



Université de Montréal

Cartographie génétique d'une forme familiale autosomale dominante d'anévrismes du septum inter-ventriculaire et de communications inter-ventriculaires au chromosome 10p15.

par

Nicolas Tremblay

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences  
en Biochimie  
option génomique humaine

Avril 2012

© Nicolas Tremblay, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Cartographie génétique d'une forme familiale autosomale dominante d'anévrismes du septum  
inter-ventriculaire et de communications inter-ventriculaires au chromosome 10p15

Présenté par :  
Nicolas Tremblay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Zenklusen, président-rapporteur  
Gregor Andelfinger, directeur de recherche  
Daniel Sinnet, co-directeur  
Christian Deschepper, membre du jury

## Résumé

Les malformations cardiaques congénitales (CHM) représentent 28 % de toutes les malformations congénitales majeures et touchent 8 pour 1000 naissances à terme. Elles sont la cause de mortalité et de morbidité non infectieuse la plus fréquente chez les enfants de moins d'une année de vie.

Les communications interventriculaires (VSD) forment le sous-type de CHM le plus fréquent et l'aggrégation familiale est extrêmement rare. Le but de cette étude était d'identifier les facteurs génétiques et les régions chromosomiques contribuant aux VSD.

Une grande famille ségréguant diverses formes de pathologies septales, incluant des VSD, des anévrysmes du septum interventriculaire (VSA) et des communications interauriculaires (ASD), a été examinées et caractérisées cliniquement et génétiquement. Dix-huit membres de la famille, sur trois générations, ont pu être étudiés. (10 affectés : 4 VSD, 3 VSA, 2 ASD et une tétralogie de Fallot).

L'analyse de liaison multipoint paramétrique démontre un logarithme des probabilités maximal (LOD) de 3.29 liant significativement le chromosome 10p15.3-10p15.2 aux traits observés dans cette famille.

Le pointage LOD oriente vers une région pauvre en gènes qui a déjà été associée aux malformations du septum interventriculaire, mais qui est distincte de la région du syndrome de DiGeorge de type 2 sur le chromosome 10p. De plus, plusieurs scénarios d'analyse de liaison suggèrent que la tétralogie de Fallot est une phénocopie et qu'elle est donc génétiquement différente des autres pathologies du septum observées dans cette famille.

En bref, cette étude associe une forme rare de VSD/VSA au chromosome 10p15 et permet d'étendre le spectre de l'hétérogénéité des pathologies septales.

**Mots-clés :** Malformations cardiaques congénitales, malformations du septum, tétralogie de Fallot, analyse de liaison, chromosome 10p15, génétique moléculaire



## Abstract

Cardiac malformations represents 28 % of all major congenital malformation and affect 8 per 1000 live birth. They are the most frequent cause of non infectious mortality and morbidity in children of less than 1 year of life.

Although ventricular septal defects (VSD) are the most common congenital heart lesion, familial clustering has been described only in rare instances. The aim of this study was to identify genetic factors and chromosomal regions contributing to VSD.

A unique, large kindred segregating various forms of septal pathologies—including VSD, ventricular septal aneurysms, and atrial septal defects (ASD)—was ascertained and characterized clinically and genetically. Eighteen family members in three generations could be studied, out of whom 10 are affected (2 ASD, 3 septal aneurysm, 4 VSD, and 1 tetralogy of Fallot).

Parametric multipoint LOD scores reach significance on chromosome 10p15.3-10p15.2 (max. 3.29). The LOD score support interval is in a gene-poor region where deletions have been reported to associate with septal defects, but that is distinct from the DiGeorge syndrome 2 region on 10p. Multiple linkage analysis scenarios suggest that tetralogy of Fallot is a phenocopy and genetically distinct from the autosomal dominant form of septal pathologies observed in this family.

This study maps a rare familial form of VSD/septal aneurysms to chromosome 10p15 and extends the spectrum of the genetic heterogeneity of septal pathologies. Fine mapping, haplotype construction, and resequencing will provide a unique opportunity to study the pathogenesis of septal defects and shed light on molecular mechanisms of septal development.

**Keywords** : Congenital heart disease, ventricular septal defects, tetralogy of Fallot, linkage analysis, chromosome 10p15, molecular genetics

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Remerciements.....	x
CHAPITRE 1.1 : Les facteurs de risque génétiques des malformations cardiaques congénitales.....	11
Exemples choisis de malformations cardiaques congénitales.....	11
Les formes de variations génétiques.....	18
Pourquoi identifier les causes génétiques des malformations cardiaques congénitales?.....	22
Les causes génétiques des malformations cardiaques congénitales.....	23
CHAPITRE 1.2 : Les facteurs de risque non-génétiques des malformations cardiaques congénitales.....	38
Les polluants environnementaux.....	38
La maladie de la mère durant la grossesse.....	39
La prise de médicament durant la grossesse.....	41
L'exposition à des molécules non-thérapeutiques durant la grossesse.....	43
CHAPITRE 2 : L'analyse de liaison génétique.....	45
Les marqueurs génétiques.....	45
L'analyse de liaison.....	46
Le clonage positionnel.....	50
L'identification de gènes candidats et les études fonctionnelles des variants possiblement pathogéniques.....	51
CHAPITRE 3 : Description du projet de recherche.....	53
Description de la cohorte de patients avec malformations cardiaques congénitales.....	53
Recrutement d'une famille étendue avec CIV.....	53
Hypothèse.....	54

Échantillons biologiques et géotypage.....	54
Contrôle de qualité et analyse de liaison.....	55
Séquençage des gènes candidats.....	55
Publication des résultats dans un article de revue avec comité de pairs .....	56
Apport de co-auteurs.....	56
CHAPITRE 4 : Intégral de l'article de recherche originale publié dans l'European Heart Journal - European Heart Journal (2011) 32, 568–5731.....	58
2.1 - Introduction .....	59
2.2 - Materials and Methods .....	60
2.3 - Results .....	61
2.3.2 - Linkage analysis and construction of haplotypes. ....	64
2.4 - Discussion.....	70
2.5 - Funding.....	72
2.6 - Acknowledgements .....	72
2.7 - Conflict of interest .....	72
2.8 - References.....	73
Chapitre 5 : Identification d'un nouveau locus significativement lié aux CIV/Anévrisme du septum interventriculaire.....	82
Séquençage des candidats positionnels.....	83
Séquençage de IDI1/IDI2 et rationnelle biologique dans les CHM.....	83
Séquençage de WDR37 et rationnelle biologique dans les CHM .....	83
Séquençage de PITRM1 et rationnelle biologique dans les CHM .....	84
Séquençage de PFKP et rationnelle biologique dans les CHM .....	84
Vers l'identification du gène causant la maladie .....	86
Hétérogénéité des défauts septaux .....	89
Résumé et perspectives .....	91
Bibliographie.....	93

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Types d'anomalies structurales des chromosomes.....	19
<b>Tableau 2</b>	Mutations de haute pénétrance contribuant aux CHM non-syndromiques.....	24
<b>Tableau 3</b>	Mutations rares de pénétrance intermédiaire/faible contribuant aux CHM non-syndromiques.....	28
<b>Tableau 4</b>	Gènes associés aux CHM non-syndromiques en fonction du phénotype.....	31
<b>Tableau 5</b>	Mutations communes de faible pénétrance contribuant aux CHM non-syndromiques.....	32
<b>Tableau 6</b>	Risque de récurrence pour certaines malformations cardiaques congénitales.....	35

