complication retrouvée le plus fréquemment chez les patients atteints de BVA³⁸⁻⁴¹. Parmi les individus subissant une chirurgie de remplacement valvulaire aortique dû à la sténose aortique calcifiante, jusqu'à 60% des patients présentent une BVA⁴²⁻⁴⁵. Bien que le processus de calcification semble être le même indépendamment de la morphologie de la valve aortique³⁴, la sténose aortique calcifiante se développe beaucoup plus tôt chez les individus atteints de BVA que chez les individus ayant une valve aortique à trois feuillets^{42,43,46}. En moyenne, l'âge des patients atteints de BVA et de sténose aortique calcifiante nécessitant un remplacement de la valve aortique se situe dans la soixantaine comparativement à la soixante-dizaine chez les individus ayant une valve aortique tricuspide. Cette calcification précoce semble être le résultat de l'important stress mécanique et hémodynamique subi par la valve aortique bicuspidée³⁴. L'augmentation de ce stress chez les individus présentant une BVA de type R-L et une sténose aortique calcifiante concomitante par rapport à des individus ayant une valve aortique à trois feuillets exempte de calcification vient appuyer cette hypothèse⁴⁷. De plus, l'étude de patients souffrant de sténose aortique calcifiante révèle que les individus atteints de BVA ont une inflammation, une calcification et une néovascularisation de leur valve aortique beaucoup plus marquée comparativement aux individus ayant une valve aortique à trois feuillets^{48,49}. Chez les patients atteints de BVA, la sténose aortique calcifiante est également associée à la mortalité cardiovasculaire, au développement d'anévrismes et de dissections aortiques et aux interventions chirurgicales ou percutanées de la valve aortique ou de l'aorte ascendante^{38,50}. L'inefficacité des agents pharmacologiques à retarder ou empêcher la progression de cette atteinte de la valve aortique fait du remplacement valvulaire aortique la seule option permettant de restituer la qualité de vie des patients.

1.2.4.2 Insuffisance aortique

Quoique moins fréquente que la sténose aortique calcifiante, l'insuffisance aortique (aussi appelée régurgitation aortique) est une complication souvent associée à la BVA. Cette dysfonction valvulaire se traduit par un manque d'étanchéité de la valve aortique, ce qui permet au sang de régurgiter dans le ventricule gauche. À long terme, le ventricule gauche s'hypertrophie pour compenser la fuite et cause ultimement une insuffisance cardiaque gauche qui peut être fatale⁵¹.

Chez les individus présentant une BVA, l'insuffisance aortique peut être isolée ou retrouvée en combinaison avec d'autres complications valvulaires ou aortiques, particulièrement la sténose aortique calcifiante. Contrairement à la sténose aortique calcifiante, l'insuffisance aortique est plus commune chez les jeunes patients atteints de BVA, affectant 20 à 70% des patients âgés de moins de 50 ans^{34,38,39,46,52,53}. Plus de 15% de ces jeunes patients devront éventuellement subir un remplacement

valvulaire aortique attribuable à la progression de leur insuffisance aortique⁴⁶. Chez les patients de plus de 50 ans, c'est environ 10 à 45% des individus qui souffrent d'insuffisance aortique^{32,41,54}. La très grande majorité des patients souffrant d'insuffisance aortique sur une valve bicuspide sont de sexe masculin^{53,54}.

Au-delà de sa prévalence considérable chez les patients atteints de BVA, l'insuffisance aortique est aussi associée à des diamètres aortiques plus importants chez ces individus^{34,55,56}, ce qui représente un facteur de risque pour la dissection aortique. De plus, l'insuffisance aortique est considérée comme un prédicteur indépendant des événements graves (décès cardiovasculaires, interventions sur la valve aortique ou l'aorte ascendante et anévrismes ou dissections aortiques) pouvant survenir chez ces individus³⁸.

1.2.4.3 Endocardite infectieuse

L'endocardite infectieuse est une affection relativement rare mais grave de la couche interne du cœur causée par un agent bactérien, le plus souvent par le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*). Son incidence augmente avec l'âge : de 15 à 30 cas par 100 000 individus sont rapportés chaque année chez les personnes âgées de plus de 60 ans par rapport à 5 cas chez la population de moins de 50 ans. Deux fois plus d'hommes que de femmes en sont atteints.

L'endocardite infectieuse affecte tout particulièrement les valves cardiaques. Lorsqu'elle n'est pas traitée rapidement à l'aide d'antibiotiques, l'endocardite infectieuse peut entraîner l'apparition de végétations valvulaires (des excroissances mobiles sur les feuillets), la perforation ou la destruction des valves et même l'altération du système de conduction cardiaque. Chez les cas les plus sévères, la valve est trop gravement atteinte et doit être remplacée par une prothèse.

Les anomalies valvulaires, qu'elles soient congénitales ou acquises, constituent un facteur de risque important de l'endocardite infectieuse. La BVA est présente chez 12 à 43% des patients souffrant d'endocardite infectieuse, ce qui en fait la pathologie valvulaire la plus fréquemment identifiée chez ces derniers⁵⁷⁻⁶¹. La presque totalité des individus présentant une endocardite infectieuse sur une valve bicuspide sont des hommes. Ils sont également plus jeunes (âge moyen dans la trentaine) que leurs homologues ayant une valve aortique à trois feuillets, qui peuvent être plus âgés de 10 à 30 ans⁵⁷⁻⁵⁹. Certaines complications liées à l'endocardite infectieuse (comme les abcès péri-annulaires) sont plus fréquemment répertoriées chez les patients atteints de BVA. Malgré tout, la sévérité de l'infection (définie par la nécessité de réparer ou remplacer chirurgicalement la ou les valves atteintes) et la mortalité ne diffèrent pas entre les patients atteints de BVA et ceux ayant une valve aortique à trois feuillets^{58,59}.

1.2.4.4 Dilatation et anévrisme de l'aorte thoracique ascendante

Les complications les plus fréquentes impliquant l'aorte ascendante chez les patients atteints de BVA sont assurément la dilatation et l'anévrisme (Figure 1.9). Alors que la dilatation aortique est définie comme un élargissement du vaisseau sanguin de plus de 1,1 fois son diamètre normal, l'anévrisme consiste en une dilatation plus prononcée (élargissement de plus de 1,5 fois)⁶². En clinique, une aorte ascendante est habituellement considérée anévrismale si son diamètre est égal ou supérieur à 45mm. La dilatation et l'anévrisme de l'aorte ascendante peuvent progresser et éventuellement mener à la dissection aortique et à la rupture de l'artère, des complications qui sont graves et mortelles.

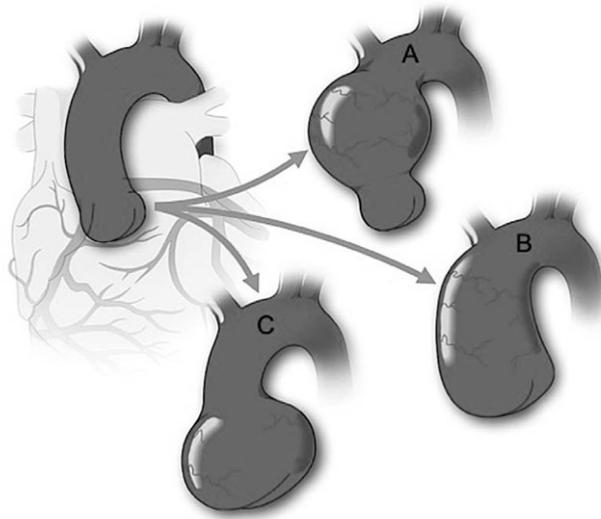


Figure 1.9. Schéma représentant différents types de dilatation de l'aorte ascendante chez les patients atteints de BVA

A. Dilatation de la portion tubulaire B. Dilatation de l'aorte ascendante entière, incluant la jonction sino-tubulaire et les sinus de Valsalva C. Dilatation restreinte aux sinus de Valsalva
Figure adaptée de Michelena *et al.*, *Circulation* 2014 Jun 24;129(25):2691-704.

Comparativement aux individus ayant une valve aortique à trois feuillets, la dilatation et l'anévrisme de l'aorte ascendante sont retrouvés plus fréquemment chez les patients atteints de BVA^{62,63}. En effet, environ 55% des patients atteints de BVA âgés de moins de 30 ans et 85% des patients âgés de plus de 80 ans ont une aorte ascendante dilatée ou anévrismale⁶². Ces complications aortiques affectent les patients présentant une BVA à un plus jeune âge que les personnes qui ont une valve aortique tricuspide, soit approximativement 10 ans plus tôt^{62,64}. Les diamètres de la portion ascendante de l'aorte des individus présentant une BVA sont aussi plus larges que ceux de leurs homologues ayant une valve aortique tricuspide⁶⁵. Ces plus grands diamètres engendrent une progression de la dilatation aortique de 0,2 à 1,9 mm/année, ce qui est plus rapide que chez les patients ayant une valve

tricuspide⁶⁵. Il est important de noter que le remplacement valvulaire aortique ne prévient pas la progression de la dilatation aortique chez les patients atteints de BVA⁶⁶.

La cause de cette atteinte fréquente de l'aorte ascendante chez les patients souffrant de BVA est mal comprise, mais plusieurs options sont mises de l'avant. Tout d'abord, l'origine embryonnaire commune de la valve aortique et du segment ascendant de l'aorte pourrait expliquer la concomitance entre ces deux pathologies⁶². La présence marquée de dilatation du segment ascendant de l'aorte chez les proches au premier degré de patients atteints de BVA laisse croire à une défectuosité génétique⁶⁵. La pression et le stress occasionné à la paroi aortique par le flot sanguin irrégulier expulsé par la valve aortique bicuspidée suggèrent également l'implication d'altérations hémodynamiques. D'ailleurs, les caractéristiques hémodynamiques distinctes engendrées par les divers sous-types morphologiques de BVA semblent causer différents profils de dilatation de l'aorte ascendante.

1.2.4.5 Dissection aortique

À cause de son taux de mortalité important, la dissection aortique est la complication la plus redoutée chez les patients atteints de BVA. Elle consiste en une déchirure de la paroi interne de l'aorte qui induit un flot sanguin entre les différentes tuniques de l'artère. Cet afflux sanguin anormal peut ultimement résulter en une rupture de l'aorte, ce qui cause une hémorragie souvent fatale. Heureusement, la dissection aortique est un événement cardiovasculaire rare, son incidence étant de 2,9 à 4,3 cas par 100 000 personnes par année dans la population générale⁶⁷. Cette incidence semble être à la hausse depuis les dernières décennies mais tout porte à croire que cette augmentation est due en partie à l'amélioration des méthodes diagnostiques.

Les dissections aortiques sont classées selon la section de l'aorte affectée. Deux systèmes de classification, ceux de Stanford⁶⁸ et de De Bakey⁶⁹, sont fréquemment utilisés afin de caractériser les dissections aortiques (Figure 1.10). Alors que le système de Stanford classe les dissections selon l'atteinte (type A) ou l'absence d'atteinte de l'aorte ascendante (type B), celui de De Bakey est plus précis. En effet, ce dernier fait la distinction entre une dissection aortique affectant uniquement l'aorte ascendante (type II), l'aorte descendante (type III) ou les deux (type I). Environ les deux tiers des cas de dissection aortiques impliquent l'aorte ascendante (Stanford type A, De Bakey types I et II)⁶⁷. Pour ce type de dissection, c'est l'intervention chirurgicale qui est associée au plus bas taux de mortalité hospitalière, soit 23% par rapport à 59% chez les cas traités de façon pharmacologique⁶⁷.

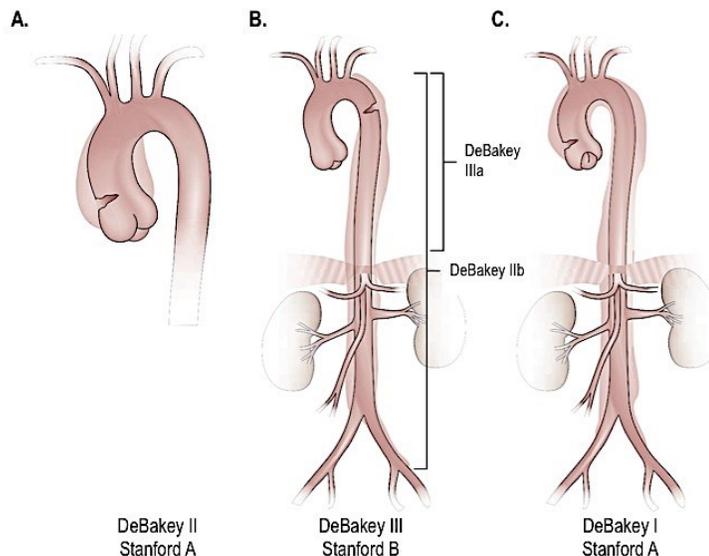


Figure 1.10. Schéma représentant les classifications des dissections aortiques selon les systèmes de De Bakey et de Stanford

A. Dissection de l'aorte ascendante B. Dissection de l'aorte descendante C. Dissection de l'aorte ascendante et descendante

Figure adaptée de LeMaire *et al.*, Nat Rev Cardiol 2011 Feb;8(2):103-13.

La relation entre la dissection aortique et la BVA a d'abord été évaluée dans des séries de nécropsies. Une large étude⁷⁰ incluant plus de 21 000 cadavres a noté que 6,1% des 293 individus présentant une BVA avaient également une dissection aortique, ce qui correspondait à un risque neuf fois plus élevé que celui de la population présentant une valve aortique tricuspide. Dans cette même étude, les patients atteints de BVA comptaient pour 11% des 161 cas de dissection aortique. Des publications additionnelles de type *post-mortem* ont corroboré cette dernière constatation, enregistrant une prévalence de 7 à 15% de BVA chez les individus atteints de dissection aortique⁷¹. Présentement, l'association entre la dissection aortique et la BVA est réalisée en évaluant la morphologie valvulaire aortique de patients souffrant d'une dissection aortique ou en dénombrant l'occurrence de dissections aortiques chez des patients atteints de BVA. De récentes études ont revu à la baisse les résultats des séries de nécropsies, estimant que 4 à 8% des patients souffrant de dissection aortique sont également porteurs d'une BVA⁷²⁻⁷⁴. D'autres publications recensent un risque de dissection aortique de 0 à 1,0% chez les patients atteints de BVA suite à un remplacement valvulaire aortique^{39,71}, ce qui représente tout de même un risque plus élevé que celui observé dans la population générale³⁹.

Par rapport aux individus ayant une valve à trois feuillets, les patients atteints de BVA sont systématiquement plus jeunes lors de la dissection aortique. Alors que l'âge moyen au moment de la dissection aortique chez les individus ayant une valve à trois feuillets se situe aux environs de 60 ans, il

tend davantage vers 50 ans chez les patients atteints de BVA⁷³⁻⁷⁶. Chez ces derniers, il semble que la dissection aortique soit plus fréquente chez les individus qui présentent une insuffisance aortique isolée ou prédominante⁷¹ en comparaison avec un phénotype de sténose aortique calcifiante. Des différences dans la dilatation et l'élasticité aortique pourraient expliquer la prédisposition de ces derniers à développer des dissections aortiques.

1.2.5 Interventions médicales

La BVA étant une malformation congénitale, il n'est pas possible de traiter cette cardiopathie de façon définitive. De plus, une valve aortique à deux feuillets demeure fonctionnelle en l'absence de complications valvulaires et/ou aortiques. En conséquence, ce sont ces dernières qui font l'objet d'une surveillance et d'efforts médicaux accrus.

Il faut savoir que le recours aux agents pharmacologiques est limité chez les patients atteints de BVA et qu'ils empêchent rarement la progression de la plupart des complications. Une intervention chirurgicale impliquant la valve aortique et au besoin l'aorte est donc nécessaire chez la majorité des patients lorsque les complications deviennent trop sévères et que leur qualité de vie est affectée. Pour certains patients non éligibles à la chirurgie à cause de risques trop élevés, il est maintenant possible de considérer une intervention réalisée par voie percutanée afin de remplacer la valve aortique.

1.2.5.1 Interventions de type pharmacologique

Autre que pour le traitement de l'endocardite et la normalisation de la tension artérielle, l'usage d'agents pharmacologiques pour la BVA est controversé, particulièrement pour ralentir la progression de la dilatation aortique et de la sténose aortique calcifiante. Une baisse de la progression de la dilatation aortique a été notée chez les patients atteints du syndrome de Marfan traités avec des bêta-bloquants⁷⁷, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA)⁷⁸ ou des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA)⁷⁹. Cependant, il existe très peu de renseignements concernant l'efficacité de ces traitements chez les patients atteints de BVA, si ce n'est qu'ils ne semblent pas exercer d'effet bénéfique⁸⁰. Dans le cas de la sténose aortique calcifiante, il a été postulé que les statines (des molécules utilisées pour réduire les niveaux de cholestérol) pourraient ralentir la progression de la calcification et conséquemment diminuer le recours à la chirurgie de remplacement valvulaire aortique⁸¹. Cette hypothèse provient de l'observation de similarités entre la sténose aortique calcifiante et l'athérosclérose, notamment au niveau de leurs facteurs de risque et de leur pathogenèse. Malgré les résultats encourageants de quelques études, rétrospectives pour la plupart^{82,83}, de larges essais cliniques randomisés n'ont relevé aucune diminution de la progression de la sténose aortique calcifiante chez des patients traités avec des molécules hypolipémiantes⁸⁴⁻⁸⁸.

1.2.5.2 Interventions de type chirurgical

En 2010, près de 106 000 chirurgies valvulaires cardiaques (toutes valves confondues) ont été réalisées aux États-Unis⁸⁹, les remplacements de valves aortiques comptant pour environ la moitié de ces interventions⁹⁰. Au Canada, la plus récente estimation du nombre de chirurgies valvulaires cardiaques réalisées annuellement date de 2006, où près de 9 000 opérations ont été recensées⁹¹. Le nombre de chirurgies valvulaires aortiques est à la hausse^{90,92-94} et leur coût moyen est estimé à 75 000\$ CAN⁹⁵.

Le remplacement de la valve aortique consiste en une chirurgie à cœur ouvert durant laquelle la valve malade du patient est excisée et remplacée par une prothèse mécanique ou biologique (d'origine porcine, bovine ou humaine) (Figure 1.11). Le taux de mortalité et les complications associées à la chirurgie sont très bas, ce qui en fait l'intervention de choix pour les patients atteints de sténose aortique calcifiante ou d'insuffisance aortique sévères, indépendamment de leur morphologie valvulaire.



Figure 1.11. Différents types de prothèses valvulaires

A. Valve mécanique à ailettes (St-Jude) B. Valve mécanique à disque (Medtronic Hall) C. Valve mécanique à bille (Starr-Edwards) D. Bioprothèse porcine avec armature (Medtronic Mosaic) E. Bioprothèse péricardique avec armature (Carpenter Edwards Magna) F. Bioprothèse porcine sans armature (Medtronic Freestyle)

Figure adaptée de Pibarot *et al.*, *Circulation* 2009 Feb 24;119(7):1034-48.

Il faut toutefois savoir que le remplacement valvulaire aortique n'est pas une option permanente ni curative. Le remplacement de la valve malade par une prothèse est bénéfique pour le patient, mais ne traite pas sa pathologie valvulaire. Il y a donc transition de la pathologie de la valve native en pathologie de la valve prosthétique, ce qui rend cruciale la sélection de la prothèse qui convient le mieux à chaque patient⁹⁶. À cause de leur plus grande durabilité, les prothèses mécaniques sont recommandées pour les candidats âgés de moins de 60 ans et ceux pour qui le remplacement d'une

prothèse dysfonctionnelle après quelques années s'avèrerait trop risquée¹². Cependant, la pose d'une prothèse mécanique requiert la prise d'anticoagulants (warfarine) à vie, ce qui augmente les risques de saignements et d'hémorragies⁹⁷. Le cliquetis constant causé par le mouvement d'une prothèse mécanique peut aussi être inconfortable pour le patient⁹⁸. Les prothèses biologiques sont quant à elles recommandées pour les individus de plus de 60 ans, les femmes en âge de procréer et les patients ayant une contre-indication à l'anticoagulation¹². Ce type de prothèse est particulièrement sujet à la dégénération due à la sténose aortique calcifiante, une complication qui réduit substantiellement la durée de vie de la prothèse⁹⁹. À titre d'exemple, jusqu'à 50% des prothèses biologiques se détériorent à un point tel qu'elles ne fonctionnent plus adéquatement et doivent être remplacées après 15 ans⁹⁷. Des risques de thromboembolie et d'endocardite infectieuse sont présents, mais ils sont similaires entre les deux types de prothèses si l'anticoagulation est adéquatement contrôlée dans le cas des prothèses mécaniques.

Les patients atteints de BVA comptent pour 30 à 50% des individus subissant un remplacement valvulaire aortique^{43,100}. En dépit de cette importante proportion, les indications pour la chirurgie de remplacement valvulaire dues à une sténose aortique calcifiante ou une insuffisance aortique sévère ne tiennent pas compte de la distinction entre les valves aortiques à deux et à trois feuillets¹². La présentation beaucoup plus précoce de ces complications valvulaires, la fréquence des complications aortiques et les particularités cliniques et hémodynamiques des différents sous-types morphologiques valvulaires des individus atteints de BVA requiert des directives chirurgicales distinctes.

Le manque de traitements pharmacologiques efficaces pour la sténose aortique calcifiante et l'insuffisance aortique explique le recours fréquent à la chirurgie de remplacement valvulaire aortique chez les patients atteints de BVA. Il s'agit d'une intervention coûteuse, invasive et temporaire qui peut occasionner des complications rares mais graves. Dans un système de santé public comme celui du Canada, la BVA représente un fardeau médical, économique et social non négligeable.

1.2.5.3 Interventions de type percutané

Jusqu'à tout récemment, le traitement des patients atteints de sténose aortique calcifiante sévère inopérables (âge trop avancé, présence de comorbidités ou score de risque opératoire trop élevé) était limité à des interventions pharmacologiques essentiellement palliatives. La valvuloplastie aortique percutanée, qui consiste en le gonflement d'un ballonnet au niveau de la valve aortique inséré via la circulation sanguine, était aussi utilisée afin d'élargir la valve aortique calcifiée¹⁰¹. Malgré une diminution du taux de mortalité et une amélioration de la qualité de vie dans les 6 premiers mois suivant la valvuloplastie par rapport aux patients sans valvuloplastie, ces bénéfices n'étaient plus

significatifs au-delà de 6 mois¹⁰². Suivant cette période, la mortalité était approximativement de 25% tant chez les patients avec ou sans valvuloplastie.

Aujourd'hui, le développement de l'implantation de valve aortique par voie percutanée (TAVI, de l'anglais *transcatheter aortic valve implantation*) représente une option intéressante pour les patients inopérables. Le TAVI est semblable à la valvuloplastie en ce sens qu'une prothèse aortique est guidée jusqu'au cœur à l'aide d'un cathéter inséré dans la circulation sanguine du patient et déployée au niveau de la valve aortique (Figure 1.12). La procédure est principalement réalisée en utilisant l'artère fémorale, mais les voies transapicales et transaortiques peuvent aussi être utilisées. Employées pour la première fois chez l'humain en 2002 par le docteur Alain Cribier¹⁰³, les prothèses valvulaires percutanées ont depuis été homologuées dans plusieurs pays. Le Canada a d'ailleurs approuvé l'usage de ces prothèses en 2011 pour les patients non éligibles à la chirurgie de remplacement valvulaire ou atteints de sténose aortique calcifiante sévère.



Figure 1.12. Différents types de prothèses valvulaires percutanées

Source: Site web de la compagnie d'instruments médicaux Medtronic (www.medtronic.com)

Le TAVI a fait l'objet de nombreuses études afin d'évaluer son coût, son efficacité par rapport aux autres interventions et l'incidence des complications qui y sont associées. Par rapport au suivi traditionnel chez les patients jugés inopérables, le TAVI est maintenant reconnu comme avantageux en termes de coûts ajustés pour la qualité de vie¹⁰⁴. Chez ces patients, la mortalité suite au TAVI est également diminuée comparativement au suivi traditionnel⁹⁵. En revanche, chez les patients opérables, le TAVI n'est pas avantageux en termes de survie par rapport à la chirurgie. Malgré l'observation d'une réduction des saignements majeurs et du séjour hospitalier, le TAVI cause plus d'insuffisance aortique et de complications vasculaires que la chirurgie⁹⁵. L'intervention percutanée est également plus coûteuse que la chirurgie^{104,105}, ce qui explique le fait que le TAVI soit réservé aux patients chez qui l'option de la chirurgie est exclue.

Quoique le premier TAVI ait été réalisé chez un homme atteint de BVA, la malformation congénitale a été exclue de la plupart des études et essais cliniques ultérieurs investiguant cette nouvelle technique. La calcification irrégulière, le large diamètre de l'anneau aortique et les complications aortiques inhérentes aux patients atteints de BVA affectent la durabilité de la prothèse et résultent en une incidence de dissection aortique et d'insuffisance aortique modérée et sévère plus élevée¹⁰⁶. Toutefois, la poignée d'études sur le TAVI chez des patients atteints de BVA ne remarque aucune différence dans la mortalité à 30 jours (~8%) et à 1 an (~18%) comparativement aux patients ayant une valve aortique à trois feuillets¹⁰⁶.

À ce jour, le manque de suivi s'étalant sur plus d'un an chez les patients atteints de BVA ayant subi un TAVI ne permet pas d'établir hors de tout doute que cette intervention est bénéfique pour les patients ayant une valve aortique à deux feuillets. La sélection rigoureuse des patients atteints de BVA effectuée dans le cadre de ces études limite aussi l'extrapolation des résultats à l'ensemble de la population BVA. Suite à ces constats, le TAVI est présentement restreint aux patients avec BVA qui sont inopérables.

1.2.6 Étiologie

Tel que rapporté plus haut, la ou les causes de la BVA ne sont pas connues. Toutefois, la BVA est associée à plusieurs syndromes et affections cardiaques congénitales, ce qui suggère que la BVA a une origine commune avec ces pathologies.

Une forte prévalence de BVA est détectée chez des patients atteints de syndromes génétiques multisystémiques comportant une atteinte cardiovasculaire marquée (Tableau 2).

Tableau 1.2. Syndromes génétiques incluant une prévalence de BVA plus élevée que celle de la population générale

Syndrome	Gène impliqué	Manifestations cardiovasculaires	Prévalence de la BVA
DiGeorge	Délétion région 22q11.2	CIV, tétralogie de Fallot, IAA, BVA	~50-75% ¹⁰⁷
Loeys-Dietz	<i>TGFBR1</i> et <i>TGFBR2</i>	Anévrisme et dissection vasculaires, CIA, PCA, BVA	~15% ¹⁰⁸
Marfan	<i>FIBRILIN1</i>	Dilatation et dissection aorte ascendante, dégénération des valves mitrale et aortique, BVA	~5% ^{109,110}
Turner	Monosomie chromosome X	Coarctation de l'aorte, IM, BVA	~20-35% ^{111,112}
William	Délétion région 7q11.23	Sténose aortique supra-avalvulaire, dégénération des valves mitrale et aortique, BVA	~10% ¹¹³

BVA, bicuspidie valvulaire aortique; CIA, communications interauriculaires; CIV, communications interventriculaires; IAA, interruption de l'arc aortique; IM, insuffisance mitrale; PCA, persistance du canal artériel.

La BVA a particulièrement été caractérisée dans les syndromes de Marfan et de Turner. Chez le syndrome de Marfan, qui résulte d'une anomalie des tissus conjonctifs, approximativement 80% des patients présentent des manifestations cardiovasculaires¹¹⁴. Bien que la BVA et le syndrome de Marfan aient des particularités en commun (risque important de dilatation et de coarctation de l'aorte ascendante, par exemple), l'expression protéique de la matrice extracellulaire de l'aorte ascendante des individus BVA se distingue de celle observée chez les individus Marfan¹¹⁵. Cette disparité pourrait expliquer la différence des patrons de dilatation de l'aorte chez ces deux groupes¹¹⁶. Dans le cas du syndrome de Turner, les anomalies cardiovasculaires sont recensées chez 20 à 40% des patients^{111,117}. La prévalence de la BVA, en particulier de type R-L^{118,119}, est très élevée chez les patients atteints de ce syndrome (~20-35%)^{111,112}.

La BVA est aussi observée en concomitance avec des malformations congénitales cardiaques. Par exemple, la BVA est retrouvée chez 50 à 75% des patients souffrant de coarctation de l'aorte^{120,121}. Les individus atteints de ces deux pathologies démontrent un plus haut taux de complications de l'aorte ascendante et d'anomalies non cardiaques^{120,122}. Un lien entre les régions génétiques associées au syndrome d'hypoplasie du cœur gauche et à la BVA a aussi été observé¹²³.

La BVA partage de nombreuses caractéristiques avec diverses pathologies génétiques et anomalies cardiaques congénitales. Ces similarités laissent présager que la BVA est le résultat d'une altération génétique complexe qui se manifeste dès le début de l'embryogenèse.

1.3 Génétique de la BVA

1.3.1 Brève introduction à la génétique

1.3.1.1 Structure et fonction du génome humain et degré de similitude intra- et inter-espèces

Souvent comparé à un livre de recettes ou un manuel d'instructions, le génome contient la totalité des informations indispensables au fonctionnement et à la reproduction d'un organisme vivant. Chez l'homme, le génome réfère aux molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) nucléaire et mitochondriale, composées de deux brins complémentaires qui s'entrelacent afin de former une double hélice. Malgré la complexité de ses fonctions, l'ADN est composé de seulement quatre types de nucléotides constitués d'un sucre, d'un groupement phosphate et d'une base azotée (adénine, thymine, cytosine ou guanine). Chaque type de nucléotide a la capacité de former des paires avec un autre type par le biais de ponts hydrogène (adénine-thymine et cytosine-guanine), ce qui mène à la construction de brins d'ADN complémentaires (Figure 1.13). Le génome humain est le résultat de l'enchainement de plus de trois milliards de ces paires de nucléotides dans un ordre bien précis condensées en 23 paires de chromosomes¹²⁴.

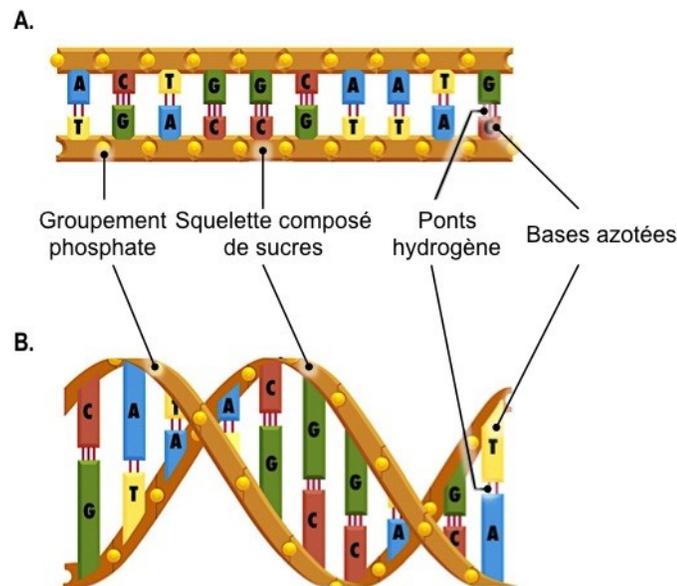


Figure 1.13. Schéma représentant les principales composantes de l'ADN

A. En conformation double brin linéaire B. En conformation double hélice

Figure adaptée de *Molecular Biology of the Cell 5th edition*, 2008 (Garland Science)

Le génome humain est composé de séquences d'ADN codantes et non-codantes. Constituant approximativement 3% du génome¹²⁵, les séquences d'ADN codantes sont les régions occupées par les 25 000 gènes transcrits en ARN et subséquemment traduits en protéines¹²⁶. La majorité du génome

est donc composé de séquences d'ADN non-codantes qui ont longtemps été étiquetées comme inutiles (en anglais *junk DNA*). On sait maintenant que ces régions de l'ADN abritent entre autres des séquences régulatrices, des ARN non-codants et des séquences répétées qui contribuent à la stabilité du génome, à la réparation de l'ADN¹²⁷ et à la régulation de l'expression des gènes¹²⁸.