## Liste des figures

<b>Figure 1</b>	Diagramme d'une communication interventriculaire.....	12
<b>Figure 2</b>	Diagramme d'une Tétralogie de Fallot.....	13
<b>Figure 3</b>	Diagramme d'une communication interauriculaire.....	14
<b>Figure 4</b>	Diagramme d'une hypoplasie du cœur gauche.....	15
<b>Figure 5</b>	Diagramme du canal artériel.....	16
<b>Figure 6</b>	Diagramme d'une coarctation de l'aorte.....	17
<b>Figure 7</b>	Continuum des variations du génome humain.....	18
<b>Figure 8</b>	Diagramme d'une variation du nombre de copies (CNV).....	20
<b>Figure 9</b>	Diagramme des conséquences possibles des mutations ponctuelles.....	21
<b>Figure 10</b>	Diagramme d'une insertion ou d'une délétion d'un nucléotide.....	22
<b>Figure 11</b>	Représentation schématique de la morphogénèse cardiaque.....	30
<b>Figure 12</b>	Métabolisme et voie de signalisation de l'acide rétinoïque.....	42
<b>Figure 13</b>	Exemple de ségrégation des marqueurs utilisés dans l'analyse de liaison avec un gène de la maladie.....	46
<b>Figure 14</b>	Exemple de calcul de LOD score .....	49
<b>Figure 15</b>	Représentation schématique des quelques mutations humaines de PRKAG2.....	85
<b>Figure 16</b>	Éléments de régulation de l'expression des gènes situés dans des régions non-codantes.....	87

*We've discovered the secret of life.* -  
*Francis Crick*

## Remerciements

La collaboration est un pilier du travail d'équipe et elle est sans contredit un moteur important de la recherche. Elle permet de partager nos idées et de repousser la limite de notre compréhension. Elle permet de partager notre passion commune sur un sujet tout en acquérant une expertise de pointe par le transfert de connaissance de nos collègues. Bref, elle permet de travailler en équipe vers un but commun qui est de permettre, dans le contexte du CHU Sainte-Justine, de faire grandir les enfants en santé. Cependant, au quotidien, il est difficile de prendre le temps pour souligner ces contributions essentielles.

J'utiliserai cette page pour remercier certaines personnes qui ont grandement favorisé mon développement professionnel et qui m'ont permis de vivre ma passion pour la recherche depuis le début de mes études supérieures.

À vous tous, un grand merci.

Dr. Gregor Andelfinger	Dr. Youssef Idaghour
Dr. Séverine Leclerc	Dr. Jacques Michaud
Dr. Mark Samuels	Sandy Lalonde
Dr. Daniel Sinnett	Michel Cameron
Dr. Alain Moreau	Maryse Thibault
Dr. Marie-Pierre Dubé	Stéphanie Brisson
Dr. Erwin Schurr	José "Mario" Capo-Chichi
Dr. Jean-Luc Bigras	Le service des Sciences Cardiques du CHU Sainte-Justine
Dr. Marie-Josée Raboisson	Les patients et familles participantes
Dr. Joachim Miro	Ma famille toute entière pour son support inconditionnel
Dr. Ariane McNeal-Davidson	
Dr. Nassiba Alami-Laroussi	

## **CHAPITRE 1.1 : Les facteurs de risque génétiques des malformations cardiaques congénitales.**

### **Mise en contexte**

Les malformations cardiaques congénitales (CHM) regroupent un large éventail de déficits structuraux et fonctionnels qui se produisent durant l'embryogénèse cardiaque. Elles constituent une part importante des maladies cardiovasculaires pédiatriques et représentent un tiers (33%) des anomalies congénitales. En Amérique du Nord, les CHM surviennent dans 8.1 par 1000 naissances à terme. [1]

Ces données épidémiologiques permettent de dresser un bilan quantitatif des malformations cardiaques congénitales. À partir de ces informations, il est possible de conduire des études observationnelles ayant pour objectif d'étudier la récurrence ou l'héritabilité d'un trait.

Que ce soit par des données observationnelles, des études d'héritabilité ou de ségrégation ou par des estimations du risque de récurrence, toutes les études s'entendent pour dire que la pathogénèse des malformations cardiaques passe par une forte composante génétique. [2-7]

Dans un premier temps, nous regarderons une description des plusieurs types de malformations cardiaques congénitales. Ensuite, nous explorerons les différentes formes de variations génétiques afin de mieux comprendre les effets d'un changement du code génétique sur le continuum ADN-ARN-Protéine. Par la suite, nous regarderons pourquoi il est important d'identifier les causes des CHM. Enfin, nous explorerons les connaissances actuelles sur la génétique des malformations cardiaques congénitales.

### **Exemples choisis de malformations cardiaques congénitales.**

Les malformations cardiaques congénitales peuvent se présenter sous plusieurs formes. Ici, nous décrirons certaines formes des malformations cardiaques communes.



## Les communications interventriculaires (Figure 1)

Le terme *communication interventriculaire* décrit une ouverture du septum ventriculaire. Ces ouvertures peuvent être localisées à n'importe quel endroit du septum ventriculaire, peuvent être simples ou multiples et de formes ou de tailles variables.

Normalement, le cœur gauche pompe le sang à l'ensemble du corps, alors que le cœur droit pompe le sang vers les poumons. Lorsqu'il y a une communication entre les deux ventricules le sang qui se trouve dans le cœur gauche peut se mélanger au sang qui se trouve dans le cœur droit. Ce sang supplémentaire au niveau du cœur droit sera propulsé dans les artères pulmonaires ce qui fera travailler le cœur et les poumons plus qu'à l'habitude. Avec le temps, cette surcharge du cœur et des artères pulmonaires peut entraîner des lésions permanentes. La gravité d'une communication interventriculaire est proportionnelle à son diamètre.

Les communications interventriculaires sont des lésions souvent observées en clinique. Dans certains cas, elles font parties de malformations plus complexes comme la Tétralogie de Fallot, l'atrésie tricuspide ou les transpositions des gros vaisseaux.

La prévalence des communications interventriculaires est de 2.5 pour 1000 naissances vivantes.[8]

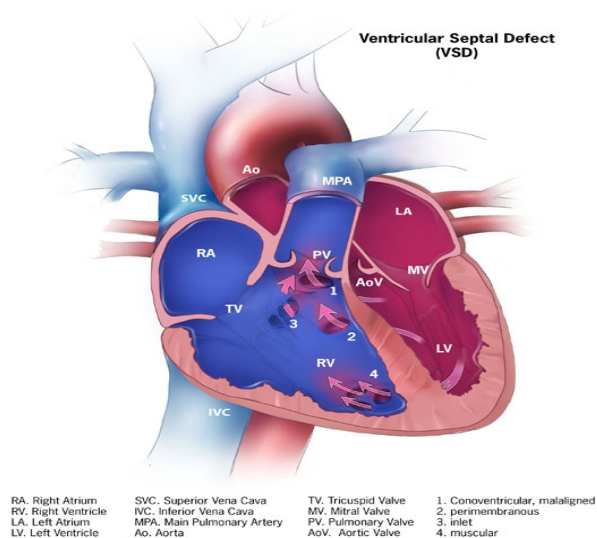


Figure 1 : Diagramme d'une communication interventriculaire. Le bleu représente du sang non-oxygéné. Le rouge représente du sang oxygéné. Tiré de Centers for Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities

### La Tétralogie de Fallot (Figure 2)

La Tétralogie de Fallot est une malformation cardiaque complexe qui est constituée d'une sténose pulmonaire, d'une communication interventriculaire, d'une dextroposition de l'aorte, c'est-à-dire son déplacement partiel au-dessus du ventricule droit, et d'une hypertrophie du ventricule droit.