Malgré l'étendue du génome humain, sa séquence varie peu entre deux individus. Il est estimé que l'ADN de deux humains diffère de 0,1% seulement¹²⁹. C'est donc dire que quelques trois millions de variations génétiques contribuent à créer la diversité génétique observée chez l'humain. Le génome humain présente également une homologie de séquence avec les génomes des autres espèces vivantes. Par exemple, 99% de l'ADN humain est identique ou similaire à celui du chimpanzé¹³⁰. Ces homologies de séquences inter-espèces permettent d'inférer l'impact dommageable des variations génétiques. En effet, comme une région conservée du génome à travers l'évolution est probablement essentielle à l'homéostasie, une variation génétique détectée dans une telle région risque d'engendrer des altérations fonctionnelles importantes.

1.3.1.2 Variations génétiques

Les variations génétiques ponctuelles (affectant un seul nucléotide) sont les modifications les plus fréquemment retrouvées dans le génome humain¹²⁹. Pour les caractériser, les termes «mutations» et «polymorphismes» sont souvent employés dans la littérature scientifique. Par définition, une mutation représente une modification permanente dans la séquence nucléotidique tandis qu'un polymorphisme consiste en une variation génétique dont la fréquence dans la population est plus grande ou égale à 1%¹³¹. Les mutations ont souvent été exclusivement associées à des effets plus délétères et les polymorphismes à des conséquences davantage bénignes, ce qui est inexact. Ces deux termes ont aussi été employés de manière interchangeable. Afin d'éviter la confusion, de récentes recommandations¹³¹ ont suggéré de regrouper les mutations et les polymorphismes sous une seule et même appellation, les «variations génétiques», qui peuvent être précisées en ajoutant un qualificatif (par exemple pathogénique ou bénigne).

Les variations génétiques peuvent être localisées dans une région codante de l'ADN. Les variations faux-sens, non-sens et silencieuses (ou synonymes) font partie de cette catégorie (Figure 1.14). Les variations faux-sens et non-sens sont des modifications ponctuelles résultant en la substitution d'un acide aminé par un autre. Les variations génétiques silencieuses sont des variations ponctuelles qui n'affectent pas la séquence de la protéine encodée par cette région. Elles sont cependant reconnues pour affecter la conformation tridimensionnelle et donc la fonction protéique¹³². Une délétion ou une insertion d'un ou de plusieurs nucléotides consécutifs peut également décaler le cadre de lecture de l'ADN, ce qui peut occasionner l'apparition d'un codon stop prématuré dans la séquence de la protéine.

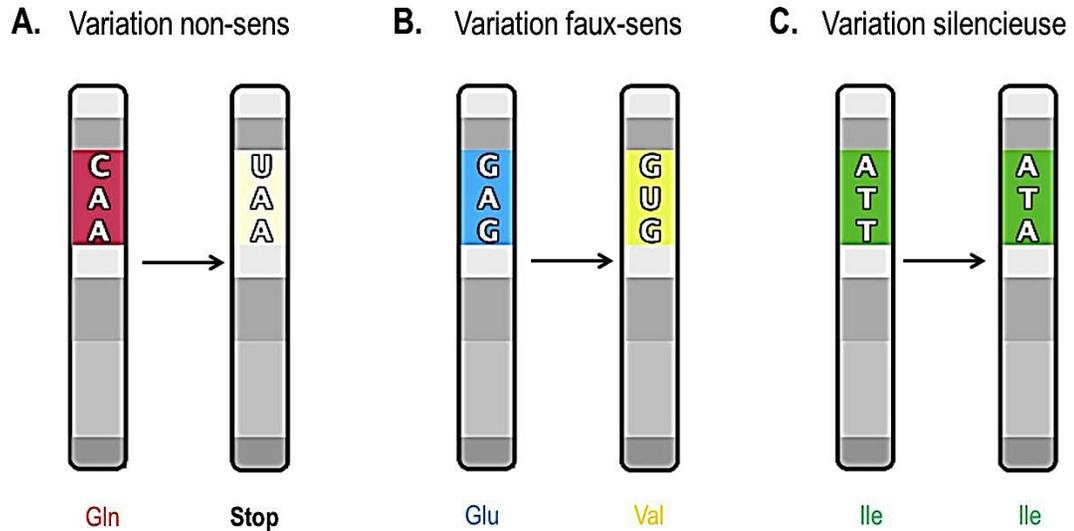


Figure 1.14. Différents types de variations génétiques ponctuelles

A. Non-sens B. Faux-sens C. Silencieuse

Gln, glutamine; Glu, acide glutamique; Ile, isoleucine; Stop, codon d'arrêt; Val, valine.

Figure adaptée de la page Mutations Génétiques du portail web Wikipedia

([https://fr.wikipedia.org/wiki/Mutation_\(généétique\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Mutation_(généétique)))

La majorité des variations génétiques retrouvées dans le génome humain sont toutefois localisées dans les régions ne codant pas pour une protéine (promoteur, intron, régions intergéniques et régions 3' et 5' non traduites)¹³³. Comme ces portions de l'ADN ont des fonctions régulatrices, la présence d'une variation à ces endroits peut affecter la liaison de facteurs de transcription, d'activateurs ou de répresseurs¹³⁴. L'expression des gènes régulés par ces régions est alors modifiée et la fonction biologique des protéines codées par ces gènes peut être perturbée.

La composante génétique hétérogène de la BVA, comme celle des autres maladies complexes, semble être le résultat de l'interaction entre plusieurs gènes. Il semble que la combinaison de nombreuses variations génétiques retrouvées dans ces gènes cause la pathologie ou augmente la susceptibilité de la développer. Bien que la majorité des variations génétiques impliquées semblent contribuer modestement au risque de développer la maladie, il est postulé qu'un petit nombre de variations génétiques ont des effets plus importants.

1.3.1.3 Détection de variations génétiques par séquençage d'ADN

Le séquençage d'ADN de type Sanger est une innovation qui a transformé la façon d'analyser les acides nucléiques et ainsi révolutionné le monde de la science. Il a depuis fait place aux méthodes de séquençage nouvelle génération. Progressant sans cesse, elles permettent maintenant de séquencer rapidement les génomes entiers de plusieurs espèces et de les comparer à des fins phylogénétiques,

d'étudier l'épigénétique (la méthylation de l'ADN ou l'état de la chromatine, par exemple) et de comprendre l'impact des variations génétiques sur la santé humaine.

1.3.1.3.1 Séquençage de type Sanger

Le séquençage à terminaison de chaîne a été élaboré par Frederick Sanger en 1977¹³⁵ et porte maintenant son nom. Considérée comme la première génération de séquençage d'ADN, cette technique a entre autres été utilisée dans le cadre du *Human Genome Project*¹³⁶, une initiative visant à séquencer la totalité du génome humain (à l'exception des régions d'hétérochromatine) complétée en 2003.

Le concept du séquençage à terminaison de chaîne de Sanger est relativement simple. À partir de fragments d'ADN simple brin, la réaction de séquençage permet la reconstitution du brin complémentaire à l'aide d'une enzyme ADN polymérase et des quatre types de nucléotides¹³⁷. Des didéoxynucléotides, qui sont des nucléotides avec un groupement hydroxyle (OH) manquant, sont également incorporés en petite quantité dans le mélange de réaction. Chaque type de nucléotide modifié (ddA, ddT, ddC ou ddG) est aussi étiqueté à l'aide d'un marqueur fluorescent différent. Pour former le brin d'ADN complémentaire, la polymérase ajoute des nucléotides normaux ou des didéoxynucléotides, sans faire la distinction entre les deux. Toutefois, quand un didéoxynucléotide est incorporé, la synthèse du brin d'ADN complémentaire s'arrête car l'absence du groupement hydroxyle empêche la liaison d'un nucléotide supplémentaire. La réaction de séquençage engendre donc la formation d'un grand nombre de fragments d'ADN double brin de longueurs différentes qui se terminent tous par l'un des quatre types de didéoxynucléotides. La détermination de la séquence d'ADN est possible en ordonnant les fragments selon leur taille et en identifiant le didéoxynucléotide qui termine chacun d'entre eux. La séparation des fragments est effectuée par une électrophorèse par capillaire dans lequel les fragments les plus courts migreront plus loin que les plus longs. Les fragments sont ensuite passés dans un détecteur où un laser identifie les didéoxynucléotides grâce à leur signal fluorescent distinct. La génération d'un chromatogramme (Figure 1.15) permet la visualisation de la séquence finale.

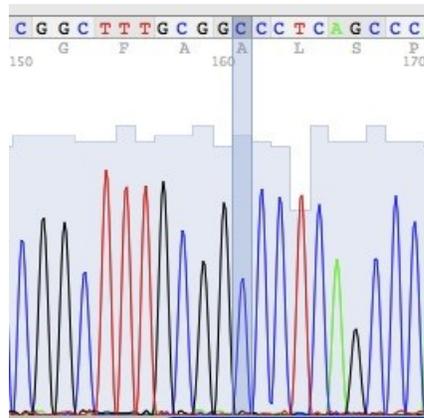


Figure 1.15. Section d'un chromatogramme d'un fragment d'ADN suite au séquençage de type Sanger

Chaque nucléotide séquencé est représenté par un pic coloré indiquant la nature du nucléotide (bleu pour une cytosine, noir pour une guanine, rouge pour une thymine et vert pour une adénine), ce qui permet de déterminer la séquence du fragment.

Source : Natasha Dargis, généré à l'aide du logiciel *Sequence Scanner* v.1.0 (ABI)

La méthode à terminaison de chaîne de Sanger peut analyser un nombre restreint de séquences de façon simultanée. Cette limitation représente un inconvénient important considérant l'essor de la génétique et l'intérêt croissant pour le séquençage de très larges portions du génome, voire du génome entier. Jumelé au coût élevé par paire de base, ce désavantage a entraîné le développement d'une nouvelle génération de techniques de séquençage d'ADN. Toutefois, la simplicité, la fiabilité et la capacité du séquençage Sanger à séquencer de longs fragments d'ADN (~900 pb) font de cette méthode une technique de choix pour la détermination de séquences d'ADN ciblées¹³⁸.

1.3.1.3.2 Séquençage de type nouvelle génération

Mises en marché au début des années 2000, les technologies de séquençage d'ADN nouvelle génération permettent la production simultanée de milliards de réaction de séquençage¹³⁹. De ces méthodes massivement parallèles résultent d'immenses quantités de données à un coût plus avantageux que le séquençage Sanger. D'ailleurs, le prix du séquençage d'un génome entier réalisé à l'aide d'une de ces méthodes ne cesse de diminuer. Le premier génome à être séquencé en entier sur un appareil nouvelle génération, celui du scientifique James Watson, a coûté 1 million de dollars américains en réactifs seulement¹³⁹. À l'heure actuelle, plusieurs plateformes offrent le séquençage du génome humain dans son intégralité pour aussi peu que 10 000 dollars américains¹⁴⁰.

Bien que plusieurs appareils de séquençage d'ADN nouvelle génération soient présentement disponibles, les techniques de préparation et d'amplification de l'ADN matrice, d'assemblage et d'alignement des séquences varient entre les appareils, rendant ainsi leur comparaison ardue¹³⁹. Ainsi,

le choix de l'appareil s'avère crucial et doit être réfléchi en regard de l'expérience planifiée et des avantages et des limitations inhérentes à chaque méthode.

Dans le cadre des travaux de recherche présentés dans ce mémoire, l'appareil de séquençage nouvelle génération Ion Torrent *Personal Genome Machine* (PGM) (Life Technologies) a été utilisé. Ce dernier est indiqué pour l'identification de variations génétiques dans des gènes ciblés¹⁴¹. Le Ion Torrent PGM utilise les variations de pH causées par l'incorporation d'un nucléotide au brin complémentaire pour déterminer la séquence d'ADN¹⁴⁰. Chaque fragment d'ADN simple brin est fixé sur une bille et amplifié plusieurs fois. Ces billes sont ensuite déposées sur une puce contenant des millions de puits, à raison d'une bille par puits. Tour à tour, la puce est submergée par des solutions contenant l'un des quatre nucléotides. Quand un nucléotide est incorporé au brin complémentaire d'un fragment suite au passage d'une solution, un ion H⁺ est libéré dans le puits. Comme chaque puits est doté d'un minuscule pH-mètre, la variation de pH due à la libération de l'ion H⁺ est détectée, envoyée à un ordinateur et enregistrée. La séquence de l'ADN peut donc être résolue en assemblant les données provenant de tous les puits contenus sur la puce.

Le Ion Torrent PGM est le premier appareil de séquençage nouvelle génération à utiliser une autre unité de mesure que la lumière afin de définir une séquence d'ADN. Il est également plus rapide et moins coûteux que plusieurs autres appareils¹⁴². Trois puces peuvent être utilisées avec le Ion Torrent PGM selon le type d'étude réalisé et la couverture des fragments d'ADN requise, ce qui assure une flexibilité dans le coût qui n'est pas présente chez les autres appareils. Le Ion Torrent présente cependant des inconvénients qui doivent être pris en compte par l'utilisateur, comme sa performance réduite lors du séquençage d'ADN ayant un contenu en GC supérieur à 65% et son taux d'erreur plus élevé¹⁴³.

1.3.1.4 Caractérisation de variations génétiques par génotypage d'ADN

Comme son nom l'indique, le génotypage est une méthode d'analyse des acides nucléiques qui permet de déterminer le génotype, c'est à dire la composition en allèles, d'un individu pour une ou plusieurs positions génétiques données. Le génotypage peut être utilisé à des fins diverses. Lorsqu'utilisé en pharmacogénomique, il permet de personnaliser les traitements pharmacologiques en fonction de la présence de variations génétiques précises chez les patients¹⁴⁴. En se basant sur l'hypothèse que les variations génétiques impliquées dans une pathologie sont présentes à une fréquence différente chez une population de patients atteints par rapport aux individus sains, le génotypage peut également servir à associer des variations génétiques à une pathologie particulière. Dans ce cas, le génotypage permet de calculer la fréquence allélique des variations génétiques chez des individus atteints de la maladie et des individus contrôles et de comparer ces fréquences¹³³.

Comme dans le cas du séquençage nouvelle génération, il existe plusieurs appareils de génotypage sur le marché, chacun d'eux utilisant une technique de discrimination des allèles et de détection des génotypes différentes¹⁴⁴. Pour ce projet de maîtrise, la méthode GoldenGate utilisant l'appareil de génotypage BeadXpress (Illumina) a servi à déterminer les génotypes des individus atteints de BVA et des individus contrôles provenant d'une population canadienne-française. Le BeadXpress utilise la fluorescence rouge et verte afin de déterminer la composition allélique de chaque individu pour une variation génétique testée¹⁴⁵. Pour ce faire, la région de l'ADN contenant la variation génétique testée est tout d'abord amplifiée à l'aide de trois amorces à ADN (Figure 1.16). Deux amorces allèle-spécifique ayant une séquence se terminant au niveau du nucléotide impliqué dans la variation génétique s'hybrident à l'ADN. Chacune de ces deux amorces est couplée à une fluorescence de couleur différente. Une troisième amorce contenant une séquence de reconnaissance s'hybride de l'autre côté de la variation génétique. Suite à l'amplification, les fragments d'ADN sont liés à des billes grâce à leur séquence de reconnaissance. Les billes sont finalement reconnues par un lecteur et un laser détecte la couleur de la fluorescence. La détection d'une forte fluorescence rouge ou verte indique que l'individu est homozygote pour l'allèle commun ou rare, tandis qu'une fluorescence mixte (rouge et verte) représente un individu hétérozygote pour la variation génétique.

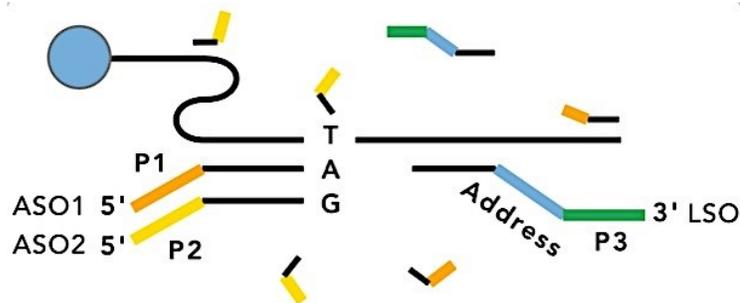


Figure 1.16. Schéma représentant l'hybridation des trois types d'amorces à l'ADN matrice du génotypage à l'aide de la technologie GoldenGate et de l'appareil BeadXpress

ASO, amorce allèle-spécifique; LSO, amorce locus-spécifique contenant la séquence de reconnaissance (address); P1, amorce 1; P2, amorce 2; P3, amorce 3.

Figure adaptée de *Technical Note: SNP genotyping – GoldenGate genotyping with VeraCode technology* de la compagnie Illumina

(http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_veracode_goldengate_genotyping.pdf)

1.3.2 Arguments en faveur de l'existence d'une composante génétique dans le développement de la BVA

1.3.2.1 Études de jumeaux

Les études de jumeaux sont utilisées fréquemment en génétique et sont basées sur le concept que les jumeaux monozygotes (ou identiques, provenant du scindement d'un seul ovule fécondé) ont un génome pratiquement identique en tous points. Les études de jumeaux dites «classiques» permettent de vérifier si une pathologie ou un trait est retrouvé plus fréquemment chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes (ou fraternels, dont les génomes diffèrent tout autant que ceux d'individus non-jumeaux d'une même fratrie). Ces études visent à démontrer l'existence d'une composante génétique causant le trait étudié ou augmentant les risques de le développer.

Tout en ne perdant pas de vue que les grossesses multiples sont plus sujettes aux complications gestationnelles, l'incidence des anomalies cardiaques congénitales est plus élevée chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes, les enfants issus de grossesses mono-fœtales ainsi que la population générale^{146,147}. Quelques études de cas faisant état de jumeaux monozygotes (en majorité de sexe masculin) tous deux atteints de BVA et présentant des manifestations cliniques et des types de bicuspédie similaires sont également recensées¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, ce qui constitue un argument en faveur d'une composante génétique pour la BVA.

Toutefois, une discordance dans le phénotype est observable chez les jumeaux monozygotes et la BVA n'y fait pas exception; une paire de jumeaux américains, l'un atteint de BVA et l'autre du syndrome d'hypoplasie du cœur gauche ont été décrits¹⁵¹. Dans le cadre de certaines pathologies, telles que l'obésité ou l'Alzheimer, la discordance chez les jumeaux monozygotes permet d'évaluer l'impact de l'environnement sur le développement de la maladie. Dans le contexte d'anomalies congénitales comme la BVA, la signification de la discordance est incertaine; on attribue ces rares événements à des mutations chez l'un des jumeaux ou à un degré différent de méthylation de l'ADN survenus *in utero*¹⁵².

1.3.2.2 Études de familles

Si peu de jumeaux monozygotes atteints de BVA sont répertoriés, les études de familles démontrant une agrégation de cas de BVA sont en revanche beaucoup plus abondantes. En 1972, alors que le docteur Victor McKusick rapporte pour la première fois le cas d'un père et de son fils tous deux atteints de BVA, il présume que la prévalence relativement élevée de la malformation congénitale explique l'occurrence de la pathologie chez deux membres d'une même famille¹⁵³.

La validité de cette hypothèse est toutefois mise en doute quelques années plus tard, lorsque l'investigation de 41 patients avec BVA et leurs quelques 200 proches au premier degré révèle une prévalence de maladies valvulaires aortiques de 21%¹⁵⁴. Au moins six des 41 familles examinées (14,6%) présentaient plus d'un membre affecté. Bien qu'il soit improbable que tous les individus considérés comme atteints dans cette étude soient porteurs d'une valve aortique bicuspide, cette observation représente un point tournant en génétique de la BVA.

Les études de familles subséquentes sur la BVA¹⁵⁵⁻¹⁶³, certaines examinant une seule famille et d'autres jusqu'à 100, corroborent les résultats précédents en observant une prévalence familiale de la BVA allant de 18 à 29%. Ces études démontrent ainsi une évidente agrégation familiale de la pathologie. Chez 50 familles regroupant plus de 300 individus, l'héritabilité de la BVA a même été estimée à 89%, signifiant que dans cette étude, la pathologie semble majoritairement se transmettre de façon génétique¹⁶⁰. La BVA affecte particulièrement les proches au premier degré d'un patient atteint. En effet, 4 à 9% des parents, frères, sœurs et enfants d'un individu atteint de BVA en sont également touchés^{158,160,163}, ce qui représente une prévalence beaucoup plus élevée que celle observée dans la population générale (environ 1%).

Manifestement, la BVA semble présenter une étiologie en partie génétique mais son mode de transmission n'est pas encore élucidé. Le modèle autosomal dominant a été évoqué par plusieurs études de familles^{154,158,162} mais à ce jour, aucun gène ne peut à lui seul expliquer l'héritabilité de la BVA. L'hétérogénéité phénotypique et le patron d'héritabilité à pénétrance incomplète de la BVA constituent des obstacles à l'élucidation de son mode de transmission.

1.3.3 Gènes candidats pour expliquer la composante génétique de la BVA

1.3.3.1 *NOTCH1*

Le gène *NOTCH1* encode l'un des quatre récepteurs transmembranaires faisant partie de la voie de signalisation cellulaire Notch. Suivant la liaison d'un ligand, le récepteur NOTCH1 subit deux clivages enzymatiques qui libèrent son domaine intracellulaire. Ce dernier est relocalisé dans le noyau cellulaire et y forme un complexe avec des protéines nucléaires afin de réguler la transcription génique. Selon les types cellulaires, NOTCH1 et la voie de signalisation à laquelle il appartient sont impliqués dans plusieurs processus essentiels au développement et au maintien de l'organisme tels que la prolifération^{164,165}, l'apoptose^{164,166}, la différenciation cellulaire^{164,165} et la transition épithélio-mésenchymateuse¹⁶⁷. Lors de la cardiogenèse, le récepteur NOTCH1 assure notamment la prolifération et la différenciation des cardiomyocytes^{168,169} et la transition épithélio-mésenchymateuse qui amorce la formation des valves cardiaques^{170,171 172-174}. Des variations génétiques dans le gène

NOTCH1 ont d'ailleurs été associées au syndrome d'hypoplasie du cœur gauche¹⁷⁵ et à la coarctation de l'aorte¹⁷⁶.

Le récepteur NOTCH1 est également impliqué dans le processus menant à la calcification des feuillets valvulaires aortiques. En effet, les différentes composantes de la voie Notch sont exprimées au niveau des feuillets et leur réduction ou leur suppression accélère le processus de calcification¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Une diminution de l'expression protéique de NOTCH1 est aussi enregistrée dans les foyers de calcification de valves aortiques humaines par rapport aux régions non calcifiées¹⁷⁹. Des variations génétiques localisées dans le gène *NOTCH1* chez des patients atteints de sténose aortique calcifiante sévère ont également été identifiées¹⁸⁰.

Le gène *NOTCH1* est présentement le candidat le plus sérieux permettant d'expliquer la BVA et sa progression en dysfonction valvulaire et aortique. *NOTCH1* a été associé à la BVA pour la toute première fois en 2005, alors que le docteur Vidu Garg identifie deux variations génétiques (R1108X et H1505del) dans ce gène chez deux larges familles multigénérationnelles¹⁶¹. Dans chaque famille, les variations génétiques d'intérêt ségrégaient avec la présence de calcification valvulaire et de cardiopathies congénitales (incluant la BVA) alors qu'elles étaient absentes chez les membres non affectés et chez plus de 1000 patients contrôles. Depuis, de nombreuses variations génétiques dans le gène *NOTCH1* ont été identifiées chez des familles ainsi que chez des individus non apparentés atteints de BVA avec ou sans phénotypes concomitants tels que la sténose aortique calcifiante^{176,181,182}, l'insuffisance aortique^{181,182}, l'anévrisme de l'aorte thoracique¹⁸¹⁻¹⁸⁴ et la coarctation de l'aorte^{176,182,185,186}. Cependant, les variations génétiques localisées dans ce gène ne sont pas systématiquement retrouvées chez tous les individus ou les familles atteintes de BVA¹⁶², ce qui témoigne de la complexité de la pathologie et qui suggère l'implication de gènes additionnels dans la pathogenèse de la BVA.

1.3.3.2 *AXIN1/PDIA2*

La protéine *axis inhibitor 1* (AXIN1), encodée par le gène du même nom, est une composante importante de la voie de signalisation cellulaire Wnt qui contrôle la prolifération et la différenciation cellulaires. Comme la signalisation Wnt est fréquemment altérée dans le cancer et que AXIN1 est un régulateur négatif de cette voie, AXIN1 est considérée comme une protéine suppresseur de tumeurs. Des variations génétiques localisées dans ce gène sont d'ailleurs associées aux cancers du cerveau¹⁸⁷, colorectaux¹⁸⁸, hépatiques^{189,190} et gastro-intestinaux¹⁹¹. Des études menées chez les animaux ont démontré que la voie Wnt, et plus spécifiquement Axin1, régulent entre autres la formation de l'axe dorsal-ventral¹⁹² et du cœur lors de l'embryogenèse^{193,194}. Des altérations dans Axin1 mènent

notamment à une prolifération anormale des replis endocardiques (les précurseurs des valves), à des défauts de plicature du tube cardiaque ainsi qu'à l'absence de valves cardiaques chez des embryons de poissons-zèbre¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Le gène *protein disulfide isomerase family A, member 2 (PDIA2)* code pour une enzyme résidente du réticulum endoplasmique qui contribue au repliement des protéines. D'abord identifiée dans le pancréas murin et humain, on sait maintenant que la protéine PDIA2 est présente dans le système digestif, les glandes surrénales et le système reproducteur mâle chez la souris¹⁹⁷ et au niveau du cerveau chez l'humain¹⁹⁸. Outre sa fonction de protéine chaperonne, on lui reconnaît un rôle dans l'auto-immunité^{199,200} et dans la réponse au stress oxydatif du réticulum endoplasmique²⁰¹. En effet, la conformation et l'activité enzymatique de la protéine PDIA2 sont régies par l'oxydoréduction. Lors d'un stress oxydatif, le niveau de PDIA2 en conformation dimérique augmente et l'activité chaperonne de la molécule est décuplée par rapport à sa forme monomérique, la conformation prédominante dans un milieu réducteur. À l'exception d'une augmentation marquée des niveaux protéiques de PDIA2 dans des artères coronaires humaines contenant des plaques d'athérosclérose²⁰², très peu d'information concernant l'implication de PDIA2 dans le développement et le maintien du système cardiovasculaire ont été recensées. Toutefois, une expression plus élevée du gène *PDI* a été enregistrée dans les régions de cœurs humains touchées par un infarctus du myocarde par rapport aux régions non affectées par l'infarctus²⁰³. Une corrélation inverse entre l'expression protéique de PDI et les niveaux d'apoptose des cardiomyocytes autant chez l'humain que chez des modèles murins et cellulaires a aussi été remarquée^{203,204}. Considérant que le gène *PDI* fait partie de la même famille que *PDIA2* et qu'il existe une forte homologie de structure et de fonction entre les protéines encodées par ces gènes²⁰⁵, ces études suggèrent que *PDI* (et possiblement *PDIA2*) protège le cœur en situation de stress.

À ce jour, la seule indication permettant de relier les gènes *AXIN1* et *PDIA2* à la BVA consiste en un haplotype de neuf variations génétiques identifié dans une étude pangénomique²⁰⁶ couvrant la région chromosomique occupée par ces deux gènes. Les auteurs de cette étude ont mis à profit quatre stratégies d'analyse distinctes afin d'identifier les variations génétiques les plus pertinentes chez 68 patients atteints de BVA et plus de 800 patients contrôles. Grâce à ces stratégies intégrant entre autres des données génétiques provenant de publications antérieures sur la BVA et les anévrismes de l'aorte thoracique ascendante, les auteurs ont pu associer ce bloc haplotypique à la BVA. Bien que la majorité des variations génétiques de l'haplotype soient localisées dans le gène *AXIN1*, les variations dans le gène *PDIA2* démontraient une association plus forte avec la BVA, rendant difficile l'identification du gène dirigeant cette association. Un important déséquilibre de liaison entre les variations génétiques et

les régions régulatrices des deux gènes a également compliqué l'analyse plus précise de cette région d'intérêt.

1.3.3.3 EGFR

En tant que l'un des quatre récepteurs transmembranaires impliqués dans la voie de signalisation cellulaire portant son nom, le *epidermal growth factor receptor* (EGFR) est un élément pivot de l'homéostasie cellulaire. La liaison d'un ligand à ce récepteur de type tyrosine kinase engendre une cascade de phosphorylation menant à l'expression de gènes favorisant la prolifération et la survie cellulaire²⁰⁷. D'ailleurs, des niveaux élevés de EGFR sont retrouvés dans plusieurs types de cancer et le dérèglement de la voie de signalisation est associé à la formation de métastases²⁰⁸.

Si aucune association directe entre le gène *EGFR* et la BVA n'a été identifiée à ce jour, on sait toutefois que ce gène est essentiel à la morphogenèse de la valve aortique car la diminution ou l'absence de son expression chez la souris cause systématiquement une hyperplasie des feuillets des valves semi-lunaires^{36,209,210}. Des déficiences similaires sont retrouvées chez les souris présentant une absence de *heparin-binding EGF-like growth factor* (un ligand de EGFR)²¹¹ ou une inactivation de la phospholipase C epsilon (un effecteur de la cascade EGFR)²¹². Cet épaissement des feuillets valvulaires, dû à une prolifération inhabituelle des cellules mésenchymateuses, est souvent accompagné de sténose aortique calcifiante, d'insuffisance aortique, de fibrose et/ou d'hypertrophie cardiaque selon le modèle murin.

1.3.3.4 ENG

Codant pour un récepteur transmembranaire faisant partie de la voie de signalisation cellulaire *transforming growth factor beta* (TGF- β), le gène *endoglin* (*ENG*) est responsable de plus de la moitié des cas de télangiectasie hémorragique héréditaire de type 1²¹³. Aussi connue sous le nom de maladie de Rendu- Osler- Weber, cette pathologie se caractérise par des anomalies vasculaires se traduisant en hémorragies et saignements fréquents. Le gène *ENG* a été abondamment étudié dans le développement vasculaire et cardiaque chez le poulet²¹⁴, la souris^{215,216} et l'homme^{217,218}. Notamment, on sait que *ENG* contribue à la transition épithélio-mésenchymateuse, un processus essentiel de l'embryogenèse au niveau du cœur et des valves cardiaques²¹⁹. Des embryons de souris exprimant seulement une version tronquée de la protéine ENG décèdent *in utero* et présentent des anomalies cardiaques telles que des ventricules élargis et un tronc artériel anormalement dilaté²¹⁵. La protéine ENG est présente dès les premières semaines de l'embryogenèse chez l'humain et est localisée au niveau du cœur et de l'endothélium des vaisseaux sanguins²¹⁷. Dans la région cardiaque, les niveaux de ENG s'élèvent graduellement jusqu'à atteindre leur apogée vers la sixième semaine de gestation (au moment de la formation des valves) dans les cellules de l'endocarde et les cellules

mésenchymateuses des replis endocardiques. Suite à la maturation des valves, une diminution de ENG est enregistrée.

Le rôle de *ENG* dans les maladies cardiaques congénitales est encore incertain. D'une part, le patron d'expression protéique de ENG chez des fœtus humains atteints de malformations cardiaques semble diminué et même absent dans certains tissus cardiaques par rapport à des fœtus non atteints²¹⁸. D'autre part, une augmentation des niveaux d'ENG dans le sang de cordon est observée chez des fœtus atteints de maladies cardiaques congénitales par rapport à des fœtus non atteints²²⁰. Relativement à la BVA, une région composée de huit variations génétiques dans le gène *ENG* a aussi été associée à la BVA et ce, dans la même étude ayant décelé un lien entre les gènes *AXIN1* et *PDIA2* et la BVA²⁰⁶. Ce locus est principalement mené par la variation génétique T343T (rs3739817) qui démontre une forte association avec la BVA. Malgré le fait que cette variation génétique n'altère pas la séquence protéique de ENG, les auteurs émettent l'hypothèse qu'elle pourrait affecter la structure secondaire de la molécule ou être en forte corrélation avec une variation non incluse dans leur étude.

1.3.3.5 *GATA5*

La protéine générée par le gène *GATA5* est un facteur de transcription essentiellement exprimé dans le cœur en développement de nombreux modèles animaux²²¹. Il est présent très tôt durant l'embryogenèse au niveau de l'endocarde et contribue à sa morphogenèse²²²⁻²²⁴. D'ailleurs, la réduction de *Gata5* dans des cellules murines en culture mène à l'interruption de la différenciation des précurseurs cardiogéniques en cellules de l'endocarde²²³. De façon similaire, la délétion de deux exons du gène *Gata5* chez la souris résulte en une déféctuosité de différenciation des cellules endocardiques sans toutefois porter atteinte à leur prolifération²²⁵. D'abord considéré comme spécifique à l'endocarde²²⁶, on sait maintenant que *GATA5* est également retrouvé dans le myocarde de l'embryon. Dans ce tissu, *GATA5* permet l'expression adéquate des gènes assurant la morphogenèse du myocarde²²⁷. Il contribue également à la différenciation^{228,229} et la prolifération²³⁰ des cardiomyocytes. Malgré son rôle essentiel dans le développement cardiaque, l'absence de *Gata5* chez les animaux n'est pas létale^{230,231} car *Gata5* interagit étroitement avec *Gata4* et *Gata6*, deux autres membres de la famille de facteurs de transcription *GATA*. Ces trois facteurs sont exprimés dans la région cardiaque chez l'embryon et partagent des fonctions similaires et des patrons d'expressions qui se chevauchent²²⁸. Par contre, la réduction ou la perte simultanée de deux de ces facteurs cause des anomalies cardiovasculaires et vasculaires sévères qui entraînent fréquemment la mort des embryons^{225,228,230}. Chez l'humain, près d'une quinzaine de variations génétiques localisées dans le gène *GATA5* ont été identifiées chez des patients Chinois atteints de diverses affections cardiaques

congénitales, dont les communications interauriculaires²³² et interventriculaires²³²⁻²³⁴, la fibrillation auriculaire²³⁵, la tétralogie de Fallot^{236,237} et la coarctation de l'aorte²³².

L'association entre le gène *GATA5* et la BVA a été mise en évidence chez des souris porteuses d'une délétion du gène²²⁵. En effet, la BVA était retrouvée chez 25% des animaux atteints de cette délétion, par rapport à 3% chez les animaux normaux. Un examen plus détaillé a permis de détecter que la BVA était toujours de type R-NC chez ces animaux. Chez l'humain, un peu moins d'une dizaine de variations génétiques dans *GATA5* ont été reliées à la BVA^{185,238,239}. Cependant, ce ne sont pas toutes les études qui rapportent la présence de variations génétiques dommageables dans le gène *GATA5*¹⁸².

1.3.3.6 *NKX2-5*

Tout comme les autres candidats pressentis pour expliquer la BVA, le gène codant pour le facteur de transcription *NK2 transcription factor related, locus 5 (NKX2-5)* est impliqué dans la formation du cœur et des vaisseaux sanguins²⁴⁰. Chez les souris, l'absence de ce facteur de transcription se traduit par une cardiogenèse et un développement du système vasculaire anormaux qui mènent à la mort de l'embryon^{241,242}. Son altération ou sa diminution chez la souris, le poisson-zèbre et le xenopus résulte en un large éventail de phénotypes cardiaques comprenant les communications interauriculaires²⁴³⁻²⁴⁵ et interventriculaires²⁴⁵, les déficiences de conduction²⁴⁴ et les anomalies des valves atrio-ventriculaires^{244,245}. Bien que relativement rares (de 3 à 5% environ), les variations génétiques localisées dans le gène *NKX2-5* ont été exhaustivement décrites chez l'humain et sont associées à des phénotypes similaires à ceux observés chez les modèles animaux²⁴⁶⁻²⁵⁰. Par contre, ce ne sont pas toutes les études impliquant des individus atteints de malformations cardiaques congénitales qui ont identifié des variations génétiques causales dans *NKX2-5*^{175,251}.

Les souris ayant des niveaux de *NKX2-5* diminués présentent une fréquence de BVA beaucoup plus élevée (11,0%) que celle observée chez des souris contrôles (1,4%)²⁴³. Une première étude examinant des patients atteints de BVA avec anévrisme de l'aorte ascendante n'a relevé qu'une seule variation génétique dans la séquence codante du gène (E21E, rs2277923)²⁵². Cette variation était présente autant chez les patients atteints de BVA (5,3%) que les contrôles (33,3%). Bien que cette variation ait été identifiée à plusieurs reprises lors d'études sur les maladies cardiaques congénitales, particulièrement chez les Chinois^{249,253,254}, elle n'avait pas spécifiquement été détectée chez des patients atteints de BVA auparavant. Suivant cette première étude, deux autres variations génétiques dans le gène *NKX2-5* ont été identifiées chez des patients atteints de BVA, soit R25C chez une patiente présentant une BVA et une coarctation de l'aorte²⁵⁵ et K192X chez une famille multi-générationnelle composée de plusieurs membres affectés par la BVA, certains additionnés de sténose aortique calcifiante ou d'autres affections cardiaques²⁵⁶.

1.3.3.7 NOS3

Sécrété par plusieurs types cellulaires, l'oxyde nitrique est une molécule considérée comme protectrice du système cardiovasculaire grâce à son rôle dans la régulation du rythme cardiaque, sa capacité à limiter le remodelage suite à un infarctus²⁵⁷ et son rôle dans la réparation des lésions tissulaires²⁵⁸. La production de l'oxyde nitrique à partir de L-arginine est assurée par trois isoformes de l'enzyme oxyde nitrique synthase. L'oxyde nitrique produit par le gène *nitric oxide synthase 3 (NOS3)* au niveau des cellules endothéliales est un vasodilatateur qui participe activement à la croissance cellulaire, à l'apoptose et à l'angiogenèse²⁵⁹. Chez l'embryon de souris, *Nos3* est entre autres exprimé dans le myocarde ainsi que dans les cellules endothéliales des feuillets de la valve aortique en développement²⁶⁰. Chez la souris mature, l'expression de *Nos3* est limitée aux cellules endothéliales. Dans un modèle murin, l'absence de cette enzyme résulte en une augmentation marquée de la mortalité post-natale et une incidence élevée des communications interauriculaire et interventriculaire²⁶¹. À ce jour, seulement quelques variations génétiques dans le gène *NOS3* ont été associées aux malformations cardiaques congénitales chez l'homme²⁶²⁻²⁶⁴. Selon des études impliquant des cellules valvulaires aortiques de porc en culture, *Nos3* et l'oxyde nitrique semblent davantage associés au processus de calcification survenant chez la valve aortique qu'à la présence de défauts cardiaques²⁶⁵⁻²⁶⁷. L'inhibition de *Nos3* ou de l'oxyde nitrique accélère la calcification alors que leur présence dans les cellules ou le milieu de culture contribue à prévenir la transformation ostéogénique²⁶⁸.

Le lien entre le gène *NOS3* et la BVA a tout d'abord été postulé suite à la détection d'une BVA chez plus de 40% des souris déficientes pour ce gène²⁶⁰, puis corroboré par des études supplémentaires répertoriant une prévalence similaire de BVA chez le même modèle murin^{22,269}. Chez l'homme, *NOS3* semble surtout être un marqueur de la dilatation et de la formation d'anévrismes de l'aorte ascendante chez les patients atteints de BVA. La majorité des études détectent une diminution de l'expression génique et protéique de *NOS3* au niveau de la paroi de l'aorte ascendante chez les patients atteints de BVA ayant de larges diamètres aortiques²⁷⁰⁻²⁷². De la même façon, une hausse plasmatique de diméthylarginine asymétrique, un inhibiteur de l'enzyme oxyde nitrique synthase, est enregistrée chez les patients atteints de BVA et est reliée à plusieurs paramètres prédictifs de la dilatation de l'aorte ascendante²⁷³. Une variation génétique localisée dans le gène *NOS3* a d'ailleurs été associée au risque d'anévrismes chez une population souffrant de BVA²⁷⁴.

1.3.3.8 TGFBR2

Le gène *transforming growth factor beta type 2 receptor (TGFBR2)* code pour un récepteur transmembranaire de type sérine/thréonine kinase jouant un rôle clé au sein de la voie de signalisation

cellulaire TGF- β . Suite à la liaison des ligands TGF- β 1, 2 ou 3 à un complexe formé des récepteurs TGFBR1 et 2, cette voie favorise l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose et contribue à la suppression de tumeurs²⁷⁵. Cette cascade de signalisation cellulaire participe aussi à plusieurs étapes de la cardiogenèse, notamment la transition épithélio-mésenchymateuse, une étape importante de la formation des valves cardiaques²⁷⁶. Le gène *TGFBR2* a été associé plus spécifiquement à la séparation entre le tronc pulmonaire et l'aorte, la formation de l'arc aortique²⁷⁷ et le développement de l'endothélium vasculaire²⁷⁸. Chez des modèles murins, son absence se traduit par des déficiences embryonnaires létales du système vasculaire²⁷⁹, alors que sa suppression spécifique dans divers tissus cardiaques est caractérisée par des hémorragies²⁷⁸, des anomalies de séparation des ventricules²⁸⁰ et des défauts de l'aorte descendante²⁸¹. Chez l'homme, les variations dans le gène *TGFBR2* sont principalement reconnues pour leur rôle causal dans les syndromes de Marfan^{282,283} et de Loeys-Dietz²⁸³⁻²⁸⁸ ainsi que dans les anévrismes de l'aorte thoracique ascendante et abdominale²⁸⁹⁻²⁹². Elles ont également été associées aux arrêts cardiaques spontanés²⁹³, aux communications interventriculaires²⁹⁴ et aux maladies cardiaques congénitales²⁹⁵.

Tel que mentionné précédemment, la fréquence élevée de la BVA chez les individus diagnostiqués avec le syndrome de Loeys-Dietz suggère un fondement commun reliant ces deux pathologies. Certaines investigations enregistrent une hausse de TGF- β 1 dans les cellules musculaires lisses de l'aorte et le sérum de patients atteints de BVA par rapport aux individus non atteints de cette anomalie^{296,297}, mais ces constats ne font pas l'objet d'un consensus. D'autres études ne relèvent pas de différences de concentration de TGF- β 1 entre des valves bicuspides et tricuspides calcifiées²⁹⁸. Une baisse de TGF- β 1 est même détectée dans la couche musculaire de l'aorte de patients atteints de BVA comparativement aux patients ayant une valve aortique tricuspide²⁷². L'investigation du gène *TGFBR2* chez des patients atteints de BVA a permis d'identifier une poignée de variations génétiques dont la majorité n'a que peu ou pas d'impacts fonctionnels pouvant expliquer la pathogenèse de la BVA^{182,299}. Une variation génétique modifiant la séquence protéique de *TGFBR2* a été répertoriée chez une femme et son père présentant tous deux une BVA ainsi qu'une importante dilatation de l'aorte nécessitant une intervention chirurgicale³⁰⁰. Quelques variations génétiques ont aussi été identifiées chez un patient atteint de BVA et d'un anévrisme de l'aorte, et chez des individus présentant une sténose aortique calcifiante sévère sur une valve aortique à trois feuillets³⁰¹. Ces résultats laissent croire que la signalisation cellulaire engendrée par TGF- β varie selon le tissu et le phénotype des patients étudiés et que le gène *TGFBR2* pourrait, dans une faible mesure, contribuer au développement des complications valvulaires et aortiques chez les patients atteints de BVA.

1.3.3.9 Autres gènes

Il va sans dire que les neuf gènes détaillés ci-haut ne constituent pas une liste exhaustive des acteurs impliqués dans la morphogenèse de la valve aortique et du cœur. D'autres gènes sont très probablement impliqués dans la pathogenèse de la BVA, comme les gènes *A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17)*³⁰² et *t-box 20 (TBX20)*³⁰³, qui sont connus pour leur régulation de la formation des valves semi-lunaires chez des modèles murins. Une hausse de la fréquence de la BVA a été observée lorsque les gènes *activin receptor-like kinase-2 (ALK2)*³⁰⁴ et *matrin 3 (MATR3)*³⁰⁵ sont supprimés dans le cœur de souris en développement. Finalement, des études récentes investiguant la totalité des exons du génome de patients atteints de BVA ont également identifié de nombreux gènes candidats additionnels qui devront être considérés dans le futur^{185,306}. Parmi celles-ci, Martin et collègues³⁰⁶ se sont intéressés à l'exome complet de 17 individus d'une famille multigénérationnelle, dont trois étaient atteints de BVA et trois autres de diverses autres malformations cardiovasculaires. À l'aide de quatre stratégies d'analyse génétique (étude des conjoints, étude des cousins, étude de famille nucléaire et association familiale) les auteurs ont identifié trois variations mise en évidence par au moins deux de ces stratégies qui pourraient potentiellement augmenter la susceptibilité de développer la BVA dans cette famille.

1.3.4 Limitations des études précédentes en génétique de la BVA et obstacles à l'avancement des connaissances

Malgré le fait que les connaissances sur la BVA et sa composante génétique se soient précisées au cours des dernières années, de nombreux facteurs ont compliqué le travail des chercheurs. Le plus important de ces facteurs est certainement le manque de puissance statistique, intrinsèquement lié à la faible prévalence de la BVA dans la population. En effet, les études antérieures en génétique de la BVA ont souvent été réalisées avec des tailles d'échantillon inférieures à 50 patients, ce qui a limité la découverte de gènes et de variations génétiques associés à cette malformation. L'hétérogénéité des phénotypes associés à la BVA et son mode de transmission compliquent davantage l'interprétation des résultats obtenus et comptent parmi les plus grandes difficultés à surmonter. Le manque flagrant de modèles animaux pour la BVA constitue également une limitation qui affecte la progression des connaissances. Heureusement, les études les plus récentes comportent un plus grand nombre de patients et les efforts de collaboration internationale du *Bicuspid aortic valve Consortium* (<http://www.bav-con.org>, dont notre équipe de recherche fait partie) permettront de pallier certaines limitations décrites ci-dessus en constituant une cohorte composée de milliers de patients atteints de BVA exhaustivement caractérisés qui sera utilisée afin de mener des études génétiques futures.

Chapitre 2 Objectifs et hypothèses

Considérant que la cause de la BVA est inconnue et que sa composante génétique est incertaine, l'objectif général visé par ce projet de maîtrise consiste en l'identification de variations génétiques associées à la BVA dans la population canadienne-française. Cet objectif général sera spécifiquement atteint en détectant des variations génétiques potentiellement pathogéniques dans neuf gènes précédemment associés à la BVA chez l'humain ou les modèles animaux (*NOTCH1*, *AXIN1*, *PDIA2*, *EGFR*, *ENG*, *GATA5*, *NKX2-5*, *NOS3* et *TGFBR2*). Les fréquences de ces variations ainsi que d'autres provenant d'études précédentes sur la BVA seront comparées dans une étude de type cas-contrôle. De plus, considérant que la BVA affecte trois fois plus d'hommes que de femmes, les fréquences des variations génétiques seront également comparées entre les deux sexes afin d'identifier des différences génétiques pouvant expliquer cette disproportion.

L'hypothèse à l'origine de ces travaux de recherche repose sur trois énoncés, soit :

- 1) des variations génétiques seront associées à la BVA chez les Canadiens français;
- 2) certaines variations génétiques associées à la BVA chez les Canadiens français auront déjà été identifiées chez des patients atteints de BVA dans différentes populations alors que d'autres n'auront jamais été associées à la maladie auparavant et seront uniques aux Canadiens français;
- 3) les variations génétiques associées à la BVA chez les hommes ne seront pas mêmes que celles associées à la BVA chez les femmes.

Chapitre 3 Matériel et méthodes

3.1 Sujets à l'étude

Ce projet de recherche fut réalisé avec des échantillons sanguins provenant de 945 Canadiens français non apparentés avec ou sans BVA admis en chirurgie à l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec – Université Laval (IUCPQ) entre 2000 et 2014. Le consentement libre et éclairé de tous les patients fut recueilli par écrit et le projet fut approuvé par le comité d'éthique de la recherche de l'IUCPQ.

3.1.1 Sujets atteints de BVA

Trois cent trente-neuf individus atteints de BVA admis en vue de subir leur première chirurgie de remplacement valvulaire aortique furent recrutés dans le cadre de ce projet de recherche. La présence de BVA fut confirmée par le chirurgien cardiaque au moment de la chirurgie. Les individus atteints de BVA ayant subi une chirurgie cardiaque antérieure furent exclus de l'étude.

3.1.2 Sujets contrôles

Un total de 606 patients présentant une valve aortique à trois feuillets furent recrutés pour ce projet de recherche. De ceux-ci, 480 ont été admis pour un pontage aorto-coronarien et démontraient une valve aortique morphologiquement normale exempte de sténose calcifiante à l'échocardiographie préopératoire. Les 126 autres sujets contrôles ont été recrutés suite à leur admission pour un remplacement valvulaire aortique électif dû à une sténose aortique calcifiante sévère. Les individus ayant des antécédents de chirurgie cardiaque, de pathologie touchant les autres valves du cœur ou atteints d'insuffisance aortique modérée ou sévère ne furent pas inclus dans ce projet de recherche.

3.2 Extraction d'ADN à partir du sang

La couche leucocytaire des échantillons sanguins fut collectée et conservée à -80°C par la banque de tissus de l'IUCPQ. L'ADN génomique des 945 participants fut extrait à partir de cette fraction sanguine à l'aide de la trousse commerciale QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN). La concentration et la qualité (ratio d'absorbance 260/280nm) de l'ADN furent par la suite évaluées aux ultraviolets avec le spectrophotomètre Nanovue Plus (GE Healthcare). Pour plus de précision, la quantité d'ADN double brin fut mesurée par fluorescence Picogreen (Invitrogen) à l'aide du fluorimètre Synergy HT (Biotek). Les échantillons ayant une concentration d'ADN inférieure à 45ng/μL furent évaporés en utilisant le CentriVap (LabConco) jusqu'à l'obtention d'une concentration minimale de 45ng/μL. Les ADN furent entreposés à une température de -80°C.

3.3 Détection de variations génétiques par séquençage d'ADN de type nouvelle génération

L'identification de variations génétiques localisées dans les neuf gènes d'intérêt a été effectuée chez un sous-groupe homogène de 48 patients atteints de BVA. Ces patients ne présentaient pas de coarctation de l'aorte, d'anévrisme de l'aorte ascendante et/ou d'insuffisance aortique modérée ou sévère et étaient représentatifs de l'ensemble des 339 patients atteints de BVA. Des amorces couvrant la séquence d'ADN codante, les régions 3' et 5' non traduites (UTR) et les 1000 paires de nucléotides de la région promotrice en amont de chacun des neuf gènes ont été développées en utilisant l'outil informatique Ion AmpliSeq *Designer* v.3.0 (version du génome hg19, Life Technologies). Le séquençage d'ADN a été réalisé avec l'appareil Ion Torrent PGM (Life Technologies) disponible au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. Dans le cadre de ce projet de recherche, les variations génétiques ont été considérées comme nouvelles si elles n'étaient pas répertoriées dans les bases de données suivantes : *Single nucleotide polymorphisms database* (dbSNP, version 138), *1000 Genomes Project* (phase 3), *Exome Aggregation Consortium* (ExAC, v.0.3) ou *Exome Variant Server* (EVS, version ESP6500 SI-V2).

3.4 Estimation de l'impact des variations génétiques à l'aide d'outils bio-informatiques

Afin d'estimer les perturbations fonctionnelles potentiellement engendrées par les variations génétiques identifiées par le séquençage d'ADN nouvelle génération, ces dernières ont été évaluées *in silico* (c'est-à-dire à l'aide d'outils bio-informatiques).

3.4.1 Combined Annotation Dependant Depletion

Combined Annotation Dependant Depletion (CADD)³⁰⁷ est un outil bio-informatique récent (2014) qui intègre l'information fonctionnelle, structurale et évolutive provenant de 63 outils ou combinaisons d'outils génétiques et bio-informatiques. Suite à la compilation de ces informations, CADD fournit un score qui renseigne sur le caractère délétère de chaque variation génétique, qu'elle soit située dans une région codante du génome ou non. Plus ce score est élevé, plus la variation génétique est considérée comme étant potentiellement délétère. Par exemple, une variation génétique ayant un score CADD supérieur ou égal à 10 fait partie du 10% des altérations les plus délétères pouvant survenir dans le génome humain, alors qu'une variation génétique à laquelle on attribue un score supérieur ou égal à 20 est comprise dans le 1% des altérations les plus dommageables. Bien que le seuil du score CADD permettant de séparer les variations génétiques inoffensives de celles potentiellement dommageables soit arbitraire et laissée à la discrétion de l'utilisateur, les développeurs

de CADD recommandent d'utiliser une valeur entre 10 et 15. Conformément à ces recommandations, les variations génétiques ayant un score CADD plus grand ou égal à 10 ont été considérées comme potentiellement délétères dans le cadre de ce projet de recherche.

3.4.2 Polymorphism Phenotyping v2

L'outil bio-informatique *Polymorphism Phenotyping v2* (PolyPhen-2)³⁰⁸ permet d'estimer l'impact fonctionnel des variations génétiques faux sens (qui changent un acide aminé dans la séquence d'une protéine). Pour chaque variation génétique faux-sens, PolyPhen-2 analyse l'homologie de séquence inter-espèces et le changement de structure occasionné par la variation pour attribuer un score situé entre zéro (inoffensif) et 1 (probablement dommageable). Malgré le fait que PolyPhen-2 soit inclus dans l'outil CADD, il est encore fréquemment utilisé de façon indépendante dans plusieurs publications scientifiques. De plus, il est recommandé d'employer plus d'une méthode *in silico* afin d'avoir un portrait complet de l'impact fonctionnel d'une variation¹³¹. L'utilisation de PolyPhen-2 dans le présent projet de recherche a donc servi à appuyer les résultats de CADD et à fournir un point de référence pour les scientifiques qui ne sont pas familiers avec CADD.

3.5 Validation des variations génétiques par séquençage d'ADN de type Sanger

Une sélection de 66 variations génétiques identifiées par le séquençage nouvelle génération a été re-séquencée par la méthode Sanger afin de valider les résultats obtenus grâce au séquenceur Ion Torrent PGM. Les nouvelles variations génétiques identifiées par le séquençage nouvelle génération, les insertions, délétions et variations faux sens ainsi que les variations silencieuses ou non codantes présentant un score CADD supérieur ou égal à 10 ont été incluses dans cette sélection. Les amorces permettant le séquençage des variations génétiques ont été développées à l'aide des outils bio-informatiques *Oligo Analyzer* (v.3.1, *Integrated DNA Technologies*) et *Primer 3* (v.0.4.0) et ont été créées par *Integrated DNA Technologies*. La validation a été réalisée à l'aide du séquenceur 3730xl *DNA Analyzer* (ABI) de la plateforme de séquençage et de génotypage des génomes du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL). Chaque variation génétique a été re-séquencée chez un à trois patients atteints de BVA, soit un homozygote pour l'allèle commun, un hétérozygote et un homozygote pour l'allèle muté.

3.6 Caractérisation de variations par génotypage d'ADN

Une sélection de variations génétiques provenant des résultats du séquençage d'ADN nouvelle génération (n=44) ou d'études antérieures en génétique de la BVA (n=45) fut génotypée par la méthode GoldenGate sur la plateforme VeraCode BeadXpress (Illumina) de notre laboratoire chez les

339 participants atteints de BVA et les 606 patients contrôles. Les données de génotypage ont été visualisées à l'aide du logiciel *Genome Studio* v2011.1 (Illumina).

Divers contrôles de la qualité ont été appliqués aux données de génotypage. Les variations génétiques pour lesquelles un génotype a été déterminé chez moins de 90% des échantillons d'ADN testés, celles déviant de l'équilibre d'Hardy-Weinberg sur la génétique des populations et celles ayant une distribution des génotypes impossible à analyser ont été retirées suite à ces contrôles de la qualité (Tableau 3). De façon similaire, les patients pour lesquels un génotype a été déterminé pour moins de 90% des variations génétiques testées ou qui démontraient une discordance entre le sexe inscrit au dossier médical et celui évalué lors du génotypage ont également été exclus des analyses (Tableau 4). Les contrôles de la qualité ont été réalisés avec le logiciel PLINK v.1.07³⁰⁹, à l'exception de la discordance de sexe, qui fut évaluée avec *Genome Studio*.

Tableau 3.1. Sommaire des contrôles de la qualité du génotypage relatifs aux variations génétiques

Paramètres	Nombre de variations génétiques exclues
Détermination du génotype chez <90% des individus testés (taux de détection) ¹	7
Déviations de l'équilibre de Hardy-Weinberg ($p < 0.0001$)	4
Distribution des génotypes impossible à analyser	2
Total	13

¹ *call rate* en anglais

Tableau 3.2. Sommaire des contrôles de la qualité du génotypage relatifs aux échantillons d'ADN

Paramètres	Nombre d'échantillons d'ADN exclus
Détermination du génotype pour <90% des variations génétiques testées (taux de complétion) ¹	34
Discordance au niveau du sexe	4
Total	38

¹ *completion rate* en anglais

Suite aux contrôles de la qualité, les fréquences d'allèles mineurs de 76 variations génétiques ont été comparées entre 323 patients atteints de BVA et 584 patients contrôles en utilisant un test du chi-carré. Les analyses ont également été réalisées chez les hommes et les femmes séparément. Les variations génétiques ayant une valeur-p inférieure ou égale à 0,05 ont été considérées statistiquement significatives.

Chapitre 4 *Identification of Gender-specific Genetic Variants in Patients with Bicuspid Aortic Valve*

Natasha Dargis, BSc^a, Maxime Lamontagne, MSc^a, Nathalie Gaudreault, BSc^a, Laura Sbarra, BSc^a, Cyndi Henry, MSc^a, Philippe Pibarot DVM, PhD^a, Patrick Mathieu, MD^a, Yohan Bossé, PhD^{a,b}.

^aCentre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (CRIUCPQ), Quebec City, QC, Canada

^bDepartment of Molecular Medicine, Laval University, Quebec City, QC, Canada

Corresponding author

Yohan Bossé, PhD

Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec

2725 chemin Ste-Foy, Building Y, Room Y-2106, Quebec City, QC, Canada (G1V 4G5)

Phone: +1 418.656.8711 (3725)

Fax: +1 418.656.4940

E-mail: Yohan.Bosse@criucpq.ulaval.ca

Running head: Gender-specific genetic variants in BAV

For grant support information, please refer to the acknowledgment section

Conflicts of interest: None

Résumé

La bicuspidie valvulaire aortique (BVA) est la malformation congénitale cardiaque la plus fréquente mais son étiologie est inconnue. Afin d'identifier des variations génétiques associées à la BVA, neuf gènes précédemment reliés à la malformation (*NOTCH1*, *AXIN1*, *EGFR*, *ENG*, *GATA5*, *NKX2-5*, *NOS3*, *PDIA2* et *TGFBR2*) ont été séquencés chez 48 patients atteints de BVA. Une sélection de 89 variations identifiées par séquençage ou provenant d'études précédentes a été génotypées chez 323 patients avec BVA et 584 contrôles. Une variation intronique dans le gène *EGFR* (rs17290301) est associée à la BVA. Différentes variations génétiques sont également associées à la BVA chez les hommes (*EGFR* rs533525993 et *TEX26* rs12857479) et les femmes (*NOTCH1* rs61751489, *TGFBR2* rs1155705 et *NKX2-5* rs2277923). Ces résultats constituent la première association entre le gène *EGFR* et la BVA chez les humains et supportent pour la première fois l'implication de variations génétiques spécifiques au sexe dans le développement de la BVA.

Abstract

Bicuspid aortic valve (BAV) is the most frequent congenital heart defect and has a male predominance of 3 to 1. A large proportion of patients develop valvular and aortic complications. Despite the high prevalence of BAV, its etiology and genetic origins remain elusive. The goal of this study was to identify genetic variants associated with BAV. Nine genes previously associated with BAV (*NOTCH1*, *AXIN1*, *EGFR*, *ENG*, *GATA5*, *NKX2-5*, *NOS3*, *PDIA2* and *TGFBR2*) were sequenced in 48 BAV patients using the Ion Torrent PGM. Pathogenicity of genetic variants was evaluated with the Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) framework. A selection of 89 variants identified by sequencing or in previous BAV genetic studies was genotyped and allele frequencies were compared in 323 patients with BAV confirmed at surgery and 584 controls. Analyses were also performed by gender. Nine novel and 19 potentially pathogenic variants were identified by next-generation sequencing and confirmed by Sanger sequencing, but they were not associated with BAV in the case-control population. A significant association was observed between an in silico-predicted benign *EGFR* intronic variant (rs17290301) and BAV. Analyses performed by gender revealed different variants associated with BAV in men (*EGFR* rs533525993 and *TEX26* rs12857479) and women (*NOTCH1* rs61751489, *TGFBR2* rs1155705 and *NKX2-5* rs2277923). In conclusion, these results constitute the first association between *EGFR* genetic variants and BAV in humans and support for the first time a possible role of gender-specific polymorphisms in the development of BAV.

Keywords: Bicuspid Aortic Valve, Calcific Aortic Valve Disease, Aortic Valve Stenosis, Next-Generation Sequencing

Introduction

Bicuspid aortic valve (BAV) is the most common congenital heart defect with a prevalence estimated at 1%.¹ Valvular and aortic complications such as calcific aortic valve stenosis (AVS) are frequent in BAV patients² and usually occur earlier in life compared to tricuspid aortic valves (TAV) patients.³ Between 30 to 50% of all patients undergoing surgical aortic valve replacement for AVS are affected by BAV.⁴ BAV is therefore a significant medical and economic burden that must be addressed. Despite the high prevalence of BAV, our understanding of its etiology and genetic origins is still fairly limited.⁵ *NOTCH1* is known as the most well-proven candidate gene for BAV and has been associated with both familial and sporadic forms of the defect in humans.^{6–9} However, deleterious genetic variants in *NOTCH1* are only detected in a minority of BAV patients.¹⁰ The contribution of additional genes including *AXIN1*,¹¹ *EGFR*,^{12,13} *ENG*,¹¹ *GATA5*,^{14,15} *NKX2-5*,¹⁶ *NOS3*,^{17,18} *PDIA2*¹¹ and *TGFBR2*^{19,20} have been suggested. The purpose of the present study was to identify potentially pathogenic genetic variants in these 9 genes and to assess the frequencies of these variants as well as other previously identified BAV-related variants in a case-control series of patients with and without BAV. This approach will complement other types of genetic studies to elucidate the inherited component of BAV.

Methods

A flowchart diagram outlining the main stages of this study is provided in Figure S1. Nine hundred and forty-five unrelated French Canadians with either BAV or TAV were recruited at the Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (Quebec City, Canada) between 2000 and 2014. The BAV subset consisted of 339 patients who underwent their first surgical aortic valve replacement. BAV phenotype was confirmed by the cardiac surgeon during the procedure and confirmed by pathological analyses of explanted tissues. BAV patients with previous cardiac surgery were excluded from the study. The TAV subset consisted of 606 patients including 480 that underwent isolated coronary artery bypass grafting with no signs of AVS at pre-operative echocardiography and 126 with severe AVS requiring aortic valve replacement. TAV patients with a history of previous cardiac surgery, disease involving other cardiac valves or presenting with moderate or severe aortic insufficiency were excluded. The study was approved by the local Research Ethics Board and all participants gave their written informed consent (REB #20771).

Genomic DNA was extracted from buffy coat using QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN). Total DNA concentration was measured by UV with Nanovue Plus spectrophotometer (GE Healthcare) and DNA quality was evaluated by the 260/280 nm absorbance ratio (≥ 1.8). Double stranded DNA quantification

was assessed by Quant-iT PicoGreen fluorescence (Invitrogen) with the Synergy HT fluorometer (Biotek).

Variants were identified by next-generation sequencing (NGS) in a homogeneous and representative sample of 48 participants from the BAV subset. These patients were not affected by coarctation of the aorta, ascending aortic aneurysm and moderate to severe aortic insufficiency. DNAs were sequenced at McGill University and Génome Québec Innovation Centre (Montreal, Canada) using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) (Life Technologies). An Ion AmpliSeq custom panel of primers covering the entire coding DNA sequence, 1,000 bp of the promoter region and both 3' and 5' untranslated regions (UTR) was designed for the 9 genes of interest (Ion AmpliSeq Designer version 3.0, reference genome hg19). The final panel covered 90% (53 kb) of the regions included in the initial design for a total of 333 amplicons ranging from 125 to 275 bp in length in 2 pools of 168 and 165 primer pairs, respectively. The Ion Torrent DNA libraries were prepared according to the manufacturer's instructions. Quantification of the libraries was performed using a Bioanalyzer High Sensitivity DNA kit (Agilent) and Quant-iT PicoGreen. Purification was achieved with Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Libraries were loaded on three 316 chips, each supporting 16 of the 48 BAV samples. The data generated was mapped to the hg19 genome. Variants were considered previously characterized if reported in dbSNP (build 138), 1000 Genomes Project (phase 3), Exome Aggregation Consortium (v.0.3) or Exome Variant Server (release ESP6500 SI-V2). Variants were considered novel if not listed in any of these databases.