Normalement, le cœur gauche pompe le sang à l'ensemble du corps, alors que le cœur droit pompe le sang vers les poumons. Lorsqu'il y a une Tétralogie de Fallot, l'obstruction de la valve pulmonaire connectant le ventricule droit aux artères pulmonaires empêche qu'une quantité normale de sang soit envoyée vers les poumons. Une portion du sang passe alors du ventricule droit au ventricule gauche au travers de la communication interventriculaire. Les enfants avec une Tétralogie de Fallot sont souvent cyanotiques parce qu'une quantité de sang non-oxygéné est envoyée dans la circulation systémique.

L'incidence de la Tétralogie de Fallot est estimée 3.26 par 10 000 naissances vivantes. [9]

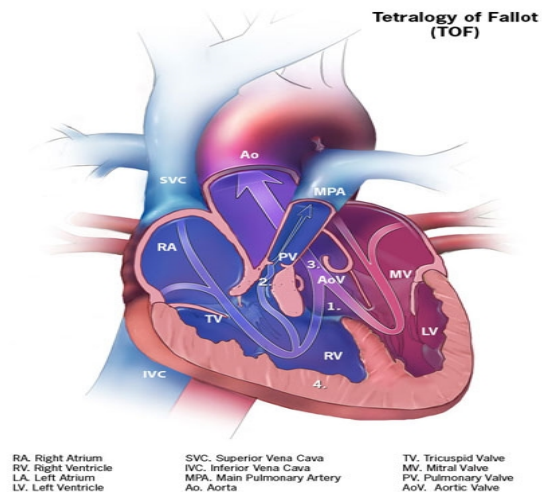


Figure 2 : Diagramme d'une Tétralogie de Fallot. Le bleu représente du sang non-oxygéné. Le rouge représente du sang oxygéné. Tiré de Centers for Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities

### Les communications interauriculaires (Figure 3)

Le terme *communication interauriculaire* décrit une ouverture du septum auriculaire. Tous les enfants naissent avec une ouverture entre les oreillettes. En effet, durant la vie fœtale, cette ouverture permet au sang de contourner la circulation pulmonaire qui n'est pas nécessaire puisque l'oxygénation du sang s'effectue via le placenta. À la naissance, cette ouverture, appelée foramen ovale, n'est plus requise et se referme spontanément. Parfois, cette ouverture est plus large qu'à la normale et ne se referme pas à la naissance ou on retrouve une ouverture supplémentaire dans le septum auriculaire. On parle alors d'une communication interauriculaire.

Normalement, le cœur gauche pompe le sang à l'ensemble du corps, alors que le cœur droit pompe le sang vers les poumons. Lorsqu'il y a une communication interauriculaire, le sang peut passer au travers de l'ouverture pour voyager du cœur gauche au cœur droit et être envoyé aux artères pulmonaires. Ce sang supplémentaire au niveau du cœur droit sera propulsé dans les artères pulmonaires ce qui fera travailler le cœur et les poumons plus qu'à l'habitude. Avec le temps, cette surcharge du cœur et des artères pulmonaires peut entraîner des lésions permanentes. La gravité d'une communication interauriculaire est proportionnelle à son diamètre.

La prévalence des communications interauriculaires est de 1 par 1000 naissances vivantes.[8]

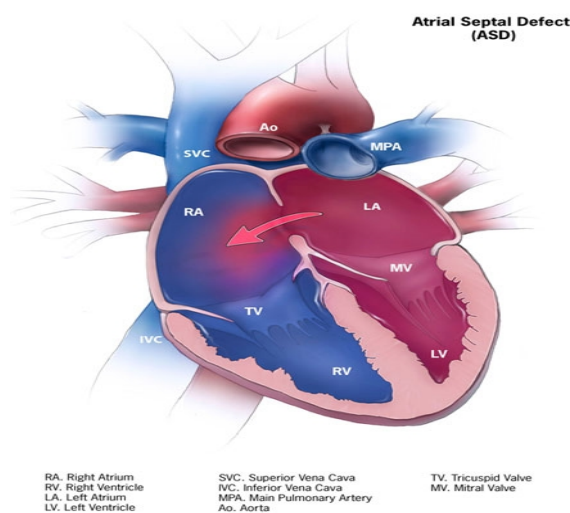


Figure 3 : Diagramme d'une communication interauriculaire Le bleu représente du sang non-oxygéné. Le rouge représente du sang oxygéné. Tiré de Centers for Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities

### Hypoplasie du cœur gauche (Figure 4)

Le terme hypoplasie du cœur gauche décrit un sous-développement du ventricule gauche, de l'aorte et des valves mitrales et aortiques. En raison de sa petite taille, le ventricule droit est incapable de supporter la circulation systémique.

Dans le cas d'une hypoplasie du cœur gauche, le sang qui revient des poumons passera au travers du foramen ovale. Le ventricule droit enverra le sang dans les artères pulmonaires et il pourra se rendre à l'aorte via le canal artériel. Cependant, lorsque ces structures (foramen ovale et canal artériel) se refermeront, il deviendra alors très difficile pour le cœur d'envoyer du sang oxygéné dans le reste du corps.

La prévalence de l'hypoplasie du cœur gauche est d'environ 0.25 par 1000 naissances vivantes.[8]

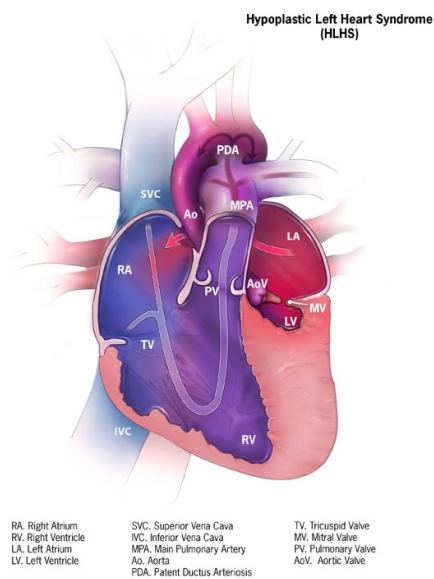


Figure 4 : Diagramme d'une hypoplasie du cœur gauche. Le bleu représente du sang non-oxygéné. Le rouge représente du sang oxygéné. Tiré de Centers for Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities

### Le canal artériel persistant (Figure 5)

Le canal artériel est une structure qui connecte l'origine de l'artère pulmonaire gauche à l'aorte juste au-dessous de l'artère sous-clavière gauche. Durant la vie fœtale, le canal artériel est aussi grand, sinon plus, que l'aorte descendante et il transporte le sang du ventricule droit à l'aorte descendante. Cette structure permet de court-circuiter la circulation pulmonaire du fœtus qui n'est pas nécessaire à l'oxygénation de son sang. Dans les premiers jours de vie, le canal artériel se referme spontanément. Lorsqu'il ne se referme pas, on parle alors d'un canal artériel persistant.