To assess their pathogenicity, scaled scores from Combined Annotation Dependant Depletion (CADD) framework (C-scores) were obtained for all variants identified by NGS. CADD ranks single nucleotide variants, insertions and deletions (indels), coding or not, according to their deleteriousness.²¹ A C-score \geq 10 indicates that a particular variant is part of the top 10% most deleterious changes in the human genome and a C-score \geq 20 indicates the top 1%. The cut-off value to separate potentially pathogenic from harmless variants is arbitrary, but a C-score threshold value between 10 and 15 is recommended. In this study, variants with C-scores \geq 10 were considered potentially pathogenic. Missense variants were further evaluated with PolyPhen-2, a bioinformatics tool estimating the functional impact of variants according to their sequence homology throughout evolution.²² For any given variant, a score ranging from 0 (benign) to 1 (probably damaging) is generated by PolyPhen-2.

Sixty-six variants were selected for validation using Sanger sequencing. The selection consisted of every novel genetic variant identified by the NGS experiment (n=14 single nucleotide variants, 15 indels), previously characterized indels (n=9) and missense variants (n=20) as well as synonymous or

non-coding variants with C-scores \geq 10 (n=8). For each selected variant, at least 1 and up to 3 BAV patients were sequenced if available: 1 homozygous for the common allele, 1 heterozygous and 1 homozygous for the rare allele. Sequencing was performed using a 3730xl DNA Analyzer (ABI) at the Centre Hospitalier de l'Université Laval sequencing and genotyping platform (Quebec City, Canada). Primer sequences designed to validate the selected DNA variants are provided in Table S1. Non-validated variants were discarded from subsequent analyses.

The frequencies of 44 variants identified by NGS and 45 additional variants identified in previous BAV genetic studies were genotyped in 339 cases and 606 controls using the Illumina GoldenGate genotyping assay on the Illumina VeraCode and BeadXpress platform. All variants and the rationale for their selection are listed in Table S2. Clusters of genotyping data were generated by Illumina Genome Studio v2011.1 and quality controls were carried out with PLINK v1.07.²³ Clustering accuracy was assessed for the 37 variants for which Sanger sequencing data was available in the 48 BAV patients and clusters were manually adjusted as needed. Thirteen variants were excluded from further analyses following the quality controls; 7 had a genotype call rate $<$ 90%, 4 deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium (p-value $<$ 0.0001) and 2 had poor genotyping clusters. Thirty-eight patients were excluded because of low completion rate ($<$ 90%, n=34) or sex mismatch (n=4). A total of 323 cases and 584 controls were considered after all quality control filters. A rare *NOTCH1* missense variant resulting in an amino acid change from glycine to serine at position 152 (G152S, g.139417590 C>T) failed quality controls but was genotyped in 339 cases and 606 controls using an allele-specific PCR assay. Primer sequences created for this assay are listed in Table S3.

Minor allele frequencies of genotyped variants were compared between BAV and TAV patients using chi-square tests. Given the 3 to 1 male predominance in BAV, additional analyses were performed by gender. P-values \leq 0.05 were considered statistically significant.

Results

Demographic and clinical characteristics of the study populations following genotyping quality controls are presented in Table 1 (see Table S4 for characteristics stratified by gender). BAV patients were younger, had a higher proportion of men and a lower proportion of diabetes and hypertension than their TAV counterparts. BAV patients showed a larger aortic valve area compared to calcific AVS TAV patients. AVS was the most predominant valvulopathy in BAV patients.

A total of 217 genetic variants were identified across the 9 candidate genes using the Ion Torrent PGM, including 29 novel variants (mean coverage of 340x across all amplicons) (Figure S2; Table 2; Table

S5). Eighty-two variants were located in introns, 68 in exons (47 synonymous and 21 missense), 25 in 3'UTR, 14 in promoter regions, 3 in 5'UTR and 1 in downstream gene region. Seven indels were found in introns, 6 in 3'UTR, 9 in coding regions and 2 in promoter regions.

Forty-six of the 66 genetic variants (70%) selected for re-sequencing were validated (Table 2). All previously known variants (n=37) sent for re-sequencing were validated. Out of the 29 novel variants originally identified by NGS, 9 were confirmed. Novel variants were identified in *EGFR*, *GATA5*, *NKX2-5*, *NOS3*, *NOTCH1* and *TGFBR2*, but they were not considered deleterious (Table 3).

Nineteen previously characterized variants validated by Sanger sequencing were evaluated as potentially pathogenic by CADD (Table 4). The highest burden of deleterious variants was found in *NOTCH1*, where 7 variants identified by NGS had a C-score \geq 10. Among these was rare missense variant G152S, identified in 1 heterozygous BAV patient by NGS. This variant was evaluated as probably damaging by PolyPhen-2 (score of 0.969) and had a C-score of 19.74. *AXIN1*, *EGFR*, *ENG*, *GATA5* and *PDIA2* also carried previously known variants evaluated as potentially pathogenic (Table 4).

In this case-control population, *EGFR* intronic variant rs17290301 was the only genetic variant associated with BAV (Table 5). Originally identified in 1 BAV patient by NGS, this particular variant was evaluated as benign by CADD. The rare and potentially pathogenic *NOTCH1* G152S missense variant detected in 1 BAV patient by NGS was not associated with BAV (MAF=0.004 in BAV and 0.002 in TAV, p-value=0.357).

Gender-specific genetic variants associated with BAV were observed (Table 5). In men, rs12857479, a common and potentially damaging *TEX26* splice acceptor variant was associated with BAV. Rs533525993, a rare *EGFR* synonymous variant originally identified in 2 BAV patients by NGS and considered benign by CADD also reached significance in men. Both variants were more frequent in BAV compared to TAV male patients. In women, the most significant association was observed for *NOTCH1* rs61751489, a missense variant identified in 3 BAV patients by NGS. Although not evaluated as potentially pathogenic, this variant resulting in a V2285I substitution was more frequent in BAV compared to TAV patients. Two additional common variants were also more frequent in BAV compared to TAV women including the predicted benign intronic *TGFBR2* variant rs1155705 and the synonymous *NKX2-5* variant rs2277923 with a borderline C-Score. Both variants were identified in BAV patients (n=28 and 29, respectively) by NGS.

Discussion

In this study, 9 candidate genes previously associated with BAV in rodents or humans were sequenced in 48 surgically confirmed cases of BAV. Novel genetic variants were identified in *EGFR*, *GATA5*, *NKX2-5*, *NOS3*, *NOTCH1* and *TGFBR2*. Previously known variants in *AXIN1*, *EGFR*, *ENG*, *GATA5*, *NOTCH1* and *PDIA2* were evaluated as potentially pathogenic. Selected variants from this work and from the literature were genotyped in 323 BAV cases and 584 TAV controls to test for association with BAV. One *EGFR* variant was associated with BAV and gender-specific variants were identified in *TEX26* and *EGFR* in men and *NOTCH1*, *TGFBR2*, and *NKX2-5* in women. These results suggest a possible gender disparity in the pathophysiology of BAV.

Mice hypomorphic for epidermal growth factor receptor (*Egfr*) allele are characterized with a thickening of aortic valve cusps often leading to AVS.^{12,13} In the present study, we report for the first time genetic variants in *EGFR* associated with BAV in humans. The intronic *EGFR* variant (rs17290301) associated with BAV in this French Canadian study population has not been previously linked to BAV or any other pathology and is thought to have minimal regulatory function according to TRANSFAC.²⁴ The synonymous Y626Y *EGFR* variant (rs533525993) associated with BAV in men was only reported in a handful of healthy individuals from the Exome Aggregation Consortium. Located in exon 15, this variant falls within the extracellular portion of the receptor. Genetic variants in this exon have been identified in human gliomas and are shown to increase receptor phosphorylation levels and cell growth in vitro.²⁵

NOTCH1 is the most robust candidate gene associated with BAV.⁶ *NOTCH1* variants have been detected in sporadic BAV patients and families.⁷⁻⁹ In this case-control population, the most significant association was observed with a *NOTCH1* missense variant V2285I (rs61751489) in women. This variant was previously identified in BAV patients by Mohamed *et al.*⁷ but was overlooked because of its presence in unaffected individuals. The gender of the carriers was not reported. The rare and potentially pathogenic *NOTCH1* missense variant G152S was not significantly associated with BAV in this case-control population. To date, this variant was only reported in 2 apparently healthy individuals of African descent from the Exome Aggregation Consortium. The present study constitutes the first evidence of the existence of this potentially damaging variant in individuals of European descent and suggests a potential contribution of this variant in BAV.

Genetic variants in transforming growth factor receptor type II (*TGFBR2*) have been reported in conditions associated with BAV such as Marfan and Loeys-Dietz syndromes.²⁶ The investigation of *TGFBR2* in BAV patients in previous studies led to the detection of a small number of genetic variants, most of which are thought to be non-causal.^{8,19,20} The intronic *TGFBR2* variant (rs1155705) associated

with BAV in women in this case-control population is considered benign by CADD and has minimal regulatory function according to TRANSFAC.²⁴ However, it exhibited an intriguing gender-specific effect: the risk allele in women was the protective allele in men. This variant was reported in BAV patients by Foffa *et al.*,⁸ but the variant was not further analyzed because of its high prevalence. The gender of the carriers was not reported.

NK2 transcription factor related locus 5 (*NKX2-5*) is associated with a wide range of congenital heart defects, including BAV.²⁷ The synonymous E21E *NKX2-5* variant (rs2277923) associated with BAV in women in the present study was previously reported in 1 BAV patient with ascending aortic aneurysm by Majumdar *et al.*²⁸, but the gender of this patient was not reported. The variant was also identified in studies investigating congenital heart diseases, where it is thought to reduce the transactivation activity of *NKX2-5* by 20%.²⁹

Very little is known about testis expressed 26 (*TEX26*) other than its high expression in testis. The splice acceptor variant (rs12857479) associated with BAV in men in this case-control population was identified as a susceptibility variant for BAV in a recent whole exome sequencing of 1 pedigree including 3 members affected with BAV.³⁰ However, due to its high prevalence, it was not further analyzed. The high C-Score assigned to this variant and its greater minor allele frequency in BAV compared to TAV patients could indicate a possible role for *TEX26* in the development of BAV and related valvular and aortic disease in men.

This study has limitations. The heterogeneity of BAV phenotypes (calcific stenosis, insufficiency, dilatation) included in this study might have impaired the detection of BAV-related variants. On the other hand, the French Canadian population is known to be genetically homogenous. In addition, BAV phenotype was assessed by the cardiac surgeon and pathological analyses, which provide a more precise BAV diagnostic compared to cardiac imaging alone. The low frequencies of novel and potentially pathogenic variants detected in our study may explain their lack of association with BAV. Larger sample sizes of BAV patients will be required to assess the contribution of these rare variants.⁵ Finally, this study evaluated genetic variants in a small number of genes previously associated with BAV. More studies are warranted to evaluate a larger number of genes as well as the whole genome.

Using NGS and bioinformatics tools, we identified and evaluated the deleteriousness of genetic variants in 9 candidate genes for BAV. We investigated the most promising variants in a case-control series and discovered different genetic variants associated with BAV in men and women. Although functional studies must be conducted to determine if and how these variants are implicated in the molecular mechanisms underlying BAV, these results support for the first time a possible role of gender-specific

polymorphisms in the development or progression of BAV. In future case-control studies, researchers should consider stratifying BAV patients by gender and clinical phenotype to accurately reflect the genetic particularities inherent to each group. Ultimately, a better understanding of the genetic determinants of BAV will confirm whether routine genotyping screening for close relatives of affected individuals is indicated and in the long term may also help to predict disease progression and personalize treatments.

Conflicts of interest: None

Acknowledgments

We are grateful to all patients who accepted to be part of this study. We would also like to thank the IUCPQ biobank staff for their help with the biological specimens and Stéphanie Dionne for her valuable advices concerning the cardiac surgery database. Special thanks to Josée Vézina and Emilie Lavoie-Charland for their help and input throughout the study. The present study was funded by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP – 137058 and MOP - 102481) and the Heart and Stroke Foundation of Canada. N.D. has studentship grants from Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), Laval University and IUCPQ. ML is the recipient of a FRQS doctoral studentship. P.P. holds the Canada Research Chair in Valvular Heart Diseases. P.M. is the recipient of a FRQS Senior Research Scholar award. Y.B. was the recipient of a FRQS Junior 2 Research Scholar and holds a Canada Research Chair in Genomics of Heart and Lung Diseases. Funding sources were not involved in the study.

References

1. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1890–1900.
2. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process: A Review and Agenda for Research From the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group * Executive Summary: Calcific Aortic Valve Disease - 2011 Update. *Circulation* 2011;124:1783–1791.
3. Michelena HI, Desjardins VA, Avierinos JF, Russo A, Nkomo VT, Sundt TM, Pellikka PA, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. Natural history of asymptomatic patients with normally functioning or minimally dysfunctional bicuspid aortic valve in the community. *Circulation* 2008;117:2776–2784.
4. Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation* 2005;111:920–925.
5. Prakash SK, Bossé Y, Muehlschlegel JD, Michelena HI, Limongelli G, Corte A Della, Pluchinotta FR, Russo MG, Evangelista A, Benson DW, Body SC, Milewicz DM. A Roadmap to Investigate the Genetic Basis of Bicuspid Aortic Valve and its Complications. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:832–839.
6. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 2005;437:270–274.
7. Mohamed SA, Aherrahrou Z, Liptau H, Erasmi AW, Hagemann C, Wrobel S, Borzym K, Schunkert H, Sievers HH, Erdmann J. Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1460–1465.
8. Foffa I, Ait Ali L, Panesi P, Mariani M, Festa P, Botto N, Vecoli C, Andreassi MG. Sequencing of NOTCH1, GATA5, TGFBR1 and TGFBR2 genes in familial cases of bicuspid aortic valve. *BMC Med Genet* 2013;14:1–8.
9. Bonachea EM, Zender G, White P, Corsmeier D, Newsom D, Fitzgerald-Butt S, Garg V, McBride KL. Use of a targeted, combinatorial next-generation sequencing approach for the study of bicuspid aortic valve. *BMC Med Genomics* 2014;7:1–10.

10. Ellison JW, Yagubyan M, Majumdar R, Sarkar G, Bolander ME, Atkinson EJ, Enriquez-Sarano M, Sundt TM. Evidence of Genetic Locus Heterogeneity for Familial Bicuspid Aortic Valve. *J Surg Res* 2007;142:28–31.
11. Wooten EC, Iyer LK, Claudiamontefusco M, Hedgepeth AK, Payne DD, Kapur NK, Housman DE, Mendelsohn ME, Huggins GS. Application of gene network analysis techniques identifies AXIN1/PDIA2 and endoglin haplotypes associated with bicuspid aortic valve. *PLoS One* 2010;5:e8830.
12. Chen B, Bronson RT, Klamann LD, Hampton TG, Wang JF, Green PJ, Magnuson T, Douglas PS, Morgan JP, Neel BG. Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet* 2000;24:296–299.
13. Barrick CJ, Roberts RB, Rojas M, Rajamannan NM, Suitt CB, O'Brien KD, Smyth SS, Threadgill DW. Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6J but not 129S1/SvImJ mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H65–H75.
14. Laforest B, Andelfinger G, Nemer M. Loss of *Gata5* in mice leads to bicuspid aortic valve. *J Clin Invest* 2011;121:2876–2887.
15. Bonachea EM, Chang S-W, Zender G, LaHaye S, Fitzgerald-Butt S, McBride KL, Garg V. Rare GATA5 sequence variants identified in individuals with bicuspid aortic valve. *Pediatr Res* 2014;76:211–216.
16. Biben C, Weber R, Kesteven S, Stanley E, McDonald L, Elliott D a, Barnett L, Köentgen F, Robb L, Feneley M, Harvey RP. Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene *Nkx2-5*. *Circ Res* 2000;87:888–895.
17. Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ. Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2000;101:2345–2348.
18. Rajamannan NM. Oxidative-mechanical stress signals stem cell niche mediated *Lrp5* osteogenesis in *eNOS(-/-)* null mice. *J Cell Biochem* 2012;113:1623–1634.
19. Martín M, Rodríguez I, Palacn M, Ríos-Gómez E, Coto E. TGFBR2 gene mutational spectrum in aortic pathology. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:518–519.

20. Girdauskas E, Schulz S, Borger MA, Mierzwa M, Kuntze T. Transforming growth factor-beta receptor type II mutation in a patient with bicuspid aortic valve disease and intraoperative aortic dissection. *Ann Thorac Surg* 2011;91:e70–e71.
21. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 2014;46:310–315.
22. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248–249.
23. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, Bakker PI de, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559–575.
24. Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Prüss M, Reuter I, Schacherer F. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:316–319.
25. Lee JC, Vivanco I, Beroukhim R, Huang JHY, Feng WL, DeBiasi RM, Yoshimoto K, King JC, Nghiemphu P, Yuza Y, Xu Q, Greulich H, Thomas RK, Paez JG, Peck TC, Linhart DJ, Glatt K a., Getz G, Onofrio R, Ziaugra L, Levine RL, Gabriel S, Kawaguchi T, O’Neill K, Khan H, Liao LM, Nelson SF, Rao PN, Mischel P, Pieper RO, Cloughesy T, Leahy DJ, Sellers WR, Sawyers CL, Meyerson M, Mellinghoff IK. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS Med* 2006;3:2264–2273.
26. Attias D, Stheneur C, Roy C, Collod-Bérout G, Detaint D, Faivre L, Delrue MA, Cohen L, Francannet C, Bérout C, Claustres M, Iserin F, Khau Van Kien P, Lacombe D, Merrer M Le, Lyonnet S, Odent S, Plauchu H, Rio M, Rossi A, Sidi D, Steg PG, Ravaud P, Boileau C, Jondeau G. Comparison of clinical presentations and outcomes between patients with TGFBR2 and FBN1 mutations in marfan syndrome and related disorders. *Circulation* 2009;120:2541–2549.
27. Mcelhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with Congenital Heart Disease. *J Med Genet* 2003;42:1650–1655.

28. Majumdar R, Yagubyan M, Sarkar G, Bolander ME, Sundt TM. Bicuspid aortic valve and ascending aortic aneurysm are not associated with germline or somatic homeobox NKX2-5 gene polymorphism in 19 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:1301–1305.
29. Ouyang P, Saarel E, Bai Y, Luo C, Lv Q, Xu Y, Wang F, Fan C, Younoszai A, Chen Q, Tu X, Wang QK. A de novo mutation in NKX2.5 associated with atrial septal defects, ventricular noncompaction, syncope and sudden death. *Clin Chim Acta* 2011;412:170–175.
30. Martin LJ, Pilipenko V, Kaufman KM, Cripe L, Kottyan LC, Keddache M, Dexheimer P, Weirauch MT, Benson DW. Whole Exome Sequencing for Familial Bicuspid Aortic Valve Identifies Putative Variants. *Circ Cardiovasc Genet* 2014;7:677–683.

Tables and figures

Table 4.1. Demographic and clinical characteristics of the bicuspid aortic valve and tricuspid aortic valve study populations

Variable	BAV (n=323)	TAV (n=584)	p-value
Age (years)	62.8 ± 10.2	71.3 ± 8.6	2.20x10 ⁻¹⁶
Male gender	235 (72.8%)	333 (57.0%)	3.86x10 ⁻⁶
Body mass index (kg/m ²)	27.6 ± 4.8 [1]	27.7 ± 4.5	0.69
Diabetes mellitus	53 (16.4%)	171 (29.3%)	2.40x10 ⁻⁵
Hypertension	178 (55.1%)	417 (71.4%)	1.09x10 ⁻⁶
Peak aortic gradient (mm Hg)	73.1 ± 28.6 [35]	73.9 ± 26.4 [9]*	0.80
Mean aortic gradient (mm Hg)	44.8 ± 18.2 [30]	44.9 ± 17.3 [7]*	0.96
Aortic valve area (cm ²)	0.81 ± 0.43 [28]	0.74 ± 0.21 [1]*	0.02
Ascending aorta replacement	96 (29.7%)	N/A	N/A
Predominant aortic valve disease			
Aortic stenosis	235 (72.8%)	N/A	N/A
Aortic insufficiency	22 (6.8%)	N/A	N/A
Mixed	37 (11.4%)	N/A	N/A
None	27 (8.4%)	N/A	N/A
Missing	2 (0.6%)	N/A	N/A

Continuous variables are expressed as mean ± SD and categorical variables as n (%). Missing values are indicated in brackets. *In the TAV subset, peak and mean aortic gradient and aortic valve area values were only available for the AVS patients (n=122). Aortic stenosis was defined by a mean aortic gradient > 25.0 mm Hg and/or an aortic valve area < 1.0 cm². Aortic insufficiency was defined by an insufficiency score ≥ 3 (moderate or severe insufficiency). BAV, bicuspid aortic valve; TAV, tricuspid aortic valve.

Table 4.2. Number of genetic variants identified by next-generation sequencing and validated by Sanger sequencing

Gene	Total variants (novel)	Variants considered for validation		
		Total	Validated (novel)	Validated with C-score > 10
<i>AXIN1</i>	26 (0)	6	6 (0)	1
<i>EGFR</i>	34 (5)	8	6 (3)	2
<i>ENG</i>	15 (2)	4	2 (0)	1
<i>GATA5</i>	20 (5)	10	6 (1)	2
<i>NKX2-5</i>	10 (3)	4	2 (1)	0
<i>NOS3</i>	22 (3)	5	4 (2)	0
<i>NOTCH1</i>	56 (6)	15	10 (1)	7
<i>PDIA2</i>	22 (2)	10	8 (0)	6
<i>TGFBR2</i>	12 (3)	4	2 (1)	0
Total	217 (29)	66	46 (9)	19

Table 4.3. Identification of 9 novel genetic variants in 48 patients with bicuspid aortic valve

Gene	Genomic position	Function	Exon	cDNA position	Protein position	Minor allele	MAF _{BAV} (n=48)	Number of patients	C-score
<i>EGFR</i>	g.55211066 C > T	synonymous	3	c.555 C>T	p.N103N	T	0.010	1 (2.1%)	9.07
	g.55238316 G > C	intronic				C	0.010	1 (2.1%)	3.29
	g.55241789 T > G	intronic				G	0.010	1 (2.1%)	5.51
<i>GATA5</i>	g.61050015 C > T	intronic				T	0.010	1 (2.1%)	7.11
<i>NKX2-5</i>	g.172659219 C > T	3'UTR				T	0.010	1 (2.1%)	6.61
<i>NOS3</i>	g.150700993 T > A	intronic				A	0.010	1 (2.1%)	8.36
	g.150704101 C > T	intronic				T	0.010	1 (2.1%)	0.48
<i>NOTCH1</i>	g.139405287 AC > A	deletion (intronic)				A	0.010	1 (2.1%)	4.09
<i>TGFBR2</i>	g.30733726 G > A	3'UTR				A	0.010	1 (2.1%)	9.38

3'UTR, 3' untranslated region; MAF, minor allele frequency; BAV, bicuspid aortic valve. MAF_{BAV} was calculated according to Ion Torrent PGM data.

Table 4.4. Identification of 19 potentially pathogenic genetic variants in 48 patients with bicuspid aortic valve

Gene	Genomic position	rs number	Function	Exon	cDNA position	Protein position	Minor allele	MAF _{BAV} (n=48)	Number of patients	PP2 score	C-score
<i>AXIN1</i>	g.348222 C > T	rs214250	synonymous	6	c.1673 C>T	p.S428S	T	0.292	23 (47.9%)		12.33
<i>EGFR</i>	g.55240803 C > T	rs55669340	synonymous	17	c.2293 C>T	p.L683L	T	0.021	2 (4.2%)		10.54
	g.55249063 G > A	rs1050171	synonymous	20	c.2607 G>A	p.Q787Q	G	0.437	39 (81.2%)		17.35
<i>ENG</i>	g.130588091 C > T	rs41322046	missense	5	c.990 C>T	p.G191D	A	0.021	2 (4.2%)	0.999	16.95
<i>GATA5</i>	g.61041653 G > C	rs6061244	intronic				C	0.365	28 (58.3%)		10.05
	g.61039662 T > C	rs73149261	3'UTR				C	0.010	1 (2.1%)		10.28
<i>NOTCH1</i>	g.139440852 A > G	rs3013307	promoter				A	0.312	44 (91.7%)		10.08
	g.139440845 G > A	rs3013306	promoter				G	0.333	42 (87.5%)		10.66
	g.139417590 C > T	N/A	missense	4	c.454 C>T	p.G152S	T	0.010	1 (2.1%)	0.969	19.74
	g.139413908 C > T	rs2229975	synonymous	5	c.852 C>T	p.P284P	A	0.146	14 (29.2%)		10.25
	g.139401233 C > T	rs61751543	missense	23	c.3836 C>T	p.R1279H	T	0.021	2 (4.2%)	0.019	16.23
	g.139400320 G > A	rs183156491	missense	25	c.4028 G>A	p.A1343V	A	0.010	1 (2.1%)	0.944	17.59
	g.139399876 G > A	rs369915496	missense	25	c.4472 G>A	p.T1491M	A	0.010	1 (2.1%)	0.870	17.68
<i>PDIA2</i>	g.334543 C > G	rs45614840	missense	7	c.1464 C>G	p.T119R	G	0.094	8 (16.7%)	1.000	13.79
	g.336377 C > G	rs45529833	missense	13	c.2252 C>G	p.P382A	G	0.010	1 (2.1%)	0.999	13.08
	g.336381 CCT > C	rs375604412	nonsense	13	c.1148_1149delCT	p.P383R (p.V390X)*	C	0.010	1 (2.1%)		14.35
	g.336701 ACT > A	rs201624048	nonsense	14	c.1388_1389delCT	p.L464Q (p.I476X)*	A	0.010	1 (2.1%)		14.94
	g.336731 G > A	rs116969376	missense	14	c.2526 G>A	p.R473A	A	0.010	1 (2.1%)	0.839	12.48
	g.336916 C > T	rs1048786	missense	15	c.2612 C>T	p.P502S	T	0.135	12 (25.0%)	0.002	10.80

3'UTR, 3' untranslated region; BAV, bicuspid aortic valve; MAF, minor allele frequency; PP2, PolyPhen-2. MAF_{BAV} was calculated according to Ion Torrent PGM data * position of the premature stop codon.

Table 4.5. Genetic variants associated with bicuspid aortic valve in a case-control population

Gene	rs number	Minor allele	All				Men				Women				C-Score
			MAF _{BAV} (n=323)	MAF _{TAV} (n=584)	p-value	OR	MAF _{BAV} (n=235)	MAF _{TAV} (n=333)	p-value	OR	MAF _{BAV} (n=88)	MAF _{TAV} (n=251)	p-value	OR	
<i>EGFR</i>	rs17290301	A	0.017	0.036	0.022	0.46	0.013	0.030	0.056	0.42	0.028	0.044	0.364	0.64	4.29
<i>TEX26</i> (<i>C13orf26</i>)	rs12857479	A	0.408	0.367	0.082	1.19	0.417	0.355	0.035	1.30	0.385	0.382	0.943	1.01	22.50
<i>EGFR</i>	rs533525993	A	0.009	0.003	0.106	2.73	0.011	0.002	0.036	7.15	0.006	0.006	0.965	0.95	8.50
<i>NOTCH1</i>	rs61751489	A	0.025	0.015	0.119	1.72	0.015	0.017	0.829	0.90	0.051	0.012	0.002	4.46	0.50
<i>TGFBR2</i>	rs1155705	G	0.328	0.337	0.703	0.96	0.295	0.350	0.052	0.78	0.415	0.319	0.016	1.53	1.84
<i>NKX2-5</i>	rs2277923	G	0.330	0.289	0.071	1.21	0.323	0.318	0.841	1.03	0.347	0.251	0.021	1.52	9.50

BAV, bicuspid aortic valve; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio; TAV, tricuspid aortic valve. Statistically significant associations are in bold.

Supplemental material

Supplementary Table 4.1 Primer sequences and corresponding amplicon size designed for validating 66 genetic variants detected by next-generation sequencing

Fragment name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon size (pb)
AXIN1_EXON-4_F1_R1	5' AGGAGCTCTATTGGCACGGT 3'	5' GTTGCTGGGATCACACGCTT 3'	311
AXIN1_EXON-6_F1_R1	5' GCAGAGCTCTGCCCACAG 3'	5' AGTCCACTCCCTCCAGCAGA 3'	914
AXIN1_EXON-7_F1_R1	5' CAGACAGCACCAGGACAGC 3'	5' ACACACTGAAGCTGCACACA 3'	468
AXIN1_EXON-11_F2_R2	5' GTGTACCACCCATCCCTGTG 3'	5' CCAGTGTGCCCTCCTTTACC 3'	658
EGFR_PROM_F1_R1	5' CACGGCTGTTTGTGTCAAGC 3'	5' TGCCCTGAGGAGTTAATTTCCG 3'	558
EGFR_EXON3_F1_R1	5' GGCTCCCTGGACCCATTTTA 3'	5' ACGATTCTGCTCAGCTTGT 3'	575
EGFR_EXON13_F1_R1	5' GCCCAGTCTGTGCCTCCTC 3'	5' CCTCAGAGCATTCAAACTGCAC 3'	853
EGFR_EXON15_F1_R1	5' TGCCACCTTCTGTCACTGG 3'	5' CTACTGGCATGGCTGTGGGG 3'	746
EGFR_INTRON-15_F1_R1	5' CCCAGCTGCTCAGGAGTCAT 3'	5' TAGAAGCATGGACTGGGGCC 3'	417
EGFR_EXON17_F1_R1	5' GGAAGTGGGAGAGCTTGG 3'	5' GACATTGAAGGGTGCAGCC 3'	560
EGFR_EXON18_F1_R1	5' AGGCGTACATTTGTCTTCCA 3'	5' CCCCATGGCAAGGTCAATGG 3'	545
EGFR_EXON20_F1_R1	5' CTGGGCCTCTGTGCATGGG 3'	5' TGGCCTGGCTTGCTTACCTT 3'	811
EGFR_EXON28_F1_R1	5' ACCTCGGGCACATTTTGGGA 3'	5' GGGGTTGGGGTATGGCTAA 3'	889
ENG_EXON 3_F1_R1	5' TGGAAGCATCCAAATCACTGC 3'	5' GCACATCAACCTGACTCCCA 3'	471
ENG_EXON 5_F1_R1	5' ACTTGGCAGGTGAGTGGTG 3'	5' GGCTTTATAAGGGACCGGAGAG 3'	432
ENG_EXON 6-7_F1_R1	5' CCAGTCCCATCCCTATCCCA 3'	5' TCCATTGTTCCCATGTGCAG 3'	839
ENG_EXON 8_F1_R1	5' GAGCCAAGATCGTGCCACT 3'	5' TAAGTGACCAGCCAGCTCAG 3'	596
ENG_EXON 15_F2_R2	5' AGTGGGTCTGGGATATGGCT 3'	5' TGCTGTCGAGTGGGTGAATG 3'	648
GATA5_PROM_F2_R2	5' CCTCCTACCCACACGCATTTT 3'	5' GGCCGAAGACTGGAAGCC 3'	736
GATA5_EXON2_F1_R1	5' ATCCCCGCGGTTCTCTC 3'	5' ACCCAGGTTTACTCGTCTCGCC 3'	870

Fragment name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon size (pb)
GATA5_EXON4_F1_R1	5' GAGCTCACGACCTTCTCACC 3'	5' GTGCCGTGAGTGTAACAGGA 3'	450
GATA5_EXON5-6_F1_R1	5' ACAGCCAGCTCCAGGAGT 3'	5' ATGGGATCTGACTTGGCGGA 3'	767
GATA5_EXON7_F1_R1	5' GGGCAAATACCGGTCATGGG 3'	5' TGTGGGCAATGAAGGACAGC 3'	770
GATA5_EXON7_F2_R2	5' TGAGGGAAGGGCTCAGCTTC 3'	5' ACATCACGGCCATTACAG 3'	773
GATA5_EXON7_F3_R3	5' GTAGCCCTGTCCTGACCCAT 3'	5' ATCGCTAGGAGGGTGGTGAC 3'	807
NKX2-5_EXON2_F2_R2	5' GGCCTCAATCCCTACGGTTA 3'	5' GCCACCTCTCTCCTGCTTC 3'	762
NKX2-5_INTRON_1-2_F1_R1	5' AACAAATTCGGGCGGGCA 3'	5' TTGTAGAAAGTCAGGCTGGCTCA 3'	450
NOS3_EXON-8-9_F1_R1	5' ACGGAGACCCAGCCAATGAG 3'	5' GGCTGGCATTGTTGGGGATGG 3'	621
NOS3_EXON-11-12_F1_R1	5' TGCTTGTTCATGTTGAACCTG 3'	5' CCCCCTCACACAGGGTTT 3'	740
NOS3_INTRON-14_F1_R1	5' CTCCTGCCAGAAGTGTCTG 3'	5' TGCACAGATGTTAAAGGGCAGT 3'	749
NOS3_EXON-16-17_F1_R1	5' ACCTGCCTGCTTCTGAGAGC 3'	5' AGGGCCATGTCATCCTCTGC 3'	797
NOTCH1_PROM_F1_R1	5' CCATCCCTCGCGGTCAAGT 3'	5' GCGCCTGGGACTACTTCTC 3'	396
NOTCH1_EXON-4_F1_R1	5' GGAGGTGTCAGCTCTGGGAA 3'	5' CTTCCCACTCCCGCCAT 3'	684
NOTCH1_EXON-5_F1_R1	5' ACTGGAGTGAGGCAGGGGA 3'	5' TTGTCTTCTCGGCCAACCC 3'	417
NOTCH1_EXON-7-8_F1_R1	5' CCAAGTGTACGGGATGCCC 3'	5' TGGCCTCAGTTTCCCATGC 3'	831
NOTCH1_EXON-10_F1_R1	5' CCTTCTGTGGGAGCGAGGG 3'	5' CACCTGTGCCAACCTGAGGA 3'	517
NOTCH1_EXON-14_F1_R1	5' CCCCCTAAAGGACTCTGCGA 3'	5' CCCTCCTCATCTCAAGAGCC 3'	442
NOTCH1_EXON-16-17_F1_R1	5' AGACGGCACTCTGATGGC 3'	5' CACCCTGGCCATCCCTCAG 3'	884
NOTCH1_EXON-23-24_F1_R1	5' TCACAGCTGCCAGGGAAAG 3'	5' GGAGGATGAAGGCCGGGAG 3'	754
NOTCH1_EXON-25_F1_R1	5' AAAGGGTTTTGCTGCTGGGG 3'	5' CCCCTGAGCAGAGCCTTAGA 3'	822
NOTCH1_EXON-28-29-30_F2_R2	5' GGCGGGATGGAGGAGAGT 3'	5' ATCAACTGTACCCAGCCTCG 3'	968
NOTCH1_EXON-32-33_F1_R1	5' GTGCCGATCTCAGGAGGGTC 3'	5' GTCAGGCCCTTGTGTCCCT 3'	588
NOTCH1_EXON-34_F1_R1	5' GCTGCTTCTCTGGTGATGGA 3'	5' GCCTACCATGCCATGCTGC 3'	949
PDIA2_EXON6_F2_R2	5' ACCTCCCTCAGTTGTTGCAC 3'	5' GGCAAGGTGGTGACTCTGG 3'	811

Fragment name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon size (pb)
PDIA2_EXON7-8_F1_R1	5' CCTTACTGGTCCCTGTGCTG 3'	5' AGAGAACCACAGTGCCTTGG 3'	802
PDIA2_EXON13-15_F1_R1	5' ACCTCCTGAACCCTGCAGA 3'	5' TGCCAGCCCTGTGTAAGAG 3'	711
TGFBR2_EXON5_F1_R1	5' CCCACTTCCTGACAGTACTTACCT 3'	5' CACAGGCAGCAGGTTAGGTC 3'	799
TGFBR2_EXON8_F1_R1	5' AGGCACTCAGTCAGCACATG 3'	5' ATGCTGTCATGGGTCCTTC 3'	788
TGFBR2_EXON8_F2_R2	5' GAGAACTCCAGAACCAAGCAGAG 3'	5' GCAATCAGGAGCCCAGAAAGA 3'	656

Primers were ordered from Integrated DNA Technologies (IDT) and all amplicons were amplified by Touchdown PCR as follows:

15 min. at 95°C, followed by 17 cycles (15 sec. at 94°C, 60 sec. at 64°C and lowering by 0.5°C/cycle, 60 sec. at 72°C), 18 cycles (15 sec. at 94°C, 60 sec. at 55°C and 60 sec. at 72°C) and 7 min. at 72°C.