Lorsque le canal ne se referme pas, du sang provenant l'aorte est envoyé dans les artères pulmonaires. Ce sang supplémentaire au niveau des artères pulmonaires fera travailler le cœur et les poumons plus qu'à l'habitude et peut entraîner une congestion des poumons.

La prévalence du canal artériel persistant est de 0.8 par 1000 naissances vivantes. [8]

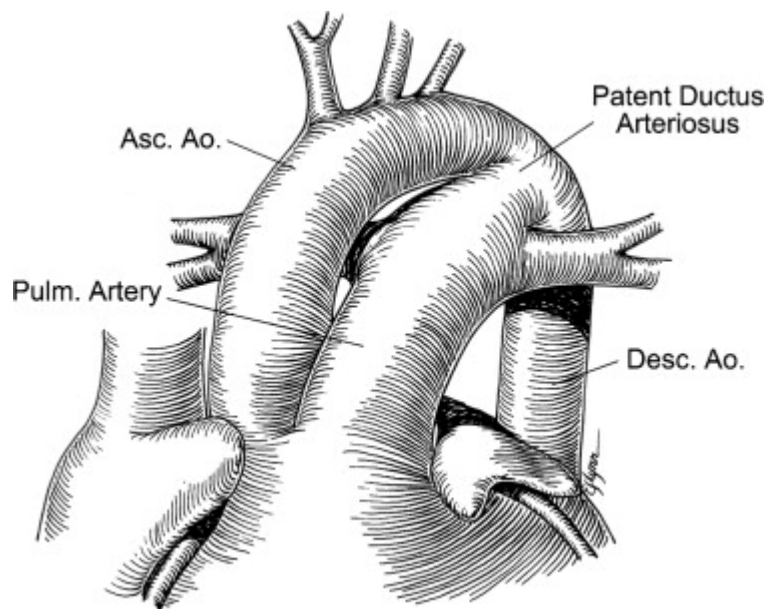


Figure 5 : Diagramme du canal artériel. Tiré de Fyler DC. Nadas' Pediatric Cardiology. Philadelphia: Hanley & Belfus, 1992.

### La coarctation de l'aorte (Figure 6)

La coarctation de l'aorte est une obstruction (rétrécissement) de l'aorte descendante qui est presque invariablement située au point d'insertion du canal artériel. Ce rétrécissement obstrue la circulation du sang à partir du cœur vers les parties du corps situées en aval. Ceci entraîne une augmentation de la pression dans le ventricule gauche et le cœur doit travailler plus fort afin de pousser le sang au-delà de la constriction de l'aorte. Ceci peut entraîner une hypertrophie du muscle cardiaque et endommager le muscle cardiaque travaillant trop fort.

La prévalence de la coarctation de l'aorte est d'environ 0.2 pour 1000 naissances vivantes. [10]

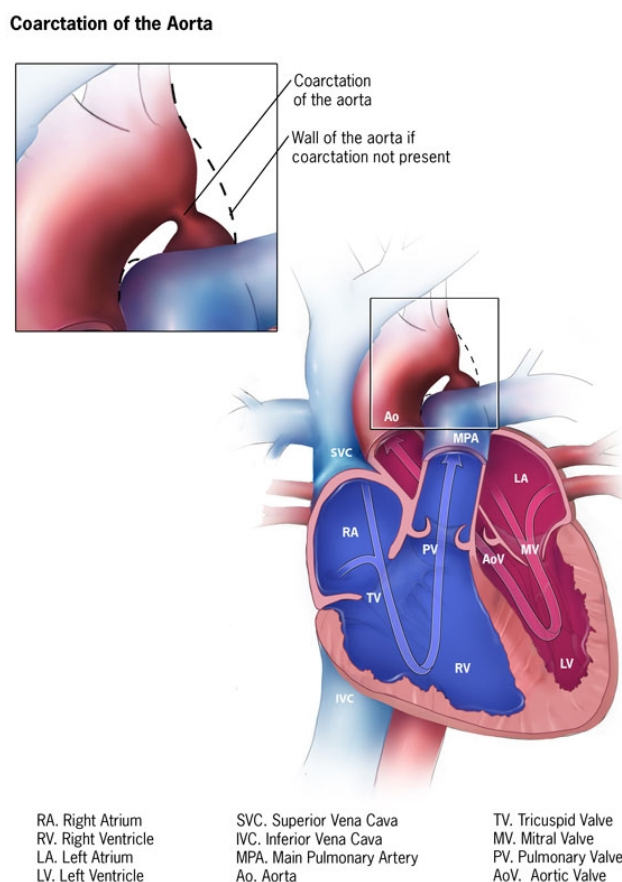


Figure 6 : Diagramme d'une coarctation de l'aorte. Le bleu représente du sang non-oxygéné. Le rouge représente du sang oxygéné. Tiré de Centers for Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities

## Les formes de variations génétiques

Une connaissance des différentes variations génétiques est nécessaire pour comprendre les études concernant la génétique des malformations cardiaques congénitales. Ici, nous présenterons un inventaire des variations génétiques fréquentes.

L'ADN du génome humain est susceptible aux mutations (changement de la séquence). Les changements peuvent être de l'ordre d'un seul nucléotide à la disparition complète d'un chromosome. (Figure 7)

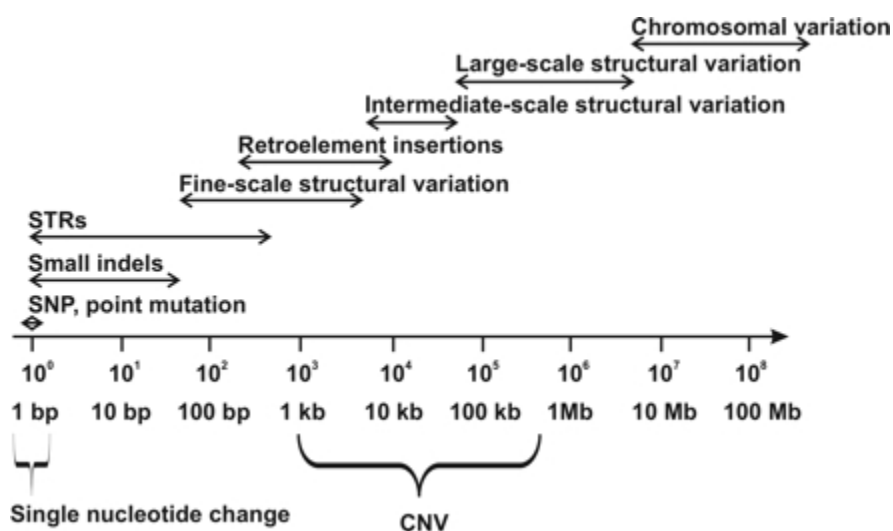


Figure 7 : Continuum des variations du génome humain. Tiré de Copy Number Variation in the Human Genome and Its Implications for Cardiovascular Disease. [11]

## Les anomalies chromosomiques

Les anomalies chromosomiques regroupent l'ensemble des changements qui résultent en une altération visible des chromosomes. Les anomalies numériques regroupent la polyploïdie (l'ajout de un ou plusieurs chromosomes) et l'aneuploïdie (le retrait de un ou plusieurs chromosomes). Ces changements du nombre de chromosomes ont des effets sérieux et peuvent être létaux. Un exemple bien connu d'anomalies chromosomiques est la trisomie 21 (syndrome de Down).