The primers used for sequencing reaction are indicated in bold. Primer pairs were often used to validate more than one genetic variant.

Supplementary Table 4.2 Selection of 89 genetic variants genotyped in 339 BAV patients and 606 control patients

Gene	Genomic position	Function	cDNA position	Protein position	rs number (Build 138)*	Reason for selection	References	Identified in the 48 BAV cohort?	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?	Passed genotyping QC?
ENG	g.130614912G>A	Intronic			rs4837192	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	No
GATA5	g.61050015C>T	Intronic			GATA5_61050015	F		Yes	Yes	Yes	Yes
PLA2G2C	g.20501582G>A	Nonsense	c.106G>A	p.R36Ter	rs12139100	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
TGFBR2	g.30691881delA	Deletion (frameshift)	c.458delA	p.L153Sfs	rs79375991	A	2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139396690C>T	Intronic			rs75842134	E		Yes	Yes	Yes	Yes
NOTCH1	g.139400320G>A	Missense	c.4028C>T	p.A1343V	rs183156491	D	2007 J Thorac Cardiovasc Surg, Mckellar et al.	Yes	Yes	Yes	Yes
TGFBR2	g.30733726G>A	3'UTR			TGFBR2_30733726	F		Yes	Yes	Yes	Yes
GATA5	g.61050570T>C	Missense	c.8A>G	p.Q3R	rs113068438	A	2012 J Mol Cell Cardiol, Padang et al., 2014 Pediatrics Res, Bonachea et al., 2014 Heart, Francis et al.	No	No	N/A	Yes
ENG	g.130581723A>G	Intronic			rs10819309	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	No
ENG	g.130598125G>A	Intronic			rs11792480	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
TOR1AIP1	g.179858444G>A	Intronic (splice acceptor)			rs2245425	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
ENG	g.130588091C>T	Missense	c.572G>A	p.G191D	rs41322046	D		Yes	Yes	Yes	Yes
PDIA2	g.336381CCT>C	Deletion (frameshift)	c.1148_1149 delCT	P383Rfs	rs375604412	D		Yes	Yes	Yes	No

Gene	Genomic position	Function	cDNA position	Protein position	rs number (Build 138)*	Reason for selection	References	Identified in the 48 BAV cohort?	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?	Passed genotyping QC?
AXIN1	g.348222C>T	Synonymous	c.1284G>A	p.S428S	rs214250	D		Yes	Yes	Yes	Yes
NOS3	g.150700993T>A	Intronic			NOS3_150700993	F		Yes	Yes	Yes	Yes
PDIA2	g.335373C>T	Missense	c.857C>T	p.T286M	rs2685127	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
NKX2-5	g.172662024T>C	Synonymous	c.63A>G	p.E21E	rs2277923	B	2006 J Thorac Cardiovasc Surg, Majumdar et al.	Yes	No	N/A	Yes
ENG	g.130618377T>C	Promoter			rs10987759	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
ENG	g.130607518T>G	Intronic			rs11789185	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
NKX2-5	g.172662014G>A	Missense	c.73C>T	p.R25C	rs28936670	A	2013 J Cardiovasc Med, Boffagna et al.	No	No	N/A	No
AXIN1	g.341079G>A	Intronic			rs12925669	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
EHMT1	g.140648742C>T	Synonymous	c.1368C>T	p.L456L	rs45450992	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
AXIN1	g.362638T>G	Intronic			rs7359414	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139399286C>G	Nonsense	c.4856C>G	p.Y1619Ter (previously p.Y1619X)	NOTCH1_Y1619Ter	A	2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139402690G>A	Nonsense	c.3319C>T	p.R1107Ter (previously p.R1108X)	rs41309764	A	2005 Nature, Garg et al.	No	No	N/A	Yes
PDIA2	g.336916C>T	Missense	c.2612C>T	p.P502S	rs1048786†	D		Yes	Yes	Yes	Yes
EGFR	g.55238316G>C	Intronic			EGFR_55238316	F		Yes	Yes	Yes	Yes
AXIN1	g.359953A>G	Intronic			rs2301522	C	2010, PLoS One, Wooten et al.	Yes	Yes	Yes	Yes

Gene	Genomic position	Function	cDNA position	Protein position	rs number (Build 138)*	Reason for selection	References	Identified in the 48 BAV cohort?	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?	Passed genotyping QC?
NOTCH1	g.139391338C>T	Missense	c.6853G>A	p.V2285I	rs61751489	C	2006 Biochem Biophys Res Commun, Mohamed et al., 2013 J Heart Valve Dis, Ducharme et al.	Yes	Yes	Yes	Yes
NOTCH1	g.139417590C>T	Missense	c.454C>T	p.G152S	NOTCH1_139417590	D		Yes	Yes	Yes	No
PDIA2	g.334543C>G	Missense	c.356C>G	p.T119R	rs45614840	D		Yes	Yes	Yes	Yes
NOTCH1	g.139390585C>T	Missense	c.7606G>A	p.V2536I	rs111627256	A	2008 Hum Mol Genet, McBride et al.	No	No	N/A	Yes
AXIN1	g.375782C>T	Intronic			rs9921222	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
EGFR	g.55241789T>G	Intronic			EGFR_55241789	F		Yes	Yes	Yes	Yes
NOTCH1	g.139413908C>T	Synonymous	c.852G>A	p.P284P	rs2229975	D	2006 Biochem Biophys Res Commun, Mohamed et al., 2013 BMC Med Genet, Foffa et al., 2013 J Thorac Cardiovasc Surg, Kent et al.	Yes	Yes	Yes	Yes
PDIA2	g.336396G>A	Missense	c.1163G>A	p.R388Q	rs400037	C	2010, PLoS One, Wooten et al.	Yes	Yes	Yes	Yes
ANKH	g.14741984T>C	Synonymous	c.963A>G	p.A321A	rs2288474	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
EGFR	g.55249063G>A	Synonymous	c.2361G>A	p.Q787Q	rs1050171	D		Yes	Yes	Yes	Yes
FBX07	g.32875190G>A	Missense	c.345G>A	p.M115I	rs11107	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
GATA5	g.61050522G>C	Missense	c.56C>G	p.S19W	rs200383755	A	2014 Heart, Francis et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139409775C>T	Missense	c.1981G>A	p.G661S	rs201077220	A	2008 Hum Mol Genet, McBride et al.	No	No	N/A	Yes

Gene	Genomic position	Function	cDNA position	Protein position	rs number (Build 138)*	Reason for selection	References	Identified in the 48 BAV cohort?	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?	Passed genotyping QC?
TGFBR2	g.30686414A>G	Intronic			rs1155705	B	2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	Yes	No	N/A	Yes
EGFR	g.55240803C>T	Synonymous	c.2047C>T	p.L683L	rs55669340	D		Yes	Yes	Yes	Yes
PDIA2	g.336701_336702delCT	Deletion (frameshift)	c.1388_1389delCT	p.L464Qfs	rs201624048	D		Yes	Yes	Yes	Yes
NOTCH1	g.139440845G>A	Promoter			rs3013306	D		Yes	Yes	Yes	No
AXIN1	g.347063C>T	Missense	c.1948G>A	p.G650S	rs117208012	E		Yes	Yes	Yes	Yes
NOTCH1	g.139399836delG	Deletion (frameshift)	c.4512delC	p.C1505Vfs (previously p.H1505del)	rs41309766	A	2005 Nature, Garg et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139399876G>A	Missense	c.4472C>T	p.T1491M	rs369915496	D		Yes	Yes	Yes	Yes
PDIA2	g.334890G>A	Missense	c.553G>A	p.E185K	rs419949	C	2010, PLoS One, Wooten et al.	Yes	Yes	Yes	Yes
ENG	g.130586688G>A	Synonymous	c.1029C>T	p.T343T	rs3739817	B	2010, PLoS One, Wooten et al.	Yes	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139400180G>T	Missense	c.4168C>A	p.P1390T	rs191645600	A	2007 J Thorac Cardiovasc Surg, Mckellar et al.	No	No	N/A	No
TRAF2	g.139794100C>T	Synonymous	c.243C>T	p.G81G	rs148192660	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
ENG	g.130576597A>C	Downstream			rs4451422	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
OR56A3	g.5969255C>T	Nonsense	c.679C>T	p.R227Ter	rs188845678	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
GATA5	g.61039913G>T (or C)	Missense	c.1235G>T (or C)	p.W391C	GATA5_pW391C	A	2014 Heart, Francis et al.	No	No	N/A	No
TGFBR2	g.30713834G>A	Missense	c.1234G>A	p.V387M	rs35766612	A	2011 Ann Thorac Surg, Girdauskas et al.	No	No	N/A	Yes
CENPM	g.41940168G>A	Nonsense	c.7C>T	p.R3Ter	rs5758511	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes

Gene	Genomic position	Function	cDNA position	Protein position	rs number (Build 138)*	Reason for selection	References	Identified in the 48 BAV cohort?	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?	Passed genotyping QC?
GATA5	g.61048460A>G	Missense	c.698T>C	p.L233P	rs116164480	A	2014 Pediatrics Res, Bonachea et al., 2014 Heart, Francis et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139401233C>T	Missense	c.3836G>A	p.R1279H	rs61751543	D	2008 Hum Mol Genet, McBride et al., 2013 J Heart Valve Dis, Ducharme et al.	Yes	Yes	Yes	Yes
NOTCH1	g.139402740C>G	Missense	c.3269 C > G	p.T1090S	NOTCH1_T1090S	A	2013 J Thorac Cardiovasc Surg, Kent et al.	No	No	N/A	Yes
GATA5	g.61039662T>C	3'UTR			rs73149261	D		Yes	Yes	Yes	Yes
GATA5	g.61039308G>A	3'UTR			rs41284978	E		Yes	Yes	Yes	Yes
NOS3	g.150704101C>T	Intronic			NOS3_150704101	F		Yes	Yes	Yes	Yes
AXIN1	g.372597A>G	Intronic			rs3916990	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139396538A>C	Missense	c.5463A>C	p.P1796H (previously p.P1796H)	NOTCH1_P1797H	A	2006 Biochem Biophys Res Commun, Mohamed et al.	No	No	N/A	No
GATA5	g.61041653G>C	Intronic			rs6061244	D	2012 J Mol Cell Cardiol, Padang et al.	Yes	Yes	Yes	Yes
EGFR	g.55238253G>A	Intronic			rs17290225	E		Yes	Yes	Yes	Yes
GATA5	g.61040951C>T	Synonymous	c.852G>A	p.K284K	rs6587239	B	2012 J Mol Cell Cardiol, Padang et al., 2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	Yes	No	N/A	No
GATA5	g.61050154A>G	Missense	c.424T>C	p.Y142H	rs111554140	A	2012 J Mol Cell Cardiol, Padang et al.	No	No	N/A	Yes
PDIA2	g.336731G>A	Missense	c.1418G>A	p.R473A	rs116969376	D		Yes	Yes	Yes	Yes
AXIN1	g.337871T>C	3'UTR			rs394128	E		Yes	Yes	Yes	Yes
PDIA2	g.333284C>T	Missense	c.115C>T	p.P39S	rs45455191	E		Yes	Yes	Yes	Yes

Gene	Genomic position	Function	cDNA position	Protein position	rs number (Build 138)*	Reason for selection	References	Identified in the 48 BAV cohort?	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?	Passed genotyping QC?
AXIN1	g.349221T>C	Intronic			rs214247	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
EGFR	g.55233128C>T	Synonymous	c.2124C>T	p.Y626Y	rs533525993	G		Yes	No	N/A	Yes
ENG	g.130602408G>A	Intronic			rs10121110	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
GATA5	g.61039958T>C	Synonymous	c.1128A>G	p.P376P	rs6061550	B	2012 J Mol Cell Cardiol, Padang et al., 2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	Yes	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139405181G>A	Synonymous	c.2664C>T	p.H888H	rs61751548	E	2006 Biochem Biophys Res Commun, Mohamed et al., 2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	Yes	Yes	Yes	Yes
SSPO	g.149530894G>A	Intronic			rs6960187	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139410051G>A	Missense	c.1787C>T	p.T596M	rs61755997	A	2006 Biochem Biophys Res Commun, Mohamed et al.	No	No	N/A	No
GATA5	g.61048549G>A	Synonymous	c.671G>A	p.D203D	rs41305803§	A	2012 J Mol Cell Cardiol, Padang et al., 2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	No	No	N/A	No
AXIN1	g.356689G>A	Intronic			rs1981492	A	2010, PLoS One, Wooten et al.	No	No	N/A	Yes
NKX2-5	g.172659511C>A	3'UTR			rs703752	A	2006 J Thorac Cardiovasc Surg, Majumdar et al.	No	No	N/A	Yes
NOTCH1	g.139413909G>A	Missense	c.851C>T	p.P284L	rs376104770	A	2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	No	No	N/A	Yes
EGFR	g.55240882G>A	Intronic			rs17290301	E		Yes	Yes	Yes	Yes

Gene	Genomic position	Function	cDNA position	Protein position	rs number (Build 138)*	Reason for selection	References	Identified in the 48 BAV cohort?	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?	Passed genotyping QC?
C13orf26 (TEX26)	g.31531009G>A	Splice acceptor			rs12857479	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
TGFBR2	g.30713126T>A	Intronic			rs11466512	B	2008 Am J Cardiol, Arrington et al., 2013 BMC Med Genet, Foffa et al.	Yes	No	N/A	Yes
EGFR	g.55211066C>T	Synonymous	c.555C>T	p.N103N	EGFR_55211066	F		Yes	Yes	Yes	Yes
AMPD1	g.115236057G>A	Nonsense	c.133C>T	p.Q45Ter	rs17602729	A	2014 Circ Cardiovasc Genet, Martin et al.	No	No	N/A	Yes
GATA5	g.61038853G>A	3'UTR			rs73149254	E		Yes	Yes	Yes	No

*Variant identified as GENE_POSITION if rs number not available. † rs34665498 was used instead of rs1048786 (LD= 1 in CEU) in the genotyping panel because of design limitations. § rs6061246 was used instead of rs41305803 (LD= 0.831 in TSI and 0.914 in FIN) for the same reasons. A, in previous literature but not in the 48 BAV; B, In previous literature and in the 48 BAV but not re-sequenced; C, In previous literature and in the 48 BAV (re-sequenced); D, Known variants validated and potentially pathogenic (C-score>10); E, Known variants validated and potentially pathogenic (freq in the 48 BAV cohort); F, Novel variants validated; G, Rare synonymous variant with borderline C-Score.

Supplementary Table 4.3 Allele-specific primer sequences and corresponding amplicon size designed for genotyping NOTCH1 g.139417590C>T (G152S)

Fragment name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon size (pb)
NOTCH1_EXON-4_F2_R2_AS1 (for major alleles)	5' GTGGCCTGAAGGGAGGGAAGGC 3'	5' TGATTAAGGGCAGGCACTGGCTACC 3'	151
NOTCH1_EXON-4_F2_R2_AS2 (for minor alleles)	5' GTGGCCTGAAGGGAGGGAAGGC 3'	5' TGC GTTCCACTTCGAAAGGGCAGGCACTGGCCGCT 3'	161

Primers were ordered from Integrated DNA Technologies (IDT) and all amplicons were amplified by PCR as follows:
15 min. at 95°C, followed by 35 cycles (15 sec. at 94°C, 30 sec. at 62°C, 60 sec. at 72°C) and 7 min. at 72°C.

Supplementary Table 4.4 Demographic and clinical characteristics of the bicuspid aortic valve and tricuspid aortic valve study populations stratified by gender

Variable	BAV (n=323)			TAV (n=584)		
	Men (n=235)	Women (n=88)	p-value	Men (n=333)	Women (n=251)	p-value
Age (years)	61.5 ± 10.3	66.6 ± 9.0	1.98x10 ⁻⁵	70.1 ± 9.3	73.1 ± 7.4	2.06x10 ⁻⁵
Body mass index (kg/m ²)	27.7 ± 4.8	27.5 ± 5.0	0.71	27.9 ± 4.4	27.6 ± 4.7	0.63
Diabetes mellitus	40 (17.0%)	13 (14.8%)	0.75	89 (26.7%)	82 (32.7%)	0.14
Hypertension	122 (51.9%)	56 (63.6%)	0.08	226 (67.9%)	191 (76.1%)	0.04
Peak aortic gradient (mm Hg)	72.6 ± 29.4 [20]	74.5 ± 26.4 [15]	0.61	71.9 ± 25.6 [6]*	76.4 ± 27.5 [3]*	0.34
Mean aortic gradient (mm Hg)	44.2 ± 18.6 [18]	46.7 ± 17.0 [12]	0.29	43.3 ± 16.7 [4]*	47.3 ± 18.3 [3]*	0.24
Aortic valve area (cm ²)	0.88 ± 0.48 [25]	0.65 ± 0.20 [3]	1.63x10 ⁻⁸	0.80 ± 0.21 [1]*	0.66 ± 0.18	1.53 x10 ⁻⁴
Ascending aorta replacement	76 (32.3%)	20 (22.7%)	0.12	N/A	N/A	N/A
Predominant aortic valve disease			6.57x10 ⁻³			
Aortic stenosis	160 (68.1%)	75 (85.2%)		N/A	N/A	N/A
Aortic insufficiency	22 (9.4%)	0 (0%)		N/A	N/A	N/A
Mixed	29 (12.3%)	8 (9.1%)		N/A	N/A	N/A
None	23 (9.8%)	4 (4.6%)		N/A	N/A	N/A
Missing	1 (0.4%)	1 (1.1%)		N/A	N/A	N/A

Continuous variables are expressed as mean ± SD and categorical variables as n (%). Missing values are indicated in brackets. *In the TAV subset, peak and mean aortic gradient and aortic valve area values were only available for the AVS patients (n=122). Aortic stenosis was defined by a mean aortic gradient > 25.0 mm Hg and/or an aortic valve area < 1.0 cm². Aortic insufficiency was defined by an insufficiency score ≥ 3 (moderate or severe insufficiency). BAV, bicuspid aortic valve; TAV, tricuspid aortic valve.

Supplementary Table 4.5 Identification and assessment of pathogenicity for 217 DNA variants detected by next-generation sequencing of 9 genes in 48 patients with BAV

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
AXIN1	16	g.337421A>C	Downstream gene	rs377220					0,000	3.260	No	N/A
AXIN1	16	g.337492ATAAT>A	Deletion (3'UTR)	rs370513758 (or rs34131715, build 137)					0.313	5.790	Yes	Yes
AXIN1	16	g.337548G>GC	Insertion (3'UTR)	rs3833914					0.313	3.406	Yes	Yes
AXIN1	16	g.337613G>A	3'UTR	rs9939865					0.042	4.864	Yes	Yes
AXIN1	16	g.337655A>G	3'UTR	rs45530432					0.042	7.007	No	N/A
AXIN1	16	g.337678T>G	3'UTR	rs393521					0.302	3.538	No	N/A
AXIN1	16	g.337691C>T	3'UTR	rs34665498					0.135	6.843	No	N/A
AXIN1	16	g.337750C>G	3'UTR	rs395545					1.000*	2.457	No	N/A
AXIN1	16	g.337871T>C	3'UTR	rs394128					0.063	2.393	No	N/A
AXIN1	16	g.339415G>T	Intronic	rs387467					0.229	0.111	No	N/A
AXIN1	16	g.339499C>T	Synonymous	rs113073289	10	c.2792C>T	p.R801R		0.021	2.213	No	N/A
AXIN1	16	g.341120C>T	Intronic	rs55886111					0.052	5.188	No	N/A
AXIN1	16	g.341136G>T	Intronic	rs375608945					0.021	2.047	No	N/A
AXIN1	16	g.341182G>A	Intronic	rs118063900					0.031	2.435	No	N/A
AXIN1	16	g.341476T>C	Intronic	rs2685119					0.469	3.772	No	N/A
AXIN1	16	g.343481G>A	Intronic	rs189357878					0.010	5.201	No	N/A

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
AXIN1	16	g.347063C>T	Missense	rs117208012	7	c.2337C>T	p.G650S	0.256 (Benign)	0.021	0.034	No	N/A
AXIN1	16	g.347184A>G	Synonymous	rs214252	7	c.2216A>G	p.A609A		0.292	6.161	No	N/A
AXIN1	16	g.347257G>T	Intronic	rs117820439					0.115	3.976	No	N/A
AXIN1	16	g.348021G>C	Missense	rs146947903	6	c.1874G>C	p.D495E	0.101 (Benign)	0.031	5.690	Yes	Yes
AXIN1	16	g.348222C>T	Synonymous	rs214250	6	c.1673C>T	p.S428S		0.292	12.330	Yes	Yes
AXIN1	16	g.354287C>T	Intronic	rs62032881					0.167	0.504	No	N/A
AXIN1	16	g.359953A>G	Intronic	rs2301522					0.885*	5.371	Yes	Yes
AXIN1	16	g.396264A>G	Synonymous	rs1805105	2	c.1151A>G	p.D254D		0.323	0.013	No	N/A
AXIN1	16	g.397044G>T	5'UTR	rs758033					0.292	3.632	No	N/A
AXIN1	16	g.403497G>A	Promoter	rs7198290					0.229	6.548	No	N/A
EGFR	7	g.55086210CCGA>C	Deletion (promoter)	Novel					0.042	7.485	Yes	No
EGFR	7	g.55086212A>C	Promoter	rs759171					0.146	7.418	No	N/A
EGFR	7	g.55211066C>T	Synonymous	Novel	3	c.555C>T	p.N103N		0.010	9.066	Yes	Yes
EGFR	7	g.55214348C>T	Synonymous	rs2072454	4	c.720C>T	p.N158N		0.417	8.281	No	N/A
EGFR	7	g.55214443G>A	Intronic	rs7801956					0.083	6.776	No	N/A
EGFR	7	g.55218903T>C	Intronic	rs2075109					0.417	2.405	No	N/A
EGFR	7	g.55221655G>A	Intronic	rs4947986					0.240	2.715	No	N/A
EGFR	7	g.55228053A>T	Intronic	rs1558544					0.240	6.702	No	N/A
EGFR	7	g.55229202C>T	Synonymous	rs17336800	13	c.1755C>T	p.G503G		0.031	5.233	No	N/A
EGFR	7	g.55229232AG>A	Deletion (coding)	Novel	13				0.042	38.000	Yes	No
EGFR	7	g.55229255G>A	Missense	rs2227983	13	c.1808G>A	p.R521K	0.000 (Benign)	0.313	1.353	Yes	Yes

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
EGFR	7	g.55233080C>T	Synonymous	rs115350205	15	c.2076C>T	p.Y610Y		0.010	2.532	No	N/A
EGFR	7	g.55233089C>T	Synonymous	rs17290169	15	c.2085C>T	p.A613A		0.042	1.845	No	N/A
EGFR	7	g.55233128C>T	Synonymous	rs533525993	15	c.2124C>T	p.Y626Y		0.021	8.503	No	N/A
EGFR	7	g.55237977T>C	Intronic	rs17336974					0.021	2.232	No	N/A
EGFR	7	g.55238087C>T	Intronic	rs10258429					0.073	1.118	No	N/A
EGFR	7	g.55238147G>A	Intronic	rs17336988					0.010	2.675	No	N/A
EGFR	7	g.55238253G>A	Intronic	rs17290225					0.010	0.246	No	N/A
EGFR	7	g.55238268G>A	Intronic	rs10228436					0.365	0.438	No	N/A
EGFR	7	g.55238316G>C	Intronic	Novel					0.010	3.287	Yes	Yes
EGFR	7	g.55238464T>G	Intronic	rs10277413					0.354	1.098	No	N/A
EGFR	7	g.55238874T>A	Synonymous	rs2227984	16	c.2133T>A	p.T629T		0.354	6.015	No	N/A
EGFR	7	g.55240803C>T	Synonymous	rs55669340	17	c.2293C>T	p.L683L		0.021	10.540	Yes	Yes
EGFR	7	g.55240882G>A	Intronic	rs17290301					0.010	4.290	No	N/A
EGFR	7	g.55240891C>T	Intronic	rs79499564					0.010	0.829	No	N/A
EGFR	7	g.55241755G>A	Intronic	rs17337107					0.021	8.339	No	N/A
EGFR	7	g.55241789T>G	Intronic	Novel					0.010	5.513	Yes	Yes
EGFR	7	g.55248926T>C	Intronic	rs10241451					0.240	8.025	No	N/A
EGFR	7	g.55249063G>A	Synonymous	rs1050171	20	c.2607G>A	p.Q787Q		0.437	17.350	Yes	Yes
EGFR	7	g.55266417T>C	Synonymous	rs1140475	23	c.2709C>T	p.T903T		0.125	7.276	No	N/A
EGFR	7	g.55268916C>T	Synonymous	rs2293347	25	c.3228C>T	p.D994D		0.094	9.664	No	N/A
EGFR	7	g.55269520A>G	Intronic	rs41446045					0.042	0.359	No	N/A
EGFR	7	g.55273868G>A	3'UTR	N/A					0.010	3.759	No	N/A
EGFR	7	g.55274084T>C	3'UTR	rs884225					0.104	9.616	No	N/A
ENG	9	g.130617585C>G	Promoter	rs45514697					0.031	2.291	No	N/A

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
ENG	9	g.130617258T>G	Promoter	rs4836586					0,000	5.559	No	N/A
ENG	9	g.130605472G>A	Synonymous	rs41522944	2	c.538G>A	p.G40G		0.031	7.327	No	N/A
ENG	9	g.130605385C>T	Synonymous	rs11545664	2	c.625C>T	p.L69L		0.073	9.504	No	N/A
ENG	9	g.130605348C>A	Intronic	rs7847860					0.073	5.300	No	N/A
ENG	9	g.130591972C>T	Synonymous	N/A	3	c.772C>T	p.L118L		0.010	1.782	No	N/A
ENG	9	g.130588151C>T	Intronic	rs142841129					0.010	8.201	No	N/A
ENG	9	g.130588091C>T	Missense	rs41322046	5	c.990C>T	p.G191D	0.999 (Probably damaging)	0.021	16.950	Yes	Yes
ENG	9	g.130587053A>AGGGAGG	Insertion (intronic)	Novel					0.031	1.779	Yes	No
ENG	9	g.130586758G>A	Intronic	Novel					0.479	6.198	Yes	No
ENG	9	g.130586688G>A	Synonymous	rs3739817	8	c.1447G>A	p.T343T		0.063	8.817	No	N/A
ENG	9	g.130586657G>A	Synonymous	rs36092484	8	c.1478G>A	p.L354L		0.010	5.308	No	N/A
ENG	9	g.130578404A>G	Intronic	rs10760503					0.427	1.661	No	N/A
ENG	9	g.130577493CAGTT>C	Deletion (3'UTR)	rs41514846					0.042	8.251	Yes	Yes
ENG	9	g.130577470G>A	3'UTR	rs190129922					0.010	4.396	No	N/A
GATA5	20	g.61051424CG>C	Deletion (promoter)	rs113383838					0.031	8.126	Yes	Yes
GATA5	20	g.61050392CG>C	Deletion (coding)	Novel	2				0.052	13.130	Yes	No
GATA5	20	g.61050379T>G	Missense	rs6142775	2	c.261T>G	p.T67P	0.000 (Benign)	0.146	4.589	Yes	Yes
GATA5	20	g.61050015C>T	Intronic	Novel					0.010	7.113	Yes	Yes
GATA5	20	g.61048549G>A	Synonymous	rs41305803	3	c.671G>A	p.D203D		0.448	9.718	No	N/A

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
GATA5	20	g.61048443 C>T	Intronic	rs377441586					0.010	0.705	No	N/A
GATA5	20	g.61041653 G>C	Intronic	rs6061244					0.365	10.050	Yes	Yes
GATA5	20	g.61040951 C>T	Synonymous	rs6587239	5	c.914C>T	p.K284K		0.490	7.281	No	N/A
GATA5	20	g.61040529C>CG	Insertion (intronic)	Novel					0.010	3.690	Yes	No
GATA5	20	g.61040453C>G	Synonymous	rs6061243	6	c.1043C>G	p.S327S		0.010	0.045	No	N/A
GATA5	20	g.61039958 T>C	Synonymous	rs6061550	7	c.1190T>C	p.P376P		0.385	2.549	No	N/A
GATA5	20	g.61039951GCCTG>GCCT	Deletion (coding)	Novel	7				0.010	16.340	Yes	No
GATA5	20	g.61039948GCCTG>GCTG	Deletion (coding)	Novel	7				0.021	15.360	Yes	No
GATA5	20	g.61039662T>C	3'UTR	rs73149261					0.010	10.280	Yes	Yes
GATA5	20	g.61039343T>C	3'UTR	rs7344065					0.260	5.441	No	N/A
GATA5	20	g.61039308 G>A	3'UTR	rs41284978					0.010	2.092	No	N/A
GATA5	20	g.61039068G>A	3'UTR	rs41284976					0.188	1.134	No	N/A
GATA5	20	g.61038900T>C	3'UTR	rs6089386					0.083	5.097	No	N/A
GATA5	20	g.61038853G>A	3'UTR	rs73149254					0.010	3.777	No	N/A
GATA5	20	g.61038673AC>A	Deletion (3'UTR)	rs34652033					0.240	3.578	Yes	Yes
NKX2-5	5	g.172662024T>C	Synonymous	rs2277923	1	c.292T>C	p.E21E		0.385	9.502	No	N/A
NKX2-5	5	g.172660535T>A	Intronic	rs56265301					0.021	0.723	No	N/A
NKX2-5	5	g.172660527AT>A	Deletion (intronic)	rs55880439					0.333	0.639	Yes	Yes
NKX2-5	5	g.172660526AAT>A	Deletion (intronic)	Novel					0.021	0.617	Yes	No
NKX2-5	5	g.172660523T>A	Intronic	rs3095871					0.188	1.480	No	N/A

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
NKX2-5	5	g.172660522AAT>A	Deletion (intronic)	Novel					0.010	0.431	Yes	No
NKX2-5	5	g.172660294 G>C	Intronic	rs183405705					0.042	4.019	No	N/A
NKX2-5	5	g.172660004C>T	Synonymous	rs72554028	2	c.772C>T	p.Q181Q		0.010	9.591	No	N/A
NKX2-5	5	g.172659511C>A	3'UTR	rs703752					0.260	5.656	No	N/A
NKX2-5	5	g.172659219C>T	3'UTR	Novel					0.010	6.614	Yes	Yes
NOS3	7	g.150687687C>T	Promoter	rs11771443					0.115	4.511	No	N/A
NOS3	7	g.150688085C>T	Promoter	rs77017676					0.031	4.113	No	N/A
NOS3	7	g.150688109C>T	Promoter	rs117810632					0.010	0.894	No	N/A
NOS3	7	g.150692444G>A	Intronic	rs1800781					0.146	8.155	No	N/A
NOS3	7	g.150695425C>T	Intronic	rs142683800					0.010	8.661	No	N/A
NOS3	7	g.150695726T>C	Synonymous	rs1549758	7	c.1070T>C	p.D258D		0.333	3.530	No	N/A
NOS3	7	g.150696008A>G	Intronic	rs1007311					0.344	2.343	No	N/A
NOS3	7	g.150696066C>T	Synonymous	rs79468462	8	c.1145C>T	p.N283N		0.010	2.561	No	N/A
NOS3	7	g.150696111T>G	Missense	rs1799983	8	c.1190T>G	p.D298E	0.000 (Benign)	0.844*	0.198	Yes	Yes
NOS3	7	g.150698349G>A	Missense	rs150935488	11	c.1560 G>A	p.A422T	0.098 (Benign)	0.010	2.648	Yes	Yes
NOS3	7	g.150698745TG>T	Deletion (intronic)	Novel					0.250	0.522	Yes	No
NOS3	7	g.150698879A>G	Intronic	rs1800780					0.490	8.702	No	N/A
NOS3	7	g.150699250G>T	Intronic	rs1800782					0.094	0.551	No	N/A
NOS3	7	g.150700637A>G	Intronic	rs73167652					0.094	3.136	No	N/A
NOS3	7	g.150700946C>A	Intronic	rs3918227					0.104	6.376	No	N/A
NOS3	7	g.150700993T>A	Intronic	Novel					0.010	8.357	Yes	Yes

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
NOS3	7	g.150704101C>T	Intronic	Novel					0.010	0.477	Yes	Yes
NOS3	7	g.150706177G>A	Intronic	rs3730006					0.031	4.707	No	N/A
NOS3	7	g.150706190G>T	Intronic	rs143037297					0.010	2.997	No	N/A
NOS3	7	g.150706383C>A	Intronic	rs753482					0.302	1.074	No	N/A
NOS3	7	g.150709571G>T	Intronic	rs7830					0.427	6.843	No	N/A
NOS3	7	g.150711505C>G	3'UTR	rs117078328					0.010	7.489	No	N/A
NOTCH1	9	g.139389184A>G	3'UTR	rs6563					0.635*	3.822	No	N/A
NOTCH1	9	g.139390397C>T	3'UTR	rs3124591					0.458	0.046	No	N/A
NOTCH1	9	g.139391338C>T	Missense	rs61751489	34	c.6853C>T	p.V2285I	0.004 (Benign)	0.031	0.501	Yes	Yes
NOTCH1	9	g.139391636G>A	Synonymous	rs2229974	34	c.6555G>A	p.D2185D		0.469	5.818	No	N/A
NOTCH1	9	g.139393162G>A	Intronic	rs3124592					0.573*	0.836	No	N/A
NOTCH1	9	g.139393175A>G	Intronic	rs3124593					0.437	5.643	No	N/A
NOTCH1	9	g.139393307A>G	Intronic	rs9632944					0.052	2.000	No	N/A
NOTCH1	9	g.139440848C>T	Promoter	N/A					0.010	9.694	No	N/A
NOTCH1	9	g.139396113T>A	Intronic	rs11574906					0.948*	3.968	No	N/A
NOTCH1	9	g.139396408A>G	Intronic	rs3124594					0.427	0.208	No	N/A
NOTCH1	9	g.139396690C>T	Intronic	rs75842134					0.010	3.006	No	N/A
NOTCH1	9	g.139397557C>G	Intronic	rs34383263					0.052	5.166	No	N/A
NOTCH1	9	g.139397707G>A	Synonymous	rs10521	27	c.5094G>A	p.D1698D		0.375	7.914	No	N/A
NOTCH1	9	g.139399641G>A	Intronic	rs13300218					0.052	0.016	No	N/A
NOTCH1	9	g.139399876G>A	Missense	rs369915496	25	c.4472G>A	p.T1491M	0.870 (Possibly damaging)	0.010	17.680	Yes	Yes

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
NOTCH1	9	g.139400219G>A	Missense	rs61751542	25	c.4129G>A	p.P1377S	0.000 (Benign)	0.031	0.224	Yes	Yes
NOTCH1	9	g.139400320G>A	Missense	rs183156491	25	c.4028G>A	p.A1343V	0.944 (Possibly damaging)	0.010	17.590	Yes	Yes
NOTCH1	9	g.139400904C>T	Intronic	rs4880098					0.427	2.649	No	N/A
NOTCH1	9	g.139417590C>T	Missense	N/A	4	c.454C>T	p.G152S	0.969 (Probably damaging)	0.010	19.740	Yes	Yes
NOTCH1	9	g.139401233C>T	Missense	rs61751543	23	c.3836C>T	p.R1279H	0.019 (Benign)	0.021	16.230	Yes	Yes
NOTCH1	9	g.139401646T>C	Intronic	rs11574902					0.052	1.758	No	N/A
NOTCH1	9	g.139402663T>C	Intronic	rs3124597					0.510*	0.150	No	N/A
NOTCH1	9	g.139402715G>A	Synonymous	rs61751546	20	c.3294G>A	p.S1098S		0.010	3.725	No	N/A
NOTCH1	9	g.139402876G>A	Intronic	rs201733983					0.010	1.982	No	N/A
NOTCH1	9	g.139402908T>C	Intronic	rs3812603					0.510*	1.388	No	N/A
NOTCH1	9	g.139403554T>C	Intronic	rs3124598					0.500	1.010	No	N/A
NOTCH1	9	g.139405093G>A	Intronic	rs36119806					0.063	3.683	No	N/A
NOTCH1	9	g.139405154G>A	Synonymous	rs11574895	17	c.2691G>A	p.A897A		0.010	1.584	No	N/A
NOTCH1	9	g.139405181G>A	Synonymous	rs61751548	17	c.2664G>A	p.H888H		0.010	1.145	No	N/A
NOTCH1	9	g.139405261C>T	Intronic	rs3125001					0.396	1.591	No	N/A
NOTCH1	9	g.139412553C>A	Intronic	Novel					0.010	1.621	Yes	No
NOTCH1	9	g.139405350G>A	Intronic	rs117063264					0.031	3.105	No	N/A
NOTCH1	9	g.139405361A>G	Intronic	rs3125002					0.448	2.553	No	N/A
NOTCH1	9	g.139405584C>T	Intronic	rs148381982					0.031	1.630	No	N/A
NOTCH1	9	g.139407932A>G	Synonymous	rs2229971	14	c.2265A>G	p.N755N		0.021	0.070	No	N/A

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
NOTCH1	9	g.139408952C>T	Intronic	rs191892426					0.010	6.087	No	N/A
NOTCH1	9	g.139410177T>C	Intronic	rs3124603					0.396	4.623	No	N/A
NOTCH1	9	g.139410424A>G	Intronic	rs3125006					0.333	1.136	No	N/A
NOTCH1	9	g.139410437C>T	Synonymous	rs148331061	10	c.1665C>T	p.T555T		0.031	8.010	No	N/A
NOTCH1	9	g.139410467G>A	Synonymous	rs11574889	10	c.1635G>A	p.D545D		0.010	7.847	No	N/A
NOTCH1	9	g.139412385G>T	Synonymous	Novel	8	c.1260G>T	p.A420A		0.021	10.220	Yes	No
NOTCH1	9	g.139410560G>A	Intronic	Novel					0.031	5.448	Yes	No
NOTCH1	9	g.139410559A>G	Intronic	Novel					0.083	1.141	Yes	No
NOTCH1	9	g.139411880G>A	Intronic	rs9411254					0.344	2.273	No	N/A
NOTCH1	9	g.139412197G>A	Intronic	rs9411208					0.490	4.929	No	N/A
NOTCH1	9	g.139410536GC>G	Deletion (coding)	Novel	10				0.219	34.000	Yes	No
NOTCH1	9	g.139405287AC>A	Deletion (intronic)	Novel					0.010	4.085	Yes	Yes
NOTCH1	9	g.139412884C>T	Intronic	rs3125009					0.344	0.975	No	N/A
NOTCH1	9	g.139412885G>C	Intronic	rs149384840					0.010	0.921	No	N/A
NOTCH1	9	g.139413908C>T	Synonymous	rs2229975	5	c.852C>T	p.P284P		0.146	10.250	Yes	Yes
NOTCH1	9	g.139401148C>T	Intronic	N/A					0.010	9.209	No	N/A
NOTCH1	9	g.139417612G>A	Synonymous	rs373713957	4	c.432G>A	p.C144C		0.010	8.736	No	N/A
NOTCH1	9	g.139418260A>G	Synonymous	rs4489420	3	c.312A>G	p.N104N		0.531*	3.339	No	N/A
NOTCH1	9	g.139440845G>A	Promoter	rs3013306					0.333	10.660	Yes	Yes
NOTCH1	9	g.139393586G>A	Synonymous	N/A	32	c.6060G>A	p.D2020D		0.010	0.783	No	N/A
NOTCH1	9	g.139440852A>G	Promoter	rs3013307					0.312	10.080	Yes	Yes
PDIA2	16	g.329578G>A	Promoter	rs421123					0.063	0.884	No	N/A

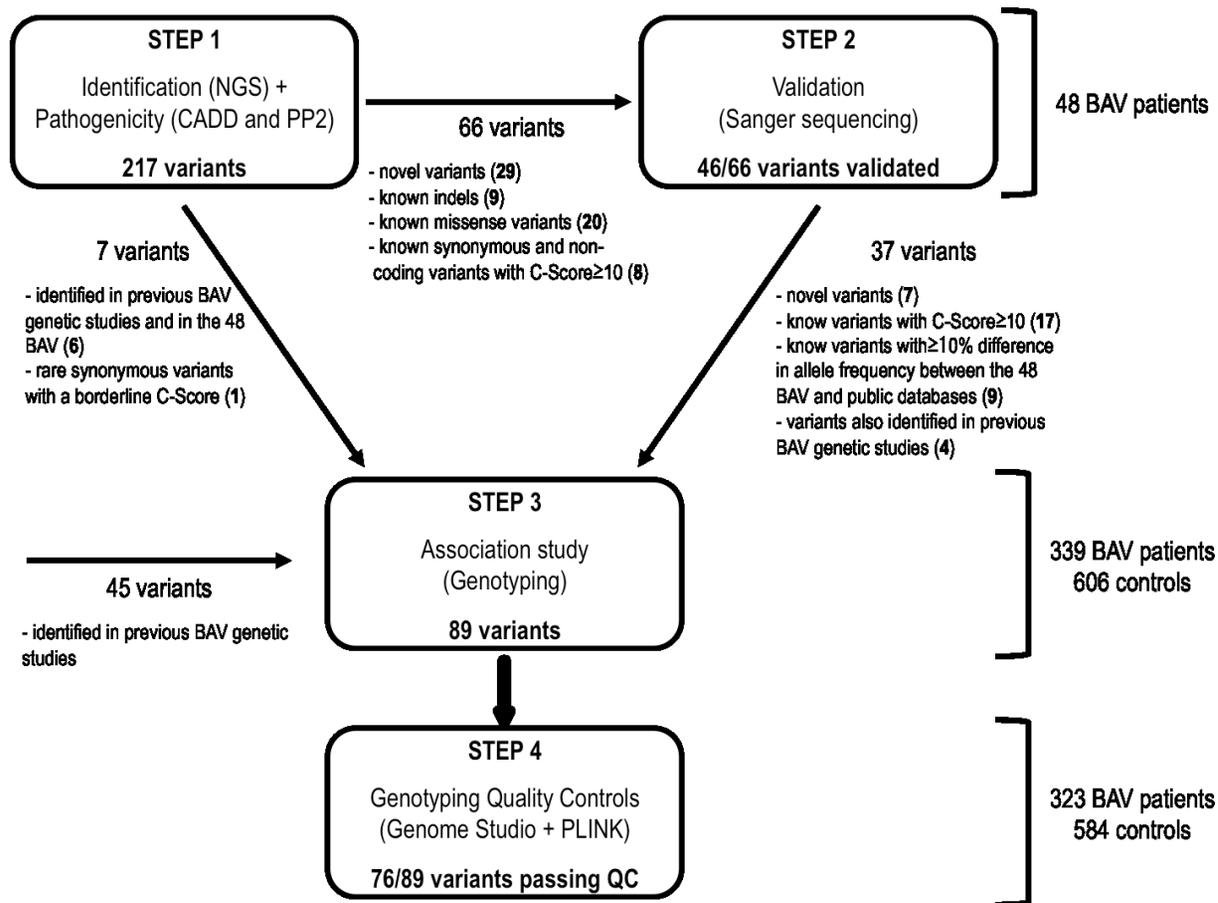
Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
PDIA2	16	g.329671T>C	Promoter	rs373271					0.052	3.857	No	N/A
PDIA2	16	g.329710C>T	Promoter	rs2858001					0.052	1.322	No	N/A
PDIA2	16	g.333138T>C	5'UTR	rs28365941	6				0.188	6.927	No	N/A
PDIA2	16	g.333146C>T	5'UTR	rs421195	6				0.177	0.020	No	N/A
PDIA2	16	g.333284C>T	Missense	rs45455191	6	c.1223C>T	p.P39S	0.630 (Possibly damaging)	0.010	5.055	No	N/A
PDIA2	16	g.334543C>G	Missense	rs45614840	7	c.1464C>G	p.T119R	1.000 (Probably damaging)	0.094	13.790	Yes	Yes
PDIA2	16	g.334577A>AC	Insertion (coding)	Novel	7				0.104	9.224	Yes	No
PDIA2	16	g.334580G>C	Synonymous	rs432925	7	c.1501G>C	p.P131P		0.177	0.088	No	N/A
PDIA2	16	g.334732C>T	Synonymous	rs45593734	8	c.1588C>T	p.D160D		0.156	0.097	No	N/A
PDIA2	16	g.334809G>T	Intronic	rs182466191					0.010	0.163	No	N/A
PDIA2	16	g.334890G>A	Missense	rs419949	9	c.1661G>A	p.E185K	0.024 (Benign)	0.260	6.194	Yes	Yes
PDIA2	16	g.335185G>A	Synonymous	rs45503892	10	c.1888G>A	p.T260T		0.031	0.902	No	N/A
PDIA2	16	g.336377C>G	Missense	rs45529833	13	c.2252C>G	p.P382A	0.999 (Probably damaging)	0.010	13.080	Yes	Yes
PDIA2	16	g.336381CCT>C	Deletion (frameshift)	rs375604412	13	c.1148_1149 delCT	p.P383R (causing p.V390X)		0.010	14.350	Yes	Yes
PDIA2	16	g.336396 G>A	Missense	rs400037	13	c.2271G>A	p.R388Q	0.005 (Benign)	0.229	0.021	Yes	Yes
PDIA2	16	g.336421G>A	Synonymous	rs45519635	13	c.2296G>A	p.K396K		0.010	7.660	No	N/A

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
PDIA2	16	g.336596G>T	Missense	Novel	14	c.2391G>T	p.W428L	0.995 (Probably damaging)	0.010	23.200	Yes	No
PDIA2	16	g.336660G>A	Synonymous	rs11647490	14	c.2455G>A	p.T449T		0.469	1.354	No	N/A
PDIA2	16	g.336701ACT>A	Deletion (frameshift)	rs201624048	14	c.1388_1389 delCT	p.L464Q (causing p.I476X)		0.010	14.940	Yes	Yes
PDIA2	16	g.336731G>A	Missense	rs116969376	14	c.2526G>A	p.R473Q	0.839 (Possibly damaging)	0.010	12.480	Yes	Yes
PDIA2	16	g.336916C>T	Missense	rs1048786	15	c.2612C>T	p.P502S	0.002 (Benign)	0.135	10.800	Yes	Yes
TGFBR2	3	g.30647160A>G	Promoter	rs3087465					0.219	4.964	No	N/A
TGFBR2	3	g.30686414A>G	Intronic	rs1155705					0.333	1.835	No	N/A
TGFBR2	3	g.30713126 T>A	Intronic	rs11466512					0.302	1.125	No	N/A
TGFBR2	3	g.30713370GC>G	Deletion (coding)	Novel	5				0.010	37.000	Yes	No
TGFBR2	3	g.30713737C>T	Synonymous	rs113194608	5	c.1519C>T	p.L379L		0.010	8.580	No	N/A
TGFBR2	3	g.30733401TTTATA>TTA	Deletion (3'UTR)	Novel					0.115	7.723	Yes	No
TGFBR2	3	g.30733402TTTATA>TTTA	Deletion (3'UTR)	rs35934901					0.438	0.892	Yes	Yes
TGFBR2	3	g.30733726G>A	3'UTR	Novel					0.010	9.380	Yes	Yes
TGFBR2	3	g.30733838C>G	3'UTR	rs11466531					0.063	4.881	No	N/A
TGFBR2	3	g.30733926C>A	3'UTR	rs17026332					0.021	8.804	No	N/A
TGFBR2	3	g.30734924A>C	3'UTR	rs1803446					0.052	3.306	No	N/A

Gene	Chr	Genomic position	Function	rs number (Build 138)	Exon	cDNA position	Protein position	PP2 score	48 BAV MAF	CADD scaled score	Sent for re-seq?	Validated by re-seq?
TGFBR2	3	g.30735156C>T	3'UTR	rs11466536					0.094	8.436	No	N/A

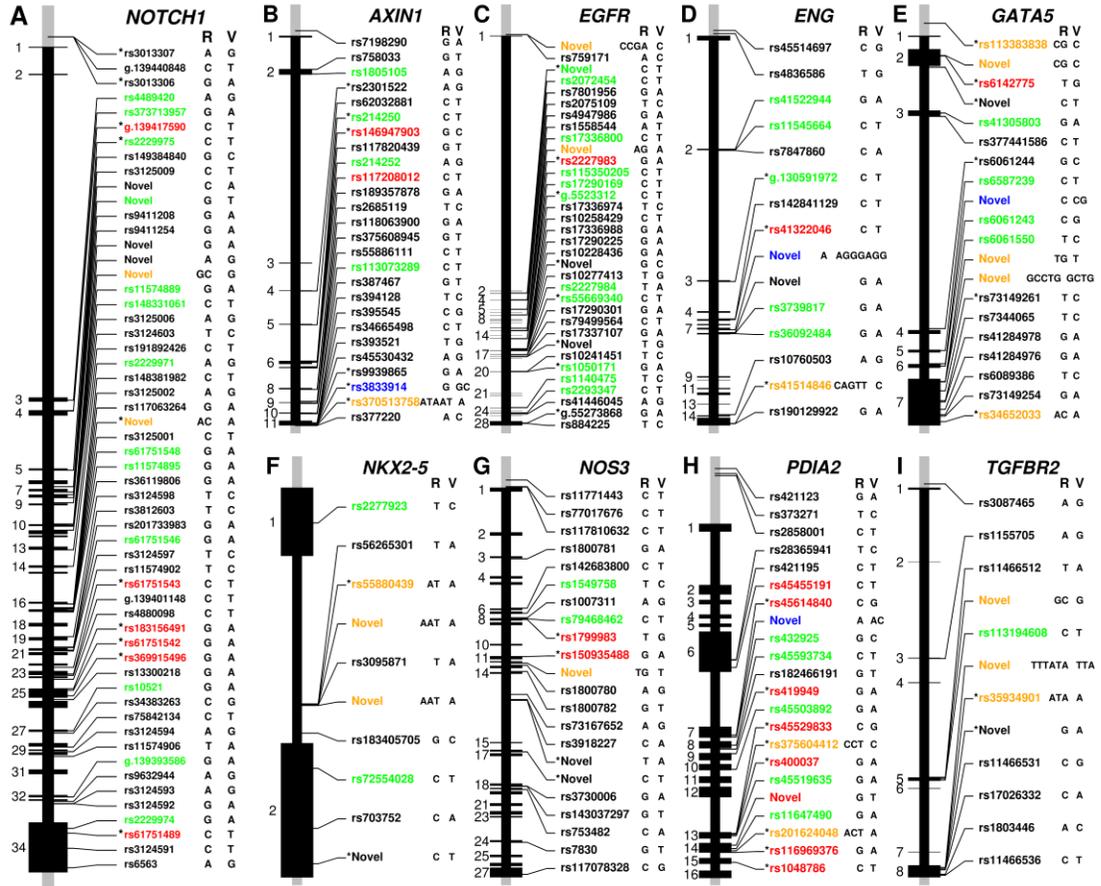
UTR: untranslated region; MAF: minor allele frequency; BAV: bicuspid aortic valve; CADD: Combined Annotation Dependant Depletion; N/A: information not available; PP2: PolyPhen-2.

*Variant alleles having a frequency > 0.500



Supplementary Figure 4.1 Flowchart diagram illustrating the major steps of the study

Flowchart diagram describing the main stages of the study with the number of genetic variants included in each stages and the criteria used for their selection/rejection. BAV, bicuspid aortic valve; CADD, Combined Annotation Dependant Depletion; NGS, next-generation sequencing; PP2, PolyPhen-2.



Supplementary Figure 4.2 DNA variants detected by targeted next-generation sequencing of 9 genes in 48 patients with BAV

A total of 217 DNA variants were detected. The exon-intron structure of each gene is illustrated on the left side of each graph. DNA variants are color-coded in red (missense), green (synonymous), blue (insertion), orange (deletion) and black (promoters, 3' and 5' UTR). Variants with an asterisk were validated by Sanger sequencing. Reference (R) and variant (V) alleles are shown on the right side of each graph. A) *NOTCH1*, B) *AXIN1*, C) *EGFR*, D) *ENG*, E) *GATA5*, F) *NKX2-5*, G) *NOS3*, H) *PDIA2* and I) *TGFB2R2*.

Chapitre 5 Conclusions et perspectives

Affectant approximativement 1% de la population mondiale³, la bicuspidie valvulaire aortique (BVA) est la malformation cardiaque congénitale la plus fréquente. Bien que quelques patients nécessitent une intervention durant les premiers mois de vie, la valve aortique à deux feuillets est fonctionnelle jusqu'à l'âge adulte chez la plupart des patients, ce qui explique son diagnostic généralement tardif.

L'évolution clinique des patients atteints de BVA est imprévisible et hétérogène. La grande majorité d'entre eux développent des complications qui nécessiteront ultimement le remplacement chirurgical de leur valve aortique^{34,38,50}. Cette intervention est cependant coûteuse⁹⁵, temporaire et ne constitue pas un traitement curatif⁹⁶. Considérant l'inefficacité des agents pharmacologiques à ralentir ou traiter les complications survenant chez les patients atteints de BVA^{80,86}, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques devient maintenant critique.

L'observation d'une agrégation de cas familiaux de BVA représente un argument de taille en faveur de l'existence d'une composante génétique de la BVA¹⁶⁰. Malgré cela, la pénétrance incomplète et l'impressionnante hétérogénéité phénotypique constatée chez ces familles compliquent l'élucidation de son patron d'héritabilité. La BVA est donc manifestement une pathologie complexe impliquant une combinaison de variations génétiques localisées dans plusieurs gènes.

Dans un effort visant à identifier l'étiologie génétique de la BVA, le gène *NOTCH1* et plusieurs autres ont été associés à la morphogénèse de la valve aortique ou à la BVA chez des modèles animaux ou des patients atteints^{36,176,181–186,206,225,238,239,243,252,256,260,274,300,301}. Toutefois, dans des familles présentant plus d'un membre affecté par la BVA, une variation génétique identifiée comme causale chez un individu atteint ne ségrège pas toujours avec la présence de la malformation au sein de la famille. Ce constat s'applique aux études investiguant plusieurs familles ou cas sporadiques de BVA. Il est également important de préciser que certains gènes (tel que *EGFR*) ont été associés à la formation de la valve aortique uniquement chez des modèles animaux et que leur implication potentielle dans le développement de la BVA chez l'humain reste à confirmer. Finalement, des études regroupant un plus grand nombre de patients sont nécessaires afin de préciser l'état des connaissances en génétique de la BVA, car le manque de puissance statistique a jusqu'alors limité les progrès dans ce domaine.

L'objectif du présent projet de recherche consistait à identifier des variations génétiques associées à la BVA chez les Canadiens français afin de préciser l'étiologie génétique de cette malformation cardiaque congénitale. Pour ce faire, 339 patients avec une BVA confirmée lors de la chirurgie de remplacement valvulaire aortique et 606 individus contrôles présentant une valve aortique morphologiquement

normale ont été recrutés via la banque de tissus de l'IUCPQ. La détection de variations génétiques dans neuf gènes candidats pour la BVA (*NOTCH1*, *AXIN1*, *PDIA2*, *EGFR*, *ENG*, *GATA5*, *NKX2-5*, *NOS3* et *TGFBR2*) a été réalisée par séquençage d'ADN nouvelle génération chez un sous-groupe de 48 patients atteints de BVA. Suite à l'évaluation *in silico* de l'impact délétère de chaque variation génétique identifiée par le séquençage nouvelle génération, un grand nombre de variations ont été validées par séquençage d'ADN Sanger. L'association de variations génétiques avec la BVA a été réalisée en comparant les fréquences alléliques de l'ensemble des patients atteints et des contrôles. Ces fréquences alléliques ont été obtenues lors du génotypage de 89 variations provenant des résultats du séquençage nouvelle génération ou de la littérature précédente sur la BVA.

Neuf nouvelles variations génétiques jamais caractérisées auparavant ont été identifiées par le séquençage nouvelle génération et confirmées par séquençage Sanger dans le cadre de ces travaux de recherche. Toutefois, aucune de ces variations n'était considérée comme potentiellement délétère par CADD (score CADD \geq 10). Un total de 19 variations génétiques ont été évaluées comme potentiellement délétères par CADD lors de cette étude, dont sept localisées dans le gène *NOTCH1*. La majorité des 19 variations génétiques potentiellement délétères étaient également situées dans les régions codantes des gènes (variations génétiques silencieuses, faux ou non-sens).

Une seule variation génétique (*EGFR* rs17290301) a été associée à la BVA dans cette étude. Des variations additionnelles ont également été associées à la pathologie exclusivement chez les hommes (*EGFR* rs533525993 et *TEX26* rs12857479) et chez les femmes (*NOTCH1* rs61751489, *TGFBR2* rs1155705 et *NKX2-5* rs2277923), suggérant une étiologie de la BVA différente selon le genre.

Comme décrit dans l'introduction, le gène *EGFR* a jusqu'alors été relié à la formation de la valve aortique chez des modèles murins seulement. Lorsque ce gène est diminué ou absent chez ces modèles animaux, une hyperplasie des feuillets valvulaires aortiques parfois accompagnée de sténose aortique calcifiante ou d'insuffisance aortique est observée^{36,209,210}. L'association entre la variation intronique rs17290301 et la BVA dans le cadre de ces travaux de recherche n'a donc jamais été reliée à la BVA ou à quelque malformation cardiaque que ce soit chez l'humain. Cependant, comme cette variation génétique a un faible score CADD (score CADD=4,29) et qu'elle ne semble pas située dans une région de l'ADN liant un facteur de transcription, il est probable qu'elle n'ait que peu d'impact sur la protéine encodée par le gène *EGFR* ou sur l'expression d'autres gènes avoisinants. Chez les hommes, la variation génétique silencieuse rs533525993 dans le gène *EGFR* est localisée dans le 15^e exon du gène, qui code pour une partie du domaine riche en cystéine de la portion extracellulaire du récepteur transmembranaire. Bien que cette variation génétique particulière n'ait jamais été associée à une

pathologie quelconque, des variations génétiques dans cette région du gène ont été recensées chez des patients atteints de gliomes. Ces variations résultent en une augmentation de la phosphorylation du récepteur, ce qui augmente la croissance cellulaire *in vitro*. Ceci suggère que la variation associée à la BVA chez les hommes pourrait causer un phénotype valvulaire semblable à celui rencontré chez les modèles animaux.

Cette étude a permis de révéler la présence d'une association entre la variation génétique rs12857479 du gène *testis expressed 26 (TEX26)* et la BVA chez les hommes. Bien que située dans un gène méconnu, cette variation génétique altérant l'épissage a été associée à la BVA dans une étude évaluant l'exome complet de trois patients atteints de BVA³⁰⁶. Toutefois, elle n'a pas été investiguée davantage dû à sa grande fréquence dans la population. Le score CADD associé à cette variation (score CADD=22,50) suggère que cette dernière pourrait jouer un rôle dans le développement de la BVA chez les hommes.

Comme décrit ci-haut, le gène *NOTCH1* est le gène candidat le plus sérieux permettant d'expliquer la composante génétique de la BVA et de multiples variations génétiques dans ce gène ont été associées à des cas familiaux et sporadiques de la maladie. L'association entre la variation faux-sens rs61751489 et la BVA chez les femmes consiste en l'association la plus significative détectée lors de la présente étude. Elle résulte en une substitution de l'acide aminé valine pour une isoleucine à la position 2285 de la protéine encodée par le gène. Cette variation a été identifiée dans une étude précédente chez des patients non apparentés mais les sexes des patients atteints n'ont pas été divulgués et la variation n'a pas été analysée davantage en raison de sa présence chez les individus contrôles¹⁸¹. D'autres travaux antérieurs ont également détecté cette variation chez des patients atteints de sténose aortique calcifiante sévère sur valve tricuspide¹⁸⁰.

Particulièrement associées aux syndromes de Marfan et de Loeys-Dietz, les variations dans le gène *TGFBR2* ont également été identifiées chez une poignée d'individus atteints de BVA. La variation intronique rs1155705 associée à la BVA chez les femmes dans cette étude a été identifiée dans une publication précédente chez deux patients non apparentés atteints de BVA dont les sexes n'ont pas été divulgués¹⁸². Cette variation n'a pas été investiguée davantage à cause de sa prévalence importante dans la population. Cette variation est considérée bénigne, n'étant pas située dans une séquence d'ADN liant un facteur de transcription et ayant un faible score CADD.