Les anomalies structurales des chromosomes surviennent lorsqu'il y a cassure du chromosome, lors de la recombinaison ou lors d'un dommage à l'ADN (ex. radiation, produits chimiques), et que ces dommages ne sont pas réparés correctement par la cellule. Le tableau 1 résume les types d'anomalies structurales possibles.

Tableau 1 : Types d'anomalies structurales des chromosomes, adapté de Human Molecular Genetics, 2<sup>nd</sup> Edition, 1999

	1 chromosome impliqué	2 chromosomes impliqués
1 cassure	Délétion terminale	
2 cassures	Délétion interstitielle Inversion Chromosome en anneau Duplication ou délétion par un échange inégal des chromatides-soeurs	Translocation réciproque Translocation Robertsonienne Duplication ou délétion par recombinaison inégale
3 cassures	Plusieurs réarrangements possibles ex. délétion, duplication, insertion intra/interchromosomiques	

### **Les variations du nombre de copies (copy-number variation)**

Les variations du nombre de copies sont des anomalies structurales de l'ADN qui résultent en un nombre anormal de copies d'une section de l'ADN. Ces variations représentent une délétion ou une duplication du génome d'une longueur entre 1 et 1000 kilobases. (Figure 7 et 8).



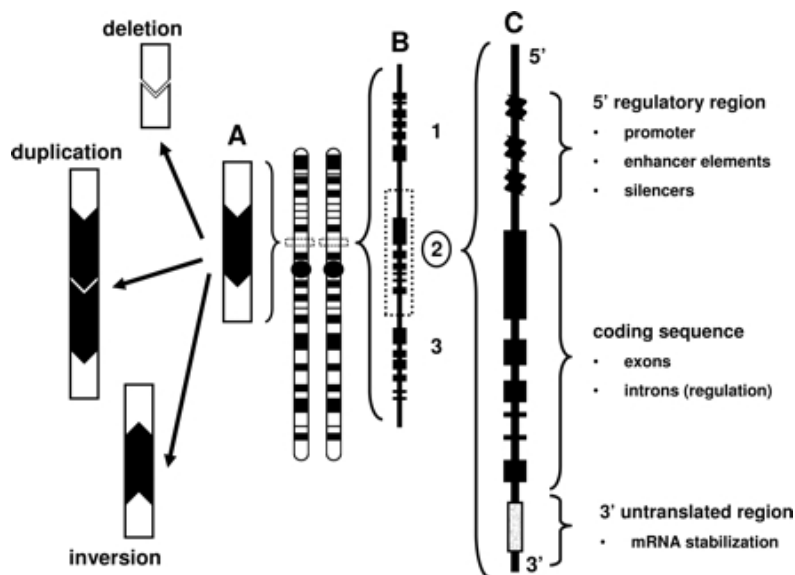


Figure 8 : Diagramme d'une variation du nombre de copies. Tiré de Copy Number Variation in the Human Genome and Its Implications for Cardiovascular Disease. [11]

### Les mutations ponctuelles (figure 9)

Un changement d'un nucléotide dans une molécule d'ADN est appelé une mutation ponctuelle (de l'anglais point mutation). Il existe deux types de mutation ponctuelle :

- les transitions qui sont un changement d'une pyrimidine (T ou C) pour une pyrimidine ou d'une purine (A ou G) pour une purine. ex. T pour C, A pour G, etc.
- les transversions qui sont un changement d'une purine (T ou C) pour une pyrimidine (A ou G) et vice versa. ex. T pour A, G pour C, etc.

Ces substitutions peuvent entraîner des mutations *missense* (remplacement d'un acide aminé par un autre), *nonsense* (remplacement d'un acide aminé par un codon stop), entraîner une modification des sites d'épissage, en créant ou en détruisant un signal d'épissage des jonctions exon-intron, ou être synonyme (mutation qui ne change pas l'acide aminé car elle résulte en un codon identique)

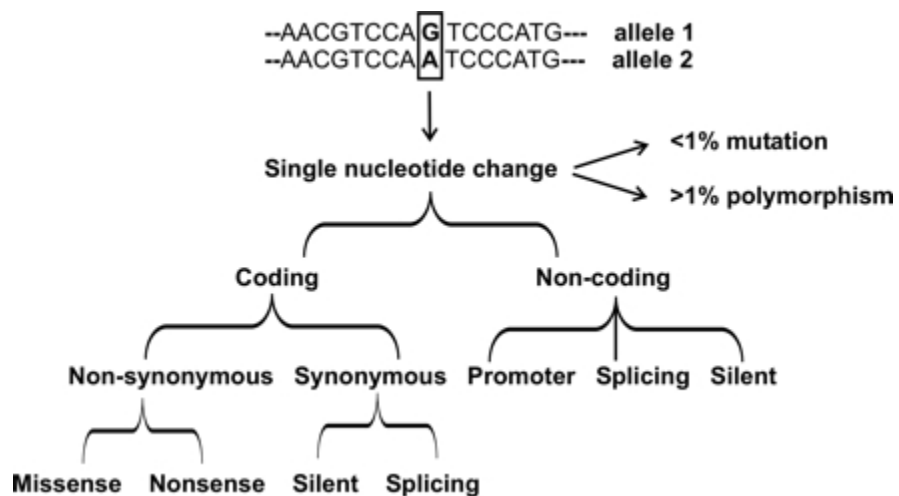


Figure 9 : Diagramme des conséquences possibles des mutations ponctuelles. Tiré de Copy Number Variation in the Human Genome and Its Implications for Cardiovascular Disease.

[11]

### Les insertions et les délétions (figure 10)

Un autre type de mutation survient lorsqu'il y a une insertion ou une délétion de un ou plusieurs nucléotides dans une molécule d'ADN. Ce type de mutation entraîne un changement du cadre de lecture et produit une protéine aberrante.

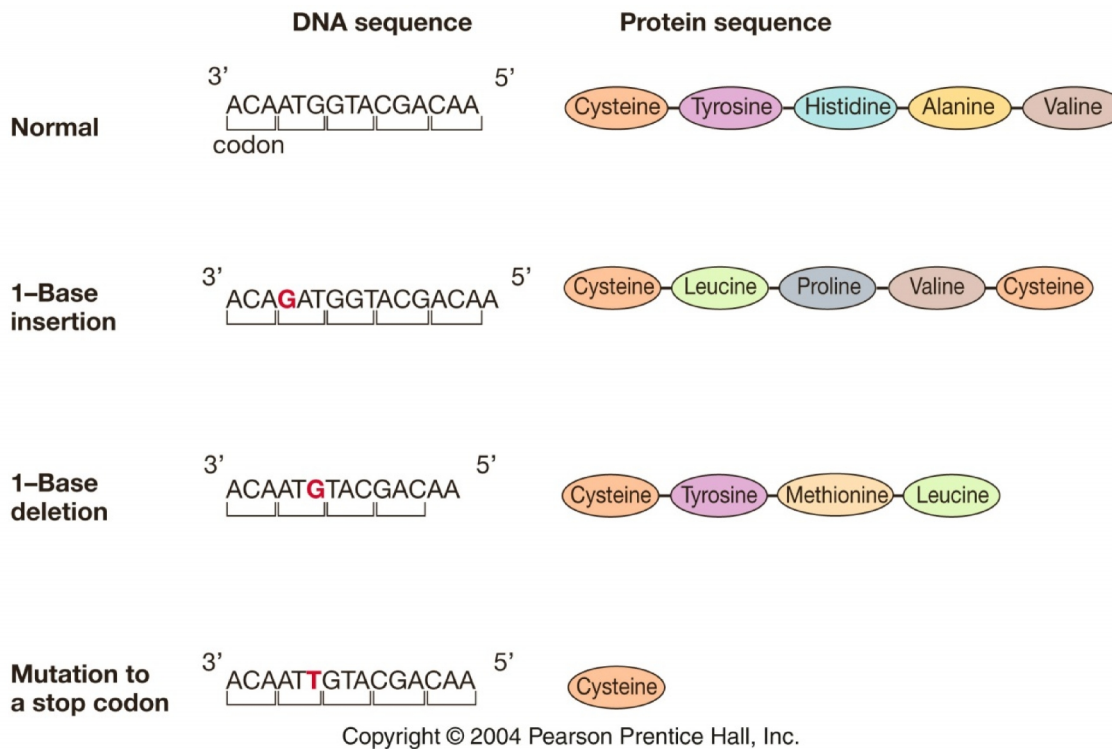


Figure 10: Diagramme d'une insertion ou d'une délétion d'un nucléotide dans une molécule d'ADN. Tiré de Essentials of Genetics, Pearson Prentice Hall, Inc.

### **Pourquoi identifier les causes génétiques des malformations cardiaques congénitales?**

Au cours des 2 dernières décennies, l'amélioration des techniques d'imageries, de chirurgies et de soins longitudinaux a grandement améliorée le pronostic des enfants diagnostiqués avec une CHM. Actuellement, plus de 70% des enfants se rendront à l'âge adulte, même avec une malformation complexe.[12] Les études récentes estiment une prévalence des CHM à 3000 par million d'individus dans la population adulte. Malgré ces avancées dans le domaine médical, les connaissances sur l'étiologie des malformations cardiaques restent limitées. L'identification des causes possibles des malformations cardiaques permettrait une meilleure compréhension de leur pathophysiologie et permettrait de mieux définir le risque de survenu de la maladie. Ces informations sont primordiales pour la prévention efficace d'une maladie. L'identification des causes génétiques pourrait permettre d'améliorer certains aspects de la prise en charge des patients comme :

- D'identifier les systèmes biologiques impliqués
- De donner les outils nécessaires au clinicien pour établir un pronostic
- D'identifier les facteurs génétiques ayant une implication pour le conseil génétique au moment de la reproduction ou pour le dépistage familial

### **Les causes génétiques des malformations cardiaques congénitales (CHM)**

Les malformations cardiaques congénitales surviennent dans 8 pour 1000 naissances à terme. La majorité des CHM résultant d'un mode de transmission monogénique sont associées à des malformations extra-cardiaques. Elles sont donc des formes syndromiques de CHM. Les exemples les plus cités comprennent le syndrome de Holt-Oram, le Syndrome d'Alagille et le Syndrome de Noonan.

En effet, 90% des cas de syndrome d'Alagille sont causés par des mutations ponctuelles dominantes affectant JAG1[13] et de façon moindre NOTCH2.[14]

Des mutations ponctuelles de perte de fonction de TBX5 sont responsables du syndrome Holt-Oram, en interférant avec le rôle spécifique de cette protéine dans la différenciation des cellules, la mise en place des patrons et des interactions avec les protéines responsables de l'organogénèse.[15, 16]

Le syndrome de Noonan est un phénotype génétiquement hétérogène entraîné par des mutations ponctuelles dans au moins un des 11 gènes associés à la condition : PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS, BRAF, MEK1, MEK2, HRAS, NRAS, SHOC2, et CBL. Tous ces gènes sont impliqués dans la voie de signalisation RAS-MAPK qui est essentiel pour la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.[17-19]

En contraste, la majorité des CHM non-syndromiques sont sporadiques et les cas familiaux ayant un mode de transmission monogénique et n'étant pas associé à un syndrome sont rares.[20-27] Cette rareté de cas familiaux rend difficile l'identification des gènes responsables des CHM par une approche traditionnelle d'analyse de liaison, de clonage de gènes candidats et de clonage positionnel.

Un modèle de transmission multifactorielle, impliquant plusieurs gènes à faible pénétrance (mutations communes) ou gènes à pénétrance intermédiaire (mutations rares) superposés à des facteurs environnementaux défavorables, a été proposé pour expliquer la nature sporadique des

CHM non-syndromique. [28] Cependant, cette hypothèse reste difficile à prouver et seulement quelques études ont apporté des preuves d'effets d'accumulation ou d'interaction.[28-31]

Au cours des prochains paragraphes, nous ferons une revue de la littérature des facteurs génétiques impliqués dans le développement de CHM non-syndromique.

### **Les mutations causant la maladie et ayant une haute pénétrance**

Au cours des dernières années, une augmentation des rapports décrivant des familles avec CHM compatible avec un mode de transmission monogénique a facilité le clonage positionnel de plusieurs gènes causant la maladie comme ZIC3, GATA4, NKX2.5, NKX2.6, MYH6, ACTC1 et NOTCH1. En parallèle, les approches par clonage de gènes candidats ont aussi identifié plusieurs gènes incluant : TBX1, TBX20, CFC1, CITED2, CRELD1, FOG2, LEFTY2, NODAL, GDF1, FOXH1, TDGF, MYOCD, TLL1, THRAP2 et ANKRD1. (voir le Tableau 2)

Tableau 2 : Mutations de haute pénétrance contribuant aux CHM non-syndromiques. Adapté de Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations.[32]

	<b>Gènes</b>	<b>Phénotypes cardiaque</b>	<b>Références</b>
<b>Ligands - Récepteurs</b>	NOTCH1	Sténose aortique Valve aortique bicuspidie	[33-36]
	CFC1	Hétérotaxie Transposition des gros vaisseaux Tétralogie de Fallot Communication interauriculaire Communication interventriculaire	[29, 37, 38]
	LEFTY2	Hétérotaxie	[39]
	ACVR2B	Hétérotaxie	[40]

Facteurs de transcription	GDF1	Tétralogie de Fallot	[41]
	NODAL	Hétérotaxie	[42]
	TDGF1	Tétralogie de Fallot	[29]
	JAG1	Sténose pulmonaire Tétralogie de Fallot	[43, 44]
	GATA4	Communication interauriculaire Tétralogie de Fallot Communication interauriculaire et sténose pulmonaire Communication interventriculaire Hypoplasie du ventricule droit Anomalie partielle du retour veineux pulmonaire	[45-52]
	GATA6	Tronc artériel commun Sténose pulmonaire	[53]
	NKX2.5	Communication interauriculaire – Bloc atrioventriculaire Tétralogie de Fallot Hypoplasie du cœur gauche Coarctation de l'aorte Hétérotaxie Transposition des gros vaisseaux	[20, 46, 54-68]