Chez la souris, la diminution de l'expression du gène *NKX2-5* engendre une fréquence de BVA beaucoup plus importante que celle observée chez les rongeurs ayant une expression normale de ce gène²⁴³. Pourtant, seulement quelques études ont identifié des variations génétiques dans *NKX2-5*

chez des patients atteints de BVA. Dans l'une de ces études²⁵², la variation silencieuse rs2277923 associée à la BVA chez les femmes dans le présent projet de recherche a été identifiée chez un patient atteint de BVA et d'anévrisme de l'aorte ascendante et un patient contrôle. Cette variation a aussi été détectée chez des patients atteints de diverses malformations congénitales cardiaques^{249,250,254}. Cette variation semble réduire l'activité transactivationnelle de la protéine NKX2-5 de 20%, ce qui pourrait expliquer son score CADD situé juste en-dessous du seuil séparant les variations génétiques bénignes de celles potentiellement délétères (score CADD=9,50).

Il est important d'adresser les limitations de ce projet de recherche. Tout d'abord, l'approche gène candidat utilisée dans le cadre de ces travaux, bien qu'indiquée pour étudier les maladies complexes³¹⁰, est limitée par les connaissances relatives à l'étiologie de la pathologie. En effet, la sélection de gènes candidats a été basée sur la fonction ou l'association avec des voies de signalisation vraisemblablement impliquées dans le développement de la pathologie. Ainsi, dans ce projet de recherche, certains gènes importants pour le développement de la BVA ont pu être omis de la sélection car ils n'ont pas été associés à la cardiogenèse ou aux mécanismes cellulaires reliés à la BVA dans la littérature scientifique antérieure. Malgré cet inconvénient, l'approche gène candidat a une puissance statistique plus élevée que les études d'association et elle réduit substantiellement la proportion du génome à étudier, ce qui facilite l'analyse. De plus, dans le cadre de ce projet de maîtrise, une sélection rigoureuse des gènes et des variations génétiques testés a été réalisée afin d'assurer des résultats optimaux. Les neuf gènes candidats ont été sélectionnés suite à une revue de littérature exhaustive sur la génétique de la BVA. Les nouvelles variations génétiques identifiées par le séquençage nouvelle génération et validées par re-séquençage, les variations considérées comme potentiellement délétères ainsi que celles provenant de la littérature précédente sur la BVA ont été priorisées pour le génotypage.

L'hétérogénéité phénotypique des patients atteints de BVA recrutés dans le cadre de cette étude peut être considérée comme une limitation additionnelle. En effet, il est plus ardu d'identifier les fondements moléculaires d'une maladie complexe si les patients étudiés sont hétérogènes. Les effets des variations génétiques causales peuvent être «dilués», ce qui a pour conséquence de minimiser leur importance. Dans le présent projet de recherche, des patients atteints de BVA présentant divers profils phénotypiques (sténose aortique calcifiante, insuffisance aortique, dilatation et anévrisme de l'aorte ascendante, etc.) ont été étudiés. Considérant que ces différentes complications valvulaires et aortiques ont possiblement des origines génétiques distinctes, la capacité de cette étude à identifier des variations génétiques associées à la BVA peut avoir été limitée. De plus, l'information concernant le type de fusion de la valve aortique des patients atteints de BVA n'était pas disponible dans le cadre

de ce projet. Il n'a donc pas été possible de vérifier la présence d'une association entre des variations génétiques et les différents types de BVA, ce qui aurait potentiellement supporté l'hypothèse voulant que les types de BVA ont des origines étiologiques distinctes²².

L'évaluation de l'impact délétère des variations génétiques à l'aide d'outils bio-informatiques comporte des faiblesses. La prédiction effectuée par ces outils *in silico* peut guider la sélection des variations génétiques à investiguer dans le cadre d'une pathologie, mais il ne s'agit pas d'une méthode sans failles. Par exemple, la sensibilité et la spécificité de l'outil *Combined Annotation Dependant Depletion* (CADD)³⁰⁷ utilisé dans ce projet de recherche sont estimés à 80 et 75%, respectivement³¹¹. C'est donc dire qu'environ 20% des variations génétiques potentiellement dommageables ne sont pas considérées comme telles et que 15% des variations bénignes sont étiquetées comme potentiellement dommageables. Dans les travaux de recherche rapportés dans ce mémoire, le seuil de score CADD utilisé pour dissocier les variations bénignes de celles potentiellement délétères (≥ 10) a permis l'inclusion d'un maximum de variations tout en respectant les recommandations des développeurs de CADD. Il est également pertinent de mentionner que l'utilisation d'une méthode combinée comme CADD est plus performante qu'une méthode utilisant une seule technique d'évaluation comme PolyPhen-2 ou SIFT pour séparer les variations potentiellement délétères des variations bénignes³¹¹. Il existe de nombreux outils *in silico* permettant d'évaluer l'impact dommageable des variations génétiques comportant des forces et des faiblesses distinctes. L'utilisation de plusieurs de ces outils est donc recommandé afin d'avoir un portrait plus complet de l'impact d'une variation donnée.

Comme décrit ci-haut, les faibles fréquences alléliques des variations génétiques nouvelles ou potentiellement délétères identifiées contribuent à expliquer l'absence d'association entre ces dernières et la BVA. Une étude rassemblant un nombre plus important de patients atteints de BVA et de contrôles pourrait permettre d'investiguer davantage ces variations.

L'une des principales forces de ce projet de recherche est l'important nombre de patients atteints de BVA recrutés comparativement à la majorité des études précédentes portant sur la génétique de la BVA. Cette plus grande taille d'échantillon permet la détection de variations génétiques rares chez les patients atteints de BVA. Elle assure également une meilleure puissance statistique pour la détection d'association entre des variations et la BVA.

La confirmation de la BVA par le chirurgien cardiaque lors de la chirurgie de remplacement valvulaire aortique représente également un avantage important de ces travaux de maîtrise. La majorité des études antérieures sur la BVA évaluent la morphologie de la valve aortique par des méthodes d'imagerie médicale. Il s'agit d'une technique moins invasive, mais également moins fiable,

particulièrement lorsque la valve aortique du patient est sévèrement calcifiée¹⁵. Confirmer la BVA au moment de la chirurgie permet d'assurer l'homogénéité de l'échantillon étudié.

Le caractère innovant de ce projet de recherche réside d'abord et avant tout dans la possibilité que des variations génétiques spécifiques au genre soient impliquées dans le développement de la BVA. Jusqu'alors, l'investigation de la disparité génétique existant entre les hommes et les femmes atteints de BVA n'a jamais été exploitée. Toutefois, quelques différences associées au genre chez la BVA et ses complications valvulaires et aortiques concomitantes ont été récemment observées. Lorsqu'appariés pour la sévérité de la sténose aortique calcifiante sur valve tricuspide, les hommes sont sujets à un fardeau de calcium plus élevé que les femmes³¹². Le remodelage aortique diffère également entre les hommes et les femmes atteints de BVA et d'anévrismes de l'aorte thoracique concomitant³¹³. Les dissections aortiques de type De Bakey I sont plus fréquentes et affectent une plus grande portion de l'aorte chez les femmes atteintes de BVA³¹⁴. Par conséquent, l'existence de profils génétiques, moléculaires et cellulaires spécifiques au genre est de plus en plus apparente dans la BVA et ses complications valvulaires et aortiques.

Cette étude a également permis d'identifier des associations entre la BVA et des variations génétiques localisées dans le gène *EGFR*. Jusqu'à présent, ce gène avait seulement été associé à la formation de la valve aortique chez des modèles murins.

Quoique largement utilisé dans tous les domaines des sciences de la vie à l'heure actuelle, l'emploi du séquençage nouvelle génération lors de cette étude constitue aussi un avancement par rapport à la littérature précédente sur la BVA. En effet, une seule étude en génétique de la BVA a fait usage du séquençage nouvelle génération préalablement aux présents travaux de recherche¹⁸⁵. Les auteurs de cette publication ont réalisé le séquençage en combinant l'ADN de 78 patients non apparentés atteints de BVA dans des pools d'ADN. Cette technique leur a permis de séquencer 97 gènes associés à la cardiogénèse ou aux malformations cardiaques congénitales à moindre coût tout en obtenant des résultats satisfaisants. Il s'agit d'une méthodologie économique différant substantiellement de celle utilisée dans le cadre des travaux rapportés dans ce mémoire. Toutefois, l'élaboration des pools d'ADN est fastidieuse et il est crucial que tous les ADN d'un même pool y soient représentés en proportion équivalente pour assurer l'exactitude des résultats³¹⁵. Une première étude investiguant l'exome entier de patients atteints de BVA a été récemment publiée³⁰⁶, mais elle a été réalisée chez trois patients seulement.

Afin d'appuyer l'existence de différences génétiques relatives au genre dans la BVA, les résultats obtenus lors de ce projet de maîtrise devront tout d'abord être répliqués dans des cohortes

indépendantes de patients atteints de BVA. L'introduction de ces variations génétiques dans des modèles cellulaires ou animaux constitue un autre objectif en lien avec ce projet. Il sera ainsi possible de confirmer la capacité de ces variations génétiques à induire la BVA ou des signes cliniques lui étant reliés, par exemple la surexpression de gènes ou de protéines pro-calcifiants chez des modèles cellulaires et la calcification ou la dilatation chez les modèles animaux.

Les résultats de cette étude ouvrent la voie à de multiples perspectives quant aux recherches à propos de la BVA. Les études antérieures, composées d'un faible nombre de patients en grande majorité de sexe masculin, ne possédaient pas la puissance statistique nécessaire permettant de détecter des distinctions génétiques ou cliniques entre les hommes et les femmes. À la lumière des résultats obtenus lors de ce projet de maîtrise, la caractérisation du développement et de la progression de la maladie chez les deux sexes s'avère maintenant cruciale. En retour, ces informations pourraient permettre un suivi optimal et des traitements ajustés à chaque patient. L'investigation des disparités entre les sexes masculin et féminin, tant au niveau de la distribution des types de BVA que des complications valvulaires et aortiques, doit également être adressée dans les études futures sur la BVA.

Finalement, les technologies de génomique à grande échelle telles que le séquençage de l'exome ou du génome complet ainsi que les études pan-génomiques doivent être mises à profit dans l'étude de la BVA. Cependant, outre les coûts considérables associés à l'utilisation de ces technologies, l'élaboration de telles études nécessite le recrutement d'un grand nombre de familles affectées ou de patients atteints de BVA phénotypés avec précision. Cela dit, il y a fort à parier que l'accessibilité grandissante de ces technologies et les efforts de collaboration internationale présentement déployés permettront de surmonter ces limitations. Assurément, les découvertes qui résulteront de ces études permettront de mieux comprendre les origines génétiques de la BVA ainsi que son mode de transmission.

Bibliographie

1. Tortora, G. J., Derrickson, B., Forest, M. & Martin, L. *Principes d'anatomie et de physiologie, 2e édition*. (Éditions du Renouveau Pédagogique/John Wiley and Sons, 2007).
2. Laforest, B. & Nemer, M. Genetic insights into bicuspid aortic valve formation. *Cardiol. Res. Pract.* **1**, (2012).
3. Hoffman, J. I. & Kaplan, S. The incidence of congenital heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1890–1900 (2002).
4. Steinberger, J., Moller, J. H., Berry, J. M. & Sinaiko, A. Echocardiographic Diagnosis of Heart Disease in Apparently Healthy Adolescents. *Pediatrics* **105**, 815–818 (2000).
5. Basso, C. *et al.* An echocardiographic survey of primary school children for bicuspid aortic valve. *Am. J. Cardiol.* **93**, 661–663 (2004).
6. Tutar, E., Ekici, F., Atalay, S. & Nacar, N. The prevalence of bicuspid aortic valve in newborns by echocardiographic screening. *Am. Heart J.* **150**, 513–515 (2005).
7. Movahed, M. R., Hepner, A. D. & Ahmadi-Kashani, M. Echocardiographic Prevalence of Bicuspid Aortic Valve in the Population. *Hear. Lung Circ.* **15**, 297–299 (2006).
8. Itagaki, S., Chiang, Y. & Tang, G. Why Does the Bicuspid Aortic Valve Keep Eluding Us. *Cardiol. Rev.* **January**, (2015).
9. Khan, W., Milsevic, M., Salciccioli, L. & Lazar, J. Low prevalence of bicuspid aortic valve in African Americans. *Am. Heart J.* **156**, 2007 (2008).
10. Chandra, S. *et al.* Bicuspid aortic valve: Inter-racial difference in frequency and aortic dimensions. *JACC Cardiovasc. Imaging* **5**, 981–989 (2012).
11. Joziasse, I. C. *et al.* Bicuspid stenotic aortic valves: Clinical characteristics and morphological assessment using MRI and echocardiography. *Netherlands Hear. J.* **19**, 119–125 (2011).
12. Nishimura, R. a *et al.* Report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on 2014 AHA / ACC Guideline for the Management of Patients With

Valvular Heart Disease A Report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Fo. *Circulation* **63**, e57–185 (2014).

13. Espinal, M. *et al.* Sensitivity and specificity of transesophageal echocardiography for determination of aortic valve morphology. *Am. Heart J.* **139**, 1071–1076 (2000).
14. Alegret, J. M., Palazón, O., Duran, I. & Vernis, J. M. Aortic valve morphology definition with transthoracic combined with transesophageal echocardiography in a population with high prevalence of bicuspid aortic valve. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **21**, 213–217 (2005).
15. Makkar, A., Siddiqui, T. S., Stoddard, M. F., Lewis, R. K. & Dawn, B. Impact of valvular calcification on the diagnostic accuracy of transesophageal echocardiography for the detection of congenital aortic valve malformation. *Echocardiography* **24**, 745–749 (2007).
16. Yousry, M. *et al.* Aortic valve type and calcification as assessed by transthoracic and transoesophageal echocardiography. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* 306–313 (2014).
17. Gleeson, T. G. *et al.* Steady-state free-precession (SSFP) cine MRI in distinguishing normal and bicuspid aortic valves. *J. Magn. Reson. Imaging* **28**, 873–878 (2008).
18. Malaisrie, S. C. *et al.* Cardiac magnetic resonance imaging is more diagnostic than 2-dimensional echocardiography in determining the presence of bicuspid aortic valve. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **144**, 370–376 (2012).
19. Lee, S. C. *et al.* Morphological assessment of the aortic valve using coronary computed tomography angiography, cardiovascular magnetic resonance, and transthoracic echocardiography: comparison with intraoperative findings. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* 1–12 (2012).
20. Tanaka, R. *et al.* Diagnostic value of cardiac CT in the evaluation of bicuspid aortic stenosis: Comparison with echocardiography and operative findings. *Am. J. Roentgenol.* **195**, 895–899 (2010).
21. Alkadhi, H. *et al.* Cardiac CT for the differentiation of bicuspid and tricuspid aortic valves: Comparison with echocardiography and surgery. *Am. J. Roentgenol.* **195**, 900–908 (2010).
22. Fernández, B. *et al.* Bicuspid Aortic Valves With Different Spatial Orientations of the Leaflets Are Distinct Etiological Entities. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 2312–2318 (2009).

23. Vergara, C., Viscardi, F., Antiga, L. & Luciani, G. B. Influence of Bicuspid Valve Geometry on Ascending Aortic Fluid Dynamics: A Parametric Study. *Artif. Organs* **36**, 368–378 (2012).
24. Bissell, M. M. *et al.* Aortic dilation in bicuspid aortic valve disease: Flow pattern is a major contributor and differs with valve fusion type. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **6**, 499–507 (2013).
25. Mahadevia, R. *et al.* Bicuspid aortic cusp fusion morphology alters aortic three-dimensional outflow patterns, wall shear stress, and expression of aortopathy. *Circulation* **129**, 673–682 (2014).
26. Fernandes, S. M. *et al.* Morphology of bicuspid aortic valve in children and adolescents. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1648–1651 (2004).
27. Fernandes, S. M., Khairy, P., Sanders, S. P. & Colan, S. D. Bicuspid Aortic Valve Morphology and Interventions in the Young. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 2211–2214 (2007).
28. Schaefer, B. M. *et al.* The bicuspid aortic valve: an integrated phenotypic classification of leaflet morphology and aortic root shape. *Heart* **94**, 1634–1638 (2008).
29. Thanassoulis, G. *et al.* Retrospective study to identify predictors of the presence and rapid progression of aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valves. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **5**, 821–828 (2008).
30. Buchner, S. *et al.* Variable phenotypes of bicuspid aortic valve disease: classification by cardiovascular magnetic resonance. *Heart* **96**, 1233–1240 (2010).
31. Huang, F. Q. & Le Tan, J. Pattern of aortic dilatation in different bicuspid aortic valve phenotypes and its association with aortic valvular dysfunction and elasticity. *Hear. Lung Circ.* **23**, 32–38 (2014).
32. Kang, J. W. *et al.* Association between bicuspid aortic valve phenotype and patterns of valvular dysfunction and bicuspid aortopathy: Comprehensive evaluation using MDCT and echocardiography. *JACC Cardiovasc. Imaging* **6**, 150–161 (2013).
33. Yetkin, E. & Waltenberger, J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int. J. Cardiol.* **135**, 4–13 (2009).
34. Lewin, M. B. & Otto, C. M. The bicuspid aortic valve: Adverse outcomes from infancy to old age. *Circulation* **111**, 832–834 (2005).

35. Bossé, Y., Mathieu, P. & Pibarot, P. Genomics. The Next Step to Elucidate the Etiology of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1327–1336 (2008).
36. Barrick, C. J. *et al.* Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6J but not 129S1/SvImJ mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H65–H75 (2009).
37. Gaudreault, N. *et al.* Replication of genetic association studies in aortic stenosis in adults. *Am. J. Cardiol.* **108**, 1305–1310 (2011).
38. Tzemos, N. *et al.* Outcomes in Adults With Bicuspid Aortic Valves. *JAMA* **300**, 1317–1325 (2008).
39. Michelena, H. I. *et al.* Incidence of aortic complications in patients with bicuspid aortic valves. *JAMA* **306**, 1104–1112 (2011).
40. Roberts, W. C., Vowels, T. J. & Ko, J. M. Natural History of Adults With Congenitally Malformed Aortic Valves (Unicuspid or Bicuspid). *Medicine (Baltimore)*. **91**, 287–308 (2012).
41. Wassmuth, R., Von Knobelsdorff-Brenkenhoff, F., Gruettner, H., Utz, W. & Schulz-Menger, J. Cardiac magnetic resonance imaging of congenital bicuspid aortic valves and associated aortic pathologies in adults. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **15**, 673–679 (2014).
42. Davies, M. J., Treasure, T. & Parker, D. J. Demographic characteristics of patients undergoing aortic valve replacement for stenosis: relation to valve morphology. *Heart* **75**, 174–178 (1996).
43. Roberts, W. C. & Ko, J. M. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation* **111**, 920–925 (2005).
44. Roberts, W. C. *et al.* Valve Structure and Survival in Septuagenarians Having Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis (+/-Aortic Regurgitation) With Versus Without Coronary Artery Bypass Grafting at a Single US Medical Center (1993 to 2005). *Am. J. Cardiol.* **100**, 1683–1690 (2007).
45. Roberts, W. C. *et al.* Valve Structure and Survival in Octogenarians Having Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis (+/-Aortic Regurgitation) With Versus Without Coronary Artery Bypass Grafting at a Single US Medical Center (1993 to 2005). *Am. J. Cardiol.* **100**, 1683–1690 (2007).

(2007).

46. Michelena, H. I. *et al.* Natural history of asymptomatic patients with normally functioning or minimally dysfunctional bicuspid aortic valve in the community. *Circulation* **117**, 2776–2784 (2008).
47. Barker, A. J. *et al.* Bicuspid aortic valve is associated with altered wall shear stress in the ascending aorta. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **5**, 457–466 (2012).
48. Moreno, P. R. *et al.* Increased macrophage infiltration and neovascularization in congenital bicuspid aortic valve stenosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **142**, 895–901 (2011).
49. Wang, R., Chen, W., Ma, Z., Li, L. & Chen, X. M1/M2 macrophages and associated mechanisms in congenital bicuspid aortic valve stenosis. *Exp. Ther. Med.* **7**, 935–940 (2014).
50. Siu, S. C. & Silversides, C. K. Bicuspid Aortic Valve Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 2789–2800 (2010).
51. Kiefer, T. L., Wang, A., Hughes, G. C. & Bashore, T. M. Management of patients with bicuspid aortic valve disease. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **13**, 489–505 (2011).
52. Pachulski, R. T. & Chan, K. L. Progression of aortic valve dysfunction in 51 adult patients with congenital bicuspid aortic valve: assessment and follow up by Doppler echocardiography. *Br. Heart J.* **69**, 237–240 (1993).
53. Ferencik, M. & Pape, L. a. Changes in size of ascending aorta and aortic valve function with time in patients with congenitally bicuspid aortic valves. *Am. J. Cardiol.* **92**, 43–46 (2003).
54. Andrei, A.-C. *et al.* Comparison of Outcomes and Presentation in Men-Versus-Women With Bicuspid Aortic Valves Undergoing Aortic Valve Replacement. *Am. J. Cardiol.* **116**, 250–255 (2015).
55. Benedik, J. *et al.* Comparison of ascending aortic cohesion between patients with bicuspid aortic valve stenosis and regurgitation. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **46**, e89–e93 (2014).
56. Al-Atassi, T. *et al.* Aortic root geometry in bicuspid aortic insufficiency versus stenosis: implications for valve repair. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **47**, e151–e154 (2015).

57. Lamas, C. C. & Eykyn, S. J. Bicuspid aortic valve--A silent danger: analysis of 50 cases of infective endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 336–341 (2000).
58. Kahveci, G. *et al.* Impact of Bicuspid Aortic Valve on Complications and Death. *Tex Hear. Inst J* **36**, 111–116 (2009).
59. Tribouilloy, C. *et al.* Clinical characteristics and outcome of infective endocarditis in adults with bicuspid aortic valves: a multicentre observational study. *Heart* **96**, 1723–1729 (2010).
60. Collins, J. a., Zhang, Y. & Burke, A. P. Pathologic findings in native infective endocarditis. *Pathol. - Res. Pract.* **210**, 997–1004 (2014).
61. Luk, A. *et al.* Native and prosthetic valve infective endocarditis : clinicopathologic correlation and review of the literature. *Malaysian J Pathol* **36**, 71–81 (2014).
62. Tadros, T. M., Klein, M. D. & Shapira, O. M. Ascending aortic dilatation associated with bicuspid aortic valve. Pathophysiology, molecular biology, and clinical implications. *Circulation* **119**, 880–890 (2009).
63. Folkersen, L. & Wagsater, D. Unraveling Divergent Gene Expression Profiles in Bicuspid and Tricuspid Aortic Valve Patients with Thoracic Aortic Dilatation: The ASAP Study. *Mol. Med.* **17**, 1 (2011).
64. Abdulkareem, N. *et al.* Dilatation of the remaining aorta after aortic valve or aortic root replacement in patients with bicuspid aortic valve: A 5-year follow-up. *Ann. Thorac. Surg.* **96**, 43–49 (2013).
65. Verma, S. & Siu, S. C. Aortic Dilatation in Patients with Bicuspid Aortic Valve. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1920–1929 (2014).
66. Yasuda, H. *et al.* Failure to prevent progressive dilation of ascending aorta by aortic valve replacement in patients with bicuspid aortic valve: comparison with tricuspid aortic valve. *Circulation* **108 Suppl** , I1291–I294 (2003).
67. LeMaire, S. a & Russell, L. Epidemiology of thoracic aortic dissection. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**, 103–113 (2011).
68. Daily, P. O., Trueblood, H. W., Stinson, E. B., Wuerflein, R. D. & Shumway, N. E. Management of Acute Aortic Dissections. *Ann. Thorac. Surg.* **10**, 237–47 (1970).

69. De Bakey, M. E. *et al.* Surgical Management of Dissecting Aneurysms of the Aorta. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **49**, 130–149 (1965).
70. Larson, E. W. & Edwards, W. D. Risk factors for aortic dissection: a necropsy study of 161 cases. *Am. J. Cardiol.* **53**, 849–855 (1984).
71. Girdauskas, E., Disha, K., Borger, M. A. & Kuntze, T. Risk of proximal aortic dissection in patients with bicuspid aortic valve: How to address this controversy? *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **18**, 355–359 (2014).
72. Epperlein, S., Mohr-Kahaly, S., Erbel, R., Kearney, P. & Meyer, J. Aorta and aortic valve morphologies predisposing to aortic dissection. An in vivo assessment with transoesophageal echocardiography. *Eur. Heart J.* **15**, 1520–1527 (1994).
73. Rylski, B. *et al.* Aortic Valve Morphology Determines the Presentation and Surgical Approach to Acute Type A Aortic Dissection. *Ann. Thorac. Surg.* **97**, 1991–1997 (2014).
74. Etz, C. D. *et al.* Acute type A aortic dissection: characteristics and outcomes comparing patients with bicuspid versus tricuspid aortic valve. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **48**, 142–150 (2015).
75. Wang, Y., Wu, B., Dong, L., Wang, C. & Shu, X. Type A aortic dissection in patients with bicuspid or tricuspid aortic valves: A retrospective comparative study in 288 Chinese patients. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* **44**, 172–177 (2013).
76. Eleid, M. F. *et al.* Type A aortic dissection in patients with bicuspid aortic valves: clinical and pathological comparison with tricuspid aortic valves. *Heart* **99**, 1668–74 (2013).
77. Gao, L. *et al.* The effect of beta-blocker therapy on progressive aortic dilatation in children and adolescents with Marfan's syndrome: A meta-analysis. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* **100**, 101–105 (2011).
78. Yetman, A. T., Bornemeier, R. a. & McCrindle, B. W. Usefulness of enalapril versus propranolol or atenolol for prevention of aortic dilation in patients with the marfan syndrome. *Am. J. Cardiol.* **95**, 1125–1127 (2005).
79. Brooke, B. S. *et al.* Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2787–2795 (2008).

80. Ohnemus, D., Oster, M. E., Gatlin, S., Jokhadar, M. & Mahle, W. T. The Effect of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors on the. *Congenit Hear. Dis* **10**, E1–5 (2015).
81. Stewart, B. F. *et al.* Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **29**, 630–634 (1997).
82. Rosenhek, R. *et al.* Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation* **110**, 1291–1295 (2004).
83. Moura, L. *et al.* Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium to Slow the Progression of Aortic Stenosis. *Changes* **49**, 554–561 (2007).
84. Cowell, S. J. *et al.* A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2389–2397 (2005).
85. Houslay, E. S. *et al.* Progressive coronary calcification despite intensive lipid-lowering treatment: a randomised controlled trial. *Heart* **92**, 1207–1212 (2006).
86. Rossebo, A. *et al.* Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1343–56 (2008).
87. Chan, K. L., Teo, K., Dumesnil, J. G., Ni, A. & Tam, J. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation* **121**, 306–14 (2010).
88. Van Der Linde, D. *et al.* Effects of rosuvastatin on progression of stenosis in adult patients with congenital aortic stenosis (PROCAS Trial). *Am. J. Cardiol.* **108**, 265–271 (2011).
89. Go, a. S. *et al.* Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2014 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **129**, 399–410 (2014).
90. Lee, R. *et al.* Fifteen-year outcome trends for valve surgery in North America. *Ann. Thorac. Surg.* **91**, 677–684 (2011).
91. Public Health Agency of Canada. *Tracking Heart Disease. Stroke* (2009).
92. Brown, J. M. *et al.* Isolated aortic valve replacement in North America comprising 108,687

patients in 10 years: Changes in risks, valve types, and outcomes in the Society of Thoracic Surgeons National Database. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **137**, 82–90 (2009).

93. Dunning, J. *et al.* Aortic valve surgery: Marked increases in volume and significant decreases in mechanical valve use - An analysis of 41,227 patients over 5 years from the Society for Cardiothoracic Surgery in Great Britain and Ireland National database. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **142**, 776–782 (2011).
94. Barreto-Filho, J. A. *et al.* Trends in aortic valve replacement for elderly patients in the United States, 1999-2011. *JAMA* **310**, 2078–85 (2013).
95. Sehatzadeh, S. *et al.* Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) for treatment of aortic valve stenosis: an evidence update. *Ont. Health Technol. Assess. Ser.* **13**, 1–40 (2013).
96. Pibarot, P. & Dumesnil, J. G. Prosthetic heart valves: Selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation* **119**, 1034–1048 (2009).
97. Hammermeister, K. *et al.* Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: Final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 1152–1158 (2000).
98. Moritz, a *et al.* Closing click of St Jude Medical and Duromedics Edwards bileaflet valves: complaints created by valve noise and their relation to sound pressure and hearing level. *Eur. Heart J.* **12**, 673–679 (1991).
99. Vesey, J. M. & Otto, C. M. Complications of prosthetic heart valves. *Curr Cardiol Rep* **6**, 106–111 (2004).
100. Collins, M. J., Butany, J., Borger, M. a, Strauss, B. H. & David, T. E. Implications of a congenitally abnormal valve: a study of 1025 consecutively excised aortic valves. *J. Clin. Pathol.* **61**, 530–536 (2008).
101. Wang, a., Harrison, J. K. & Bashore, T. M. Balloon aortic valvuloplasty. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **40**, 27–36 (1997).
102. Kapadia, S. *et al.* Outcomes of Inoperable Symptomatic Aortic Stenosis Patients Not Undergoing Aortic Valve Replacement. *JACC Cardiovasc. Interv.* **8**, 324–333 (2015).
103. Cribier, A. *et al.* Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for

calcific aortic stenosis: First human case description. *Circulation* **106**, 3006–3008 (2002).

104. Doble, B., Blackhouse, G., Goeree, R. & Xie, F. Cost-effectiveness of the Edwards SAPIEN transcatheter heart valve compared with standard management and surgical aortic valve replacement in patients with severe symptomatic aortic stenosis: A Canadian perspective. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **146**, 52–60 (2013).
105. Osnabrugge, R. L. J. *et al.* Costs of transcatheter versus surgical aortic valve replacement in intermediate-risk patients. *Ann. Thorac. Surg.* **94**, 1954–1960 (2012).
106. Zhao, Z.-G., Jilaihawi, H., Feng, Y. & Chen, M. Transcatheter aortic valve implantation in bicuspid anatomy. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**, 123–128 (2014).
107. Moerman, P., Dumoulin, M., Lauweryns, J. & Van der Hauwaert, L. G. Interrupted right aortic arch in DiGeorge syndrome. *Br. Heart J.* **58**, 274–278 (1987).
108. Loeys, B. L. *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat. Genet.* **37**, 275–281 (2005).
109. Amezcua-Guerra, L., Santiago, C., Espinola-Zavaleta, N. & Pineda, C. Bicuspid aortic valve a synergistic factor for aortic dilation and dissection in Marfan syndrome. *Rev. Investig. Clin.* **62**, 39–43 (2010).
110. Nistri, S. *et al.* Association of Marfan syndrome and bicuspid aortic valve: Frequency and outcome. *Int. J. Cardiol.* **155**, 324–325 (2012).
111. Carvalho, A. B. *et al.* Cardiovascular and renal anomalies in Turner syndrome. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **56**, 655–659 (2010).
112. Bondy, C. *et al.* Bicuspid aortic valve and aortic coarctation are linked to deletion of the X chromosome short arm in Turner syndrome. *J. Med. Genet.* **50**, 662–5 (2013).
113. Lopez-Rangel, E., Maurice, M., McGillivray, B. & Friedman, J. M. Williams syndrome in adults. *Am J Med Genet* **44**, 720–729 (1992).
114. Cook, J. R. & Ramirez, F. Clinical, Diagnostic, and Therapeutics Aspects of the Marfan Syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 77–94 (2014).

115. Della Corte, A. *et al.* Spatial patterns of matrix protein expression in dilated ascending aorta with aortic regurgitation congenital bicuspid valve versus Marfan's syndrome. *J. Heart Valve Dis.* **15**, 20–27 (2006).
116. Detaint, D. *et al.* Aortic dilatation patterns and rates in adults with bicuspid aortic valves: a comparative study with Marfan syndrome and degenerative aortopathy. *Heart* **100**, 126–34 (2014).
117. Lichiardopol, C. & Mota, M. Cardiovascular risk factors in Turner syndrome. *Rom. J. Intern. Med.* **42**, 371–379 (2004).
118. Sachdev, V. *et al.* Aortic Valve Disease in Turner Syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1904–1909 (2008).
119. van Engelen, K. *et al.* Bicuspid aortic valve morphology and associated cardiovascular abnormalities in fetal Turner syndrome a pathomorphological study. *Fetal Diagn. Ther.* **36**, 59–68 (2014).
120. Kappetein, A. *et al.* The neural crest as a possible pathogenetic factor in coarctation of the aorta and bicuspid aortic valve. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **102**, 830–6 (1991).
121. Rinnström, D., Engström, K. G. & Johansson, B. Subtypes of bicuspid aortic valves in coarctation of the aorta. *Heart Vessels* **29**, 354–363 (2014).
122. Oliver, J. M. *et al.* Risk of aortic root or ascending aorta complications in patients with bicuspid aortic valve with and without coarctation of the aorta. *Am. J. Cardiol.* **104**, 1001–1006 (2009).
123. Hinton, R. B., Cripe, L. H. & Benson, D. W. Hypoplastic Left Heart Syndrome Links to Chromosomes 10q and 6q and Is Genetically Related to Bicuspid Aortic Valve. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1065–1071 (2009).
124. Venter, J. C. *et al.* The Sequence of the Human Genome. *Science (80-.)*. **291**, 1304–1351 (2001).
125. Djebali, S. *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**, 101–108 (2012).
126. Pruitt, K. D. *et al.* RefSeq: An update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res.* **42**, 756–763 (2014).