	Communication interventriculaire Maladie d'Ebstein	
NKX2.6	Tronc artériel commun	[69]
TBX20	Communication interauriculaire, Coarctation de l'aorte  Communication interventriculaire  Canal artériel persistant  Hypoplasie du ventricule gauche, sténose de la valve mitrale	[22]
CITED2	Communication interventriculaire  Communication interauriculaire	[70]
FOXH1	Tétralogie de Fallot	[29]
ZIC3	Hétérotaxie  Transposition des gros vaisseaux  Communication interauriculaire, sténose pulmonaire	[71, 72]
TBX5	Communication interventriculaire  Communication interauriculaire	[73]
TBX1	Communication interventriculaire  Interruption de l'arc aortique	[74, 75]
ANKRD1	Anomalie totale du retour veineux	[76]

		pulmonaire	
<b>Protéines contractiles</b>	MYH11	Canal artériel persistant, anévrisme aortique	[77]
	ACTC1	Communication interventriculaire Communication interauriculaire	[78-80]
	MYH6	Communication interauriculaire	[81]
	MYH7	Communication interauriculaire, Maladie d'Ebstein	[82]
	MYBPC3	Communication interventriculaire Communication interauriculaire	[83-85]

Les CHM non-syndromiques dans ces rapports sont causées par des mutations autosomales dominantes de haute pénétrance. Cependant, la majorité des mutations rapportées dans cette littérature sont des mutations *missenses* pour laquelle la nature pathogénique ou monogénique n'a pas été formellement étudiée. De plus, certaines de ces mutations ont une pénétrance réduite (intermédiaire et faible). (voir Tableau 3)



Tableau 3 : Mutations rares de pénétrance intermédiaire/faible contribuant aux CHM non-syndromiques. Adapté de Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations.[32]

<b>Gènes</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Phénotypes cardiaques</b>	<b>Références</b>
CRELD1		Communication atrioventriculaire, dextrocardie	[86-88]
NKX2.5	Facteur de transcription	Tétralogie de Fallot Communication interventriculaire Communication interauriculaire	[54, 59, 65, 89]
NOTCH1	Facteur de transcription	Obstructions du cœur gauche (LVOTO)	[34]
GATA4	Facteur de transcription	Communication interauriculaire Communication atrioventriculaire	[52, 90]
ZIC3	Facteur de transcription	Transposition des gros vaisseaux	[91]
FOG2	Facteur de transcription	Tétralogie de Fallot	[92]
FOXH1	Facteur de transcription	Transposition des gros vaisseaux	[91]

		Tétralogie de Fallot	
NODAL	Ligand	Hétérotaxie-CHM Transposition des gros vaisseaux	[42, 91]
THRAP2	Récepteur	Transposition des gros vaisseaux	[93]
MYOCD	Protéine nucléaire régulatrice	Sténose pulmonaire	[94]
CFC1	Récepteur	Transposition des grands vaisseaux Tétralogie de Fallot Interruption de l'arc aortique	[95, 96]

Comme il est possible de le voir sur la Figure 11, le développement cardiaque repose sur une activité optimale et spécifique des différents gènes impliqués dans ce processus.

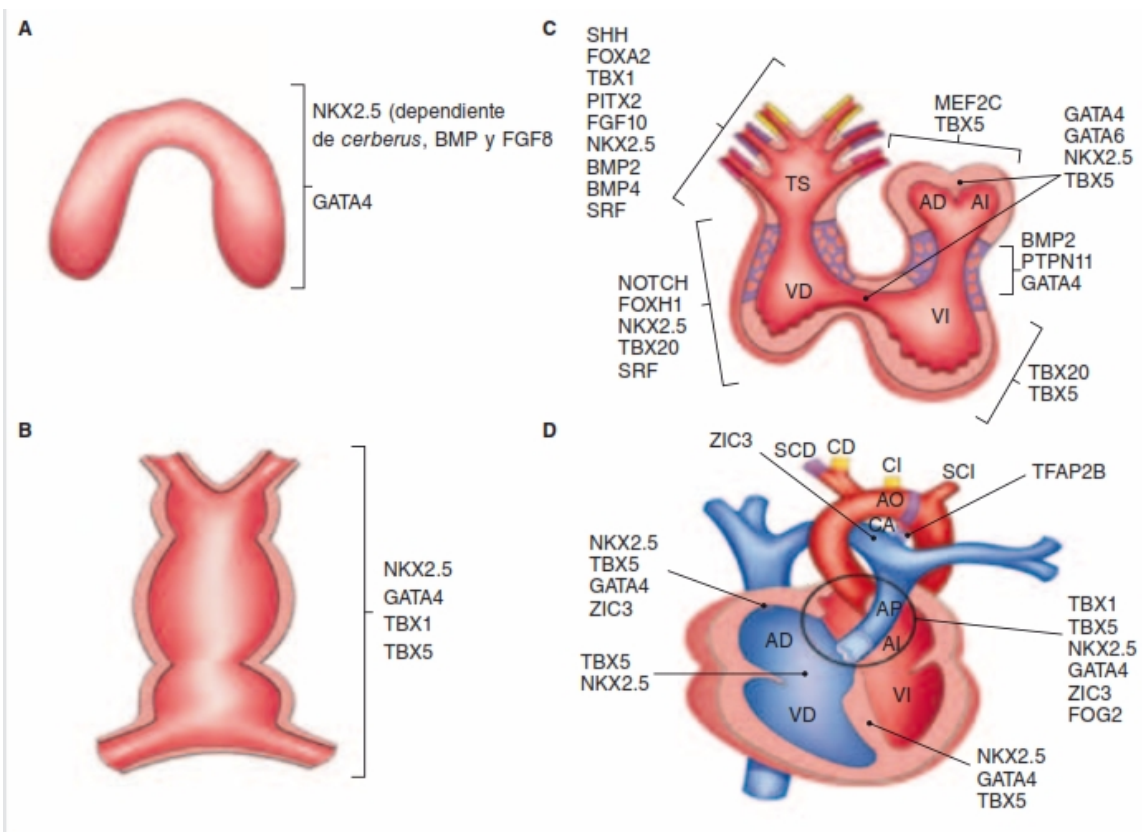


Figure 11 : Représentation schématique de la morphogénèse cardiaque. A. Cœur à 15 jours de gestation B. Cœur à 21 jours de gestation C. Cœur à 28 jours de gestation D. Cœur à 50 jours de gestation. Tiré de Changing the paradigm of congenital heart disease: from the anatomy to the molecular etiology. [97]

La majorité des gènes mentionnés ci-haut et impliqués dans les CHM non-syndromique sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la formation du cœur. Ces facteurs de transcription incluent GATA4, FOG2, NKX2.5, NKX2.6, ZIC3, CITED2, TBX1, and TBX20.

Donc, des mutations différentes au sein d'un même gène peuvent contribuer à plusieurs phénotypes différents de CHM. Le tableau 4 résume les gènes et les CHM associés.