127. Zhang, C. & Peng, G. Non-coding RNAs: An emerging player in DNA damage response. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **763**, 202–211 (2015).
128. Ling, H. *et al.* Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene* 1–9 (2015).
129. Chanock, S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis. Markers* **17**, 89–98 (2001).
130. Chen, F. C. & Li, W. H. Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 444–456 (2001).
131. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D. & Das, S. ACMG Standards and Guidelines Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 1–20 (2015).
132. Sauna, Z. E. & Kimchi-Sarfaty, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 683–691 (2011).
133. Gray, I. C., Campbell, D. a & Spurr, N. K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2403–2408 (2000).
134. Li, M. J., Yan, B., Sham, P. C. & Wang, J. Exploring the function of genetic variants in the non-coding genomic regions: approaches for identifying human regulatory variants affecting gene expression. *Brief. Bioinform.* **16**, 393–412 (2014).
135. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467 (1977).
136. Hattori, M. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* **50**, 162–168 (2005).
137. Brown, T. A. *Genomes, 3rd edition.* (Garland Science, 2007).
138. Hert, D. G., Fredlake, C. P. & Barron, A. E. Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A Comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis* **29**, 4618–4626 (2008).

139. Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).
140. McGinn, S. & Gut, I. G. DNA sequencing - spanning the generations. *N. Biotechnol.* **30**, 366–372 (2013).
141. Galindo-González, L., Pinzón-Latorre, D., Bergen, E. a, Jensen, D. C. & Deyholos, M. K. Ion Torrent sequencing as a tool for mutation discovery in the flax (*Linum usitatissimum* L.) genome. *Plant Methods* **11**, 1–14 (2015).
142. Loman, N. J. *et al.* Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.* **30**, 434–441 (2012).
143. Bragg, L. M., Stone, G., Butler, M. K., Hugenholtz, P. & Tyson, G. W. Shining a Light on Dark Sequencing: Characterising Errors in Ion Torrent PGM Data. *PLoS Comput. Biol.* **9**, (2013).
144. Kim, S. & Misra, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **9**, 289–320 (2007).
145. Lynch, a G., Dunning, M. J., Iddawela, M., Barbosa-Morais, N. L. & Ritchie, M. E. Considerations for the processing and analysis of GoldenGate-based two-colour Illumina platforms. *Stat. Methods Med. Res.* **18**, 437–452 (2009).
146. Pettit, K. E., Merchant, M., Machin, G. a, Tacy, T. a & Norton, M. E. Congenital heart defects in a large, unselected cohort of monozygotic twins. *J. Perinatol.* **33**, 1–5 (2012).
147. Springer, S. *et al.* Congenital heart disease in monozygotic twins with and without twin-to-twin transfusion syndrome. *Prenat. Diagn.* **34**, 994–999 (2014).
148. Godden, D. J., Sandhu, P. S. & Kerr, F. Stenosed bicuspid aortic valves in twins. *Eur. Heart J.* **8**, 316–318 (1987).
149. Brown, C., Sane, D. C. & Kitzman, D. W. Bicuspid aortic valves in monozygotic twins. *Echocardiography* **20**, 183–184 (2003).
150. Saravanan, P. & Kadir, I. Apolipoprotein E alleles and bicuspid aortic valve stenosis in monozygotic twins. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **8**, 687–688 (2009).

151. Mu, T. S., McAdams, R. M. & Bush, D. M. A case of hypoplastic left heart syndrome and bicuspid aortic valve in monozygotic twins. *Pediatr. Cardiol.* **26**, 884–885 (2005).
152. Zwijnenburg, P. J. G., Meijers-Heijboer, H. & Boomsma, D. I. Identical but not the same: The value of discordant monozygotic twins in genetic research. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **153**, 1134–1149 (2010).
153. McKusick, V. a. Association of congenital bicuspid aortic valve and erdheim's cystic medial necrosis. *Lancet* **1**, 1026–1027 (1972).
154. Emanuel, R., Withers, R., O'Brien, K., Ross, P. & Feizi, O. Congenitally bicuspid aortic valves. Clinicogenetic study of 41 families. *Br. Heart J.* **40**, 1402–1407 (1978).
155. McDonald, K. & Maurer, B. J. Familial aortic valve disease: evidence for a genetic influence? *Eur. Heart J.* **10**, 676–677 (1989).
156. Glick, B. N. & Roberts, W. C. Congenitally bicuspid aortic valve in multiple family members. *Am. J. Cardiol.* **73**, 400–404 (1994).
157. Clementi, M., Notari, L., Borghi, A. & Tenconi, R. Familial congenital bicuspid aortic valve: A disorder of uncertain inheritance. *Am. J. Med. Genet.* **62**, 336–338 (1996).
158. Huntington, K., Hunter, A. G. W. & Chan, K. L. A prospective study to assess the frequency of familial clustering of congenital bicuspid aortic valve. *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**, 1809–1812 (1997).
159. Gelb, B. D. *et al.* Familial patent ductus arteriosus and bicuspid aortic valve with hand anomalies: A novel heart-hand syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **87**, 175–179 (1999).
160. Cripe, L., Andelfinger, G., Martin, L. J., Shooner, K. & Benson, D. W. Bicuspid aortic valve is heritable. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 138–143 (2004).
161. Garg, V. *et al.* Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* **437**, 270–274 (2005).
162. Ellison, J. W. *et al.* Evidence of Genetic Locus Heterogeneity for Familial Bicuspid Aortic Valve. *J. Surg. Res.* **142**, 28–31 (2007).

163. Robledo-Carmona, J. *et al.* Hereditary patterns of bicuspid aortic valve in a hundred families. *Int. J. Cardiol.* **168**, 3443–3449 (2013).
164. Artavanis-Tsakonas, S. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* (80-.). **284**, 770–776 (1999).
165. Grotek, B., Wehner, D. & Weidinger, G. Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration. *Development* **140**, 1412–23 (2013).
166. Wang, Z. *et al.* Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 483–493 (2006).
167. Wang, Z., Li, Y., Kong, D. & Sarkar, F. H. The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness. *Curr. Drug Targets* **11**, 745–751 (2010).
168. Ozasa, Y. *et al.* Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens. Res.* **36**, 859–65 (2013).
169. Zhou, X. L. & Liu, J. C. Role of Notch signaling in the mammalian heart. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **47**, 1–10 (2014).
170. Wang, Y. *et al.* Endocardial to Myocardial Notch-Wnt-Bmp Axis Regulates Early Heart Valve Development. *PLoS One* **8**, (2013).
171. Liu, J., Dong, F., Jeong, J., Masuda, T. & Lobe, C. G. Constitutively active Notch1 signaling promotes endothelial-mesenchymal transition in a conditional transgenic mouse model. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 669–676 (2014).
172. Nemir, M. & Pedrazzini, T. Functional role of Notch signaling in the developing and postnatal heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**, 495–504 (2008).
173. MacGrogan, D., Nus, M. & Pompa, J. L. D. La. Notch signaling in cardiac development and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **92**, 333–365 (2010).
174. Macgrogan, D., Luna-Zurita, L. & de la Pompa, J. L. Notch signaling in cardiac valve development and disease. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* **91**, 449–459 (2011).

175. lascone, M. *et al.* Identification of de novo mutations and rare variants in hypoplastic left heart syndrome. *Clin. Genet.* **81**, 542–554 (2012).
176. McBride, K. L. *et al.* NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2886–2893 (2008).
177. Nigam, V. & Srivastava, D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **47**, 828–834 (2009).
178. Nus, M. *et al.* Diet-induced aortic valve disease in mice haploinsufficient for the notch pathway effector RBPJK/CSL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1580–1588 (2011).
179. Acharya, A. *et al.* Inhibitory role of Notch1 in calcific aortic valve disease. *PLoS One* **6**, (2011).
180. Ducharme, V. *et al.* NOTCH1 genetic variants in patients with tricuspid calcific aortic valve stenosis. *J. Heart Valve Dis.* **22**, 142–9 (2013).
181. Mohamed, S. A. *et al.* Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1460–1465 (2006).
182. Foffa, I. *et al.* Sequencing of NOTCH1, GATA5, TGFBR1 and TGFBR2 genes in familial cases of bicuspid aortic valve. *BMC Med. Genet.* **14**, 1–8 (2013).
183. McKellar, S. H. *et al.* Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **134**, 290–296 (2007).
184. Kent, K. C., Crenshaw, M. L., Goh, D. L. M. & Dietz, H. C. Genotype-phenotype correlation in patients with bicuspid aortic valve and aneurysm. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **146**, 158–165 (2013).
185. Bonachea, E. M. *et al.* Use of a targeted, combinatorial next-generation sequencing approach for the study of bicuspid aortic valve. *BMC Med. Genomics* **7**, 1–10 (2014).
186. Freylikhman, O. *et al.* Variants in the NOTCH1 Gene in Patients with Aortic Coarctation. *Congenit Hear. Dis* **9**, 391–396 (2014).
187. Dahmen, R. P. *et al.* Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res.* **61**, 7039–7043 (2001).

188. Jin, L. H. *et al.* Detection of point mutations of the AXIN1 gene in colorectal cancers. *Int. J. Cancer* **107**, 696–699 (2003).
189. Guichard, C. *et al.* Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* **44**, 694–698 (2012).
190. Ozen, C. *et al.* Genetics and epigenetics of liver cancer. *N. Biotechnol.* **30**, 381–384 (2013).
191. Mazzone, S. M. & Fearon, E. R. AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett.* **355**, 1–8 (2014).
192. Zeng, L. *et al.* The mouse Fused locus encodes axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* **90**, 181–192 (1997).
193. Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M. & Lassar, A. B. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* **15**, 316–327 (2001).
194. Armstrong, E. J. & Bischoff, J. Heart valve development: Endothelial cell signaling and differentiation. *Circ. Res.* **95**, 459–470 (2004).
195. Hurlstone, A. F. L., Haramis, A. G. & Wienholds, E. The Wnt/b-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* **658**, 633–637 (2003).
196. Lee, H.-C. *et al.* Glycogen synthase kinase 3 alpha and 3 beta have distinct functions during cardiogenesis of zebrafish embryo. *BMC Dev. Biol.* **7**, 93 (2007).
197. Fu, X. M., Dai, X., Ding, J. & Zhu, B. T. Pancreas-specific protein disulfide isomerase has a cell type-specific expression in various mouse tissues and is absent in human pancreatic adenocarcinoma cells: Implications for its functions. *J. Mol. Histol.* **40**, 189–199 (2009).
198. Conn, K. J. *et al.* Identification of the protein disulfide isomerase family member PD1p in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology. *Brain Res.* **1022**, 164–172 (2004).
199. Niki, S. *et al.* Alteration of intra-pancreatic target-organ specificity by abrogation of Aire in NOD mice. *J. Clin. Invest.* **116**, 1292–1301 (2006).

200. Kurisaki, H., Nagao, Y., Nagafuchi, S. & Mitsuyama, M. Autoimmune Gastro-Pancreatitis with Anti-Protein Disulfide Isomerase-Associated 2 Autoantibody in Aire-Deficient BALB/cAnN Mice. *PLoS One* **8**, 1–8 (2013).
201. Fu, X. & Zhu, B. T. Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDip) is redox-regulated through formation of an inter-subunit disulfide bond. *Arch. Biochem. Biophys.* **485**, 1–9 (2009).
202. Peña, E., Arderiu, G. & Badimon, L. Protein disulphide-isomerase A2 regulated intracellular tissue factor mobilisation in migrating human vascular smooth muscle cells. *Atheroscler. Ischaem. Dis.* **113**, 891–902 (2015).
203. Severino, A. *et al.* Identification of Protein Disulfide Isomerase as a Cardiomyocyte Survival Factor in Ischemic Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1029–1037 (2007).
204. Toldo, S. & Boccellino, M. Altered Oxid-Reductive State in the Diabetic Heart: Loss of Cardioprotection due to Protein Disulfide Isomerase. *Mol. Med.* **17**, 1 (2011).
205. Galligan, J. J. & Petersen, D. R. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum. Genomics* **6**, 6 (2012).
206. Wooten, E. C. *et al.* Application of gene network analysis techniques identifies AXIN1/PDIA2 and endoglin haplotypes associated with bicuspid aortic valve. *PLoS One* **5**, e8830 (2010).
207. Iwamoto, R. & Mekada, E. ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function. *Cell Struct. Funct.* **31**, 1–14 (2006).
208. Mitsudomi, T. & Yatabe, Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J.* **277**, 301–308 (2010).
209. Chen, B. *et al.* Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat. Genet.* **24**, 296–299 (2000).
210. Sibilias, M. *et al.* Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Development* **130**, 4515–4525 (2003).
211. Iwamoto, R. *et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3221–3226 (2003).

212. Tadano, M. *et al.* Congenital semilunar valvulogenesis defect in mice deficient in phospholipase C epsilon. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2191–2199 (2005).
213. McAllister, K. a *et al.* Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.* **8**, 345–351 (1994).
214. Vincent, E. B., Runyan, R. B. & Weeks, D. L. Production of the transforming growth factor-beta binding protein endoglin is regulated during chick heart development. *Dev. Dyn.* **213**, 237–247 (1998).
215. Arthur, H. M. *et al.* Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev. Biol.* **217**, 42–53 (2000).
216. Jonker, L. & Arthur, H. M. Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech. Dev.* **110**, 193–196 (2001).
217. Qu, R., Silver, M. M. & Letarte, M. Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res.* **292**, 333–343 (1998).
218. Valeria, B., Maddalena, G., Enrica, V., Onofrio, T. & Gaetano, B. Endoglin (CD105) expression in the human heart throughout gestation: an immunohistochemical study. *Reprod. Sci.* **15**, 1018–1026 (2008).
219. Mercado-pimentel, M. E., Hubbard, A. D. & Runyan, R. B. Transformation During Cardiac Valve Formation. *Dev. Biol.* **304**, 420–432 (2008).
220. Llurba, E. *et al.* Maternal and foetal angiogenic imbalance in congenital heart defects. *Eur. Heart J.* **35**, 701–707 (2014).
221. Nemer, G., Qureshi, S. T., Malo, D. & Nemer, M. Functional analysis and chromosomal mapping of Gata5, a gene encoding a zinc finger DNA-binding protein. *Mamm. Genome* **10**, 993–999 (1999).
222. Weber, H., Symes, C. E., Walmsley, M. E., Rodaway, a R. & Patient, R. K. A role for GATA5 in Xenopus endoderm specification. *Development* **127**, 4345–4360 (2000).
223. Nemer, G. & Nemer, M. Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development* **129**, 4045–4055

(2002).

224. Haworth, K. E., Kotecha, S., Mohun, T. J. & Latinkic, B. V. GATA4 and GATA5 are essential for heart and liver development in *Xenopus* embryos. *BMC Dev. Biol.* **8**, 74 (2008).
225. Laforest, B., Andelfinger, G. & Nemer, M. Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *J. Clin. Invest.* **121**, 2876–2887 (2011).
226. Charron, F. & Nemer, M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 85–91 (1999).
227. Reiter, J. F. *et al.* Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev.* **13**, 2983–2995 (1999).
228. Holtzinger, A. & Evans, T. Gata5 and Gata6 are functionally redundant in zebrafish for specification of cardiomyocytes. *Dev. Biol.* **312**, 613–622 (2007).
229. Afouda, B. a. & Hoppler, S. Different requirements for GATA factors in cardiogenesis are mediated by non-canonical Wnt signaling. *Dev. Dyn.* **240**, 649–662 (2011).
230. Singh, M. K. *et al.* Gata4 and Gata5 cooperatively regulate cardiac myocyte proliferation in mice. *J. Biol. Chem.* **285**, 1765–1772 (2010).
231. Molkentin, J. D., Tymitz, K. M., Richardson, J. a & Olson, E. N. Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5256–5260 (2000).
232. Jiang, J.-Q. *et al.* Prevalence and spectrum of GATA5 mutations associated with congenital heart disease. *Int. J. Cardiol.* **165**, 570–573 (2013).
233. Wei, D. *et al.* GATA5 loss-of-function mutation responsible for the congenital ventriculoseptal defect. *Pediatr. Cardiol.* **34**, 504–511 (2013).
234. Shan, J.-P. *et al.* Novel and functional sequence variants within the GATA5 gene promoter in ventricular septal defects. *World J Pediatr* **10**, 348–353 (2014).
235. Wang, X. H. *et al.* A novel GATA5 loss-of-function mutation underlies lone atrial fibrillation. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 43–50 (2013).

236. Wei, D. *et al.* GATA5 loss-of-function mutations underlie tetralogy of fallot. *Int. J. Med. Sci.* **10**, 34–42 (2013).
237. Huang, R. T., Xue, S., Xu, Y. J. & Yang, Y. Q. Somatic GATA5 mutations in sporadic sporadic tetralogy of Fallot. *Int. J. Mol. Med.* **33**, 1227–1235 (2014).
238. Padang, R., Bagnall, R. D., Richmond, D. R., Bannon, P. G. & Semsarian, C. Rare non-synonymous variations in the transcriptional activation domains of GATA5 in bicuspid aortic valve disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **53**, 277–281 (2012).
239. Shi, L.-M. *et al.* GATA5 loss-of-function mutations associated with congenital bicuspid aortic valve. *Int. J. Mol. Med.* **33**, 1219–1226 (2014).
240. Paffett-Lugacy, N. *et al.* Heart field origin of great vessel precursors relies on nkx2.5-mediated vasculogenesis. *Nat. Cell. Biol.* **127**, 358–366 (2013).
241. Lyons, I. *et al.* Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev.* **9**, 1654–1666 (1995).
242. Tanaka, M., Chen, Z., Bartunkova, S., Yamasaki, N. & Izumo, S. The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* **126**, 1269–1280 (1999).
243. Biben, C. *et al.* Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5. *Circ. Res.* **87**, 888–895 (2000).
244. Bartlett, H. *et al.* Transient early embryonic expression of Nkx2-5 mutations linked to congenital heart defects in human causes heart defects in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* **236**, 2475–2484 (2007).
245. Ashraf, H. *et al.* A Mouse Model of Human Congenital Heart Disease: High Incidence of Diverse Cardiac Anomalies and Ventricular Noncompaction Produced by Heterozygous Nkx2-5 Homeodomain Missense Mutation. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **7**, 423–433 (2014).
246. Reamon-Buettner, S. M. & Borlak, J. NKX2-5: An update on this hypermutable homeodomain protein and its role in human congenital heart disease (CHD). *Hum. Mutat.* **31**, 1185–1194 (2010).
247. Peng, T., Wang, L., Zhou, S. F. & Li, X. Mutations of the GATA4 and NKX2.5 genes in Chinese

- pediatric patients with non-familial congenital heart disease. *Genetica* **138**, 1231–1240 (2010).
248. Granados-Riveron, J. T. *et al.* in Congenital Heart Disease : Multiple Heterozygosity and. *Congenit Hear. Dis* **7**, 151–159 (2012).
249. Costa, M. W. *et al.* Functional characterization of a novel mutation in NKX2-5 associated with congenital heart disease and adult-onset cardiomyopathy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **6**, 238–247 (2013).
250. Reamon-Buettner, S. M. *et al.* Transcriptional defect of an inherited NKX2-5 haplotype comprising a SNP, a nonsynonymous and a synonymous mutation, associated with human congenital heart disease. *PLoS One* **8**, (2013).
251. Esposito, G. *et al.* Somatic mutations in NKX2-5, GATA4, and HAND1 are not a common cause of tetralogy of Fallot or hypoplastic left heart. *Am. J. Med. Genet. Part A* **155**, 2416–2421 (2011).
252. Majumdar, R., Yagubyan, M., Sarkar, G., Bolander, M. E. & Sundt, T. M. Bicuspid aortic valve and ascending aortic aneurysm are not associated with germline or somatic homeobox NKX2-5 gene polymorphism in 19 patients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **131**, 1301–1305 (2006).
253. Reamon-Buettner, S. M. & Borlak, J. Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease. *J. Med. Genet.* **41**, 684–690 (2004).
254. Wang, Z. *et al.* Associations between Two Genetic Variants in NKX2-5 and Risk of Congenital Heart Disease in Chinese Population: A Meta-Analysis. *PLoS One* **8**, 1–6 (2013).
255. Beffagna, G. *et al.* R25C mutation in the NKX2.5 gene in Italian patients affected with non-syndromic and syndromic congenital heart disease. *J. Cardiovasc. Med.* **14**, 582–586 (2013).
256. Qu, X.-K. *et al.* A Novel NKX2.5 Loss-of-Function Mutation Associated With Congenital Bicuspid Aortic Valve. *Am. J. Cardiol.* **114**, 1891–1895 (2014).
257. Rastaldo, R. *et al.* Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci.* **81**, 779–793 (2007).
258. Witte, M. B. & Barbul, A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg.* **183**, 406–412 (2002).

259. Liu, Y. & Feng, Q. NOing the heart: Role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation* **84**, 54–61 (2012).
260. Lee, T. C., Zhao, Y. D., Courtman, D. W. & Stewart, D. J. Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **101**, 2345–2348 (2000).
261. Feng, Q. *et al.* Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**, 873–879 (2002).
262. Van Beynum, I. M. *et al.* Common 894G>T single nucleotide polymorphism in the gene coding for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of congenital heart defects. *Clin. Chem. Lab. Med.* **46**, 1369–1375 (2008).
263. Kuehl, K., Loffredo, C., Lammer, E. J., Iovannisci, D. M. & Shaw, G. M. Association of congenital cardiovascular malformations with 33 single nucleotide polymorphisms of selected cardiovascular disease-related genes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **88**, 101–110 (2010).
264. Levinsson, A., Olin, A.-C., Björck, L., Rosengren, A. & Nyberg, F. Nitric oxide synthase (NOS) single nucleotide polymorphisms are associated with coronary heart disease and hypertension in the INTERGENE study. *Nitric Oxide* **39**, 1–7 (2014).
265. Kennedy, J. a. *et al.* Inhibition of calcifying nodule formation in cultured porcine aortic valve cells by nitric oxide donors. *Eur. J. Pharmacol.* **602**, 28–35 (2009).
266. Richards, J. *et al.* Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: Interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling. *Am. J. Pathol.* **182**, 1922–1931 (2013).
267. Bosse, K. *et al.* Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **60**, 27–35 (2013).
268. Cagirci, G. *et al.* Association between plasma asymmetrical dimethylarginine activity and severity of aortic valve stenosis. *J. Cardiovasc. Med.* **12**, 96–101 (2011).
269. El Accaoui, R. N. *et al.* Aortic valve sclerosis in mice deficient in endothelial nitric oxide synthase. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **306**, H1302–H1313 (2014).
270. Aicher, D., Urbich, C., Zeiher, A., Dimmeler, S. & Schäfers, H.-J. Endothelial nitric oxide synthase in bicuspid aortic valve disease. *Ann. Thorac. Surg.* **83**, 1290–1294 (2007).

271. Mohamed, S. a. *et al.* Locally different endothelial nitric oxide synthase protein levels in ascending aortic aneurysms of bicuspid and tricuspid aortic valve. *Cardiol. Res. Pract.* **2012**, 1–8 (2012).
272. Grewal, N. *et al.* Bicuspid aortic valve: phosphorylation of c-Kit and downstream targets are prognostic for future aortopathy. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **46**, 831–839 (2014).
273. Drapisz, S., Goralczyk, T., Jamka-Miszalski, T., Olszowska, M. & Undas, A. Nonstenotic bicuspid aortic valve is associated with elevated plasma asymmetric dimethylarginine. *Cardiovasc. Med.* **14**, 446–52 (2013).
274. Pisano, C. *et al.* Histological and genetic studies in patients with bicuspid aortic valve and ascending aorta complications. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **14**, 300–306 (2012).
275. Derynck, R., Akhurst, R. J. & Balmain, a. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* **29**, 117–129 (2001).
276. Garside, V. C., Chang, A. C., Karsan, A. & Hoodless, P. a. Co-ordinating Notch, BMP, and TGF-?? signaling during heart valve development. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 2899–2917 (2013).
277. Choudhary, B. *et al.* Cardiovascular malformations with normal smooth muscle differentiation in neural crest-specific type II TGF?? receptor (Tgfr2) mutant mice. *Dev. Biol.* **289**, 420–429 (2006).
278. Robson, A., Allinson, K. R., Anderson, R. H., Henderson, D. J. & Arthur, H. M. The TGF β type II receptor plays a critical role in the endothelial cells during cardiac development. *Dev. Dyn.* **239**, 2435–2442 (2010).
279. Oshima, M., Oshima, H. & Taketo, M. M. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* **179**, 297–302 (1996).
280. Jiao, K. *et al.* Tgfbeta signaling is required for atrioventricular cushion mesenchyme remodeling during in vivo cardiac development. *Development* **133**, 4585–4593 (2006).
281. Langlois, D. *et al.* Conditional inactivation of TGF-B type II receptor in smooth muscle cells and epicardium causes lethal aortic and cardiac defects. *Transgenic Res.* **19**, 1069–1082 (2010).

282. Mizuguchi, T. *et al.* Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* **36**, 855–860 (2004).
283. Attias, D. *et al.* Comparison of clinical presentations and outcomes between patients with TGFBR2 and FBN1 mutations in marfan syndrome and related disorders. *Circulation* **120**, 2541–2549 (2009).
284. Loeys, B. L. *et al.* Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N. Engl. J. Med.* **355**, 788–798 (2006).
285. Lemaire, S. a, Pannu, H., Carter, S. a, Coselli, J. S. & Milewicz, D. M. Severe aortic and arterial aneurysms associated with a TGFBR2 mutation. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4**, 167–171 (2007).
286. Jamsheer, a *et al.* A new sporadic case of early-onset Loeys-Dietz syndrome due to the recurrent mutation p.R528C in the TGFBR2 gene substantiates interindividual clinical variability. *J. Appl. Genet.* **50**, 405–410 (2009).
287. Drera, B. *et al.* Loeys-Dietz syndrome type I and type II: clinical findings and novel mutations in two Italian patients. *Orphanet J. Rare Dis.* **4**, 24 (2009).
288. Uike, K. *et al.* Systemic vascular phenotypes of Loeys-Dietz syndrome in a child carrying a de novo R381P mutation in TGFBR2 : a case report. *BMC Research Notes* **6**, 1–5 (2013).
289. Tran-Fadulu, V. *et al.* Analysis of multigenerational families with thoracic aortic aneurysms and dissections due to TGFBR1 or TGFBR2 mutations. *J. Med. Genet.* **46**, 607–613 (2009).
290. Baas, a F. *et al.* Association of the TGF-beta receptor genes with abdominal aortic aneurysm. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 240–244 (2010).
291. Biros, E. *et al.* Meta-analysis of the association between single nucleotide polymorphisms in TGF-?? receptor genes and abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* **219**, 218–223 (2011).
292. Gago-Díaz, M. *et al.* Whole exome sequencing for the identification of a new mutation in TGFBR2 involved in a familial case of non-syndromic aortic disease. *Clin. Chim. Acta* **437**, 88–92 (2014).
293. Tseng, Z. H. *et al.* Association of TGFBR2 Polymorphism with Risk of Sudden Cardiac Arrest in Patients with Coronary Artery Disease. *Heart Rhythm* **6**, 1745–1750 (2009).

294. Li, X.-T. *et al.* Association of TGFBR2 rs6785358 Polymorphism with Increased Risk of Congenital Ventricular Septal Defect in a Chinese Population. *Pediatr. Cardiol.* (2015).
295. Huang, F. *et al.* Association between TGFBR2 gene polymorphisms and congenital heart defects in Han Chinese population. *Nutr. Hosp.* **31**, 710–715 (2015).
296. Nataatmadja, M., West, J., Prabowo, S. & West, M. Angiotensin II Receptor Antagonism Reduces Transforming Growth Factor Beta and Smad Signaling in Thoracic Aortic Aneurysm. *Ochsner J.* **13**, 42–8 (2013).
297. Hillebrand, M. *et al.* Total Serum Transforming Growth Factor- β 1 Is Elevated in the Entire Spectrum of Genetic Aortic Syndromes. *Clin. Cardiol.* **679**, 672–679 (2014).
298. Kochtebane, N. *et al.* Release of leukotriene B₄, transforming growth factor-beta1 and microparticles in relation to aortic valve calcification. *J. Heart Valve Dis.* **22**, 782–788 (2013).
299. Arrington, C. B. *et al.* Absence of TGFBR1 and TGFBR2 Mutations in Patients With Bicuspid Aortic Valve and Aortic Dilation. *Am. J. Cardiol.* **102**, 629–631 (2008).
300. Girdauskas, E., Schulz, S., Borger, M. A., Mierzwa, M. & Kuntze, T. Transforming growth factor-beta receptor type II mutation in a patient with bicuspid aortic valve disease and intraoperative aortic dissection. *Ann. Thorac. Surg.* **91**, e70–e71 (2011).
301. Martín, M., Rodriguez, I., Palacn, M., Ríos-Gómez, E. & Coto, E. TGFBR2 gene mutational spectrum in aortic pathology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 518–519 (2011).
302. Wilson, C. L. *et al.* Endothelial deletion of ADAM17 in mice results in defective remodeling of the semilunar valves and cardiac dysfunction in adults. *Mech. Dev.* **130**, 272–289 (2013).
303. Cai, X. *et al.* Tbx20 acts upstream of Wnt signaling to regulate endocardial cushion formation and valve remodeling during mouse cardiogenesis. *Development* **140**, 3176–87 (2013).
304. Thomas, P. S., Sridurongrit, S., Ruiz-Lozano, P. & Kaartinen, V. Deficient signaling via Alk2 (Acvr1) leads to Bicuspid aortic valve development. *PLoS One* **7**, (2012).
305. Quintero-Rivera, F. *et al.* MATR3 disruption in human and mouse associated with bicuspid aortic valve, aortic coarctation and patent ductus arteriosus. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2375–2389

- (2015).
306. Martin, L. J. *et al.* Whole Exome Sequencing for Familial Bicuspid Aortic Valve Identifies Putative Variants. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **7**, 677–683 (2014).
 307. Kircher, M. *et al.* A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* **46**, 310–315 (2014).
 308. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–249 (2010).
 309. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
 310. Tabor, H. K., Risch, N. J. & Myers, R. M. Candidate-gene Approaches for Studying Complex Genetic Traits: Practical Considerations. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 391–7 (2002).
 311. Dong, C. *et al.* Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2125–2137 (2015).
 312. Aggarwal, S. R. *et al.* Sex differences in aortic valve calcification measured by multidetector computed tomography in aortic stenosis. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **6**, 40–47 (2013).
 313. Lee, J. *et al.* Gender-dependent aortic remodelling in patients with bicuspid aortic valve-associated thoracic aortic aneurysm. *J. Mol. Med.* **92**, 939–949 (2014).
 314. Holmes, K. W. *et al.* GenTAC registry report: Gender differences among individuals with genetically triggered thoracic aortic aneurysm and dissection. *Am. J. Med. Genet. Part A* **161**, 779–786 (2013).
 315. Norton, N., Williams, N. M., O'Donovan, M. C. & Owen, M. J. DNA pooling as a tool for large-scale association studies in complex traits. *Ann. Med.* **36**, 146–152 (2004).

Ressources électroniques

1000 Genomes Project : <http://www.1000genomes.org/> (accédé le 21-06-2015)

Exome Aggregation Consortium (ExAC) : <http://exac.broadinstitute.org/> (accédé le 21-06-2015)

Exome Variant Server (EVS) : <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (accédé le 21-06-2015)

Ion AmpliSeq Designer : <https://www.ampliseq.com/> (accédé le 21-06-2015)

OligoAnalyzer : <https://www.idtdna.com/calc/analyze/> (accédé le 21-06-2015)

Primer 3 : <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (accédé le 21-06-2015)

Single nucleotide polymorphism database (dbSNP) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> (accédé le 21-06-2015)