Tableau 4 : Gènes associés aux CHM non-syndromiques en fonction du phénotype. Adapté de Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations[32]

CHM	Sténose aortique	C. inter-ventriculaire	C. inter-auriculaire	Sténose pulmonaire	Tétralogie de Fallot	C. auriculo-ventriculaire	Transposition des grands vaisseaux	Hypoplasie du cœur gauche	Hétérotaxie
Incidence par 1000 naissances vivante	14 / 0.8	4	1.0	0.7	0.4	0.3	0.2	0.2	0.1
Gènes	NOTCH1	NKX2.5	NKX2.5	GATA4	NKX2.5	GATA4	NKX2.5	NKX2.5	ZIC3
		GATA4	GATA4	MYOCD	GATA4	CRELD1	THRAP2	NOTCH1	GDF1
		TBX20	TBX20	JAG1	TBX1	CFC1	ZIC3	HAND1	CFC1
		TBX1	MYH6	GATA6	FOG2	GDF1	CFC1	GJA1	LEFTY2
		ACTC1	ACTC1		CFC1	NKX2.5	GDF1		ACVR2B
		MYBPC3	MYH7		NOTCH1	TBX5	THRAP2		NODAL
		TBX5	MYBPC3		GDF1	HEY2	FOXH1		NKX2.5
		CITED2	TBX5		TDGF1	PTPN11			CRELD1
			CITED2		JAG1	ALK2			FOXH1
			TLL1		FOXH1				

### Les mutations causant la maladie et ayant une pénétrance réduite

Comme nous l'avons mentionné précédemment, un modèle de transmission multifactoriel, impliquant plusieurs gènes à faible pénétrance (mutations communes) (Tableau 5) ou gènes à pénétrance intermédiaire (mutations rares) (Tableau 3) superposé à des facteurs environnementaux défavorables, a été proposé pour expliquer la nature sporadique des CHM non-syndromique.

Comme nous pouvons le constater, certaines mutations à pénétrance faible ou intermédiaire ont été associées avec les CHM, mais les preuves supportant leurs contributions causales aux CHM sont limitées. Dans certains cas, les mutations *missenses* identifiées chez les personnes affectées se retrouvent aussi dans l'ADN des membres non-affectés. Dans d'autres cas, les mutations sont présentes au sein de la population contrôle avec une fréquence plus petite. Enfin, dans plusieurs cas, la signification fonctionnelle de ces mutations *missenses* est

inconnue et il pourrait s'agir autant de polymorphisme non-fonctionnel que de mutations causant la maladie, mais ayant une pénétrance réduite.

Enfin, la stratégie utilisée pour identifier les mutations ayant une pénétrance réduite consiste à cloner des gènes déjà identifiés dans les cas de CHM causés par des mutations de haute pénétrance. Comme des mutations dans les régions de contrôle non-codantes pourraient aussi affecter la fonction de ces gènes, il est possible de supposer que la fréquence des mutations causales ayant une pénétrance réduite est sous-estimée.

### **Les mutations causant la maladie et ayant une faible pénétrance**

Les mutations communes sont généralement identifiées par des études pan-génomiques d'associations (GWAS – Genome Wide Association Studies). Ces études permettent d'évaluer plusieurs milliers de polymorphismes simultanément en capitalisant sur la technologie des puces à ADN. À notre connaissance, il n'y a pas eu de GWAS réalisé sur les CHM. Comme nous pouvons le constater dans le Tableau 5, certaines études cas-contrôles ont rapportée des associations positives entre des mutations communes et certaines CHM. Une limitation sérieuse avec ces conclusions est que les échantillons à la base de ces études sont limités. Les conclusions qui en découlent doivent de ce fait être considérées avec circonspection. De plus, certaines études sont contradictoires et n'ont pas été répliquées.

Tableau 5 : Mutations communes de faible pénétrance contribuant aux CHM non-syndromiques. Adapté de Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations.[32]

<b>Gènes</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Phénotypes cardiaques</b>	<b>Références</b>
MTHFD1	Cycle de la méthylation	Tétralogie de Fallot, sténose aortique	[98]
MTRR	Cycle de la méthylation	variés	[31, 99]

SLC19A1	Cycle de la méthylation	variés	[100]
NNMT	Cycle de la méthylation	variés	[30]
TCN2	Cycle de la méthylation	variés	[31]
NPPA	Protéine vasoactive	Malformation conotroncale	[101]
NOS3	Protéine vasoactive	Malformation conotroncale	[101]
VEGF	Polypeptide mytogène	Communication interventriculaire  Tronc artériel commun  Tétralogie de Fallot	[102, 103]
NFATC1	Facteur de transcription	Communication interventriculaire	[104]

### **Les anomalies chromosomiques et les CNV**

Bien avant l'utilisation des techniques de cytogénétique avancées, l'observation standard des chromosomes révélait des anomalies chromosomiques dans 8-13% des CHM.[105] En contraste, parmi tous les enfants avec des anomalies chromosomiques, au moins 30% ont des CHM, avec des taux proches de 100% dans le cas de la trisomie 18[106] et près de 45% dans les trisomies 21[107]. L'amélioration des techniques de cytogénétique comme l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) et les puces d'hybridation comparative de l'ADN (aCGH) ont permis d'observer les chromosomes plus finement et de détecter des variations du nombre de copies. L'identification de plusieurs syndromes de micro-délétions et de micro-duplications a ainsi été possible. Par exemple, le syndrome de duplication 22q11.1[108], le syndrome de duplication 8p23.1[109],le syndrome de délétion 9q34[110], le syndrome de délétion

17p11.2[111], le syndrome de délétion 20.12p2-p12.3[112], le syndrome de délétion 16p11.2[113, 114], le syndrome de délétion 1q21.1[115-117] ont été mis au jour.

Certains cas sporadiques non-syndromiques de CHM sont associés aux régions chromosomiques 8p23.1, 9q34.3 et 20p12.2. Une variation du nombre de copies du chromosome 8p23.1 est délétère pour GATA4[118], une variation du nombre de copies du chromosome 20p12.2 et 9q34.3 est délétère pour deux membres de la voie de signalisation NOTCH, soit JAG1 et NOTCH1.[119] D'autres exemples montrent que les délétions et duplications chromosomiques et les variations du nombre de copies sont responsables de plusieurs CHM non-syndromiques. [119, 120] Toutes ces observations montrent l'importance de ces délétions et duplications sous-chromosomiques comme des joueurs importants de l'étiologie des CHM.

### **Qu'en est-il de l'hypothèse multifactorielle des CHM?**

Jusqu'ici, nous nous sommes concentrés sur les aspects génétiques des CHM. Pour mieux comprendre l'hypothèse multifactorielle des CHM, il importe de s'attarder à quelques études sur les risques de récurrence des CHM et sur quelques études de cas jumeaux.

Dans une minorité de cas, il est possible de calculer un risque de récurrence précis d'une CHM en utilisant les familles atteintes ayant un mode de transmission Mendélien. En l'absence de ces informations, il est seulement possible de calculer un risque empirique. Dans la majorité de cas, le risque de récurrence chez le frère ou la sœur d'un individu affecté, lorsque ces parents ne sont pas affectés, est de 1 à 6%. [28, 121] Si plus d'un individu d'une fratrie est affecté par une CHM, ce risque peut augmenter jusqu'à 10%.[4] Le risque de récurrence peut également différer selon le sexe du parent affecté [28] (Tableau 6)

Tableau 6 : Risque de récurrence pour certaines malformations cardiaques congénitales, tiré de Congenital heart disease : current knowledge about causes and inheritance [122]

<b>6 Recurrence risk (RR) of different types of congenital heart disease (CHD)<sup>6,8,13,24</sup></b>				
<b>Cardiac lesion</b>	<b>RR in siblings with unaffected parents</b>		<b>RR in children of affected parents</b>	
	<b>1 child affected</b>	<b>≥ 2 children affected</b>	<b>Mother affected</b>	<b>Father affected</b>
VSD	3%	10%	9%–10%	2%–3%
ASD	2%–3%	8%	6%	1%–2%
TOF	2%–3%	8%	2%–5%	1%–2%
CoA	2%	6%	4%	2%–3%
AS	2%	6%	12%–20%	5%
PS	2%	6%	6%–7%	2%
HLHS	3%	10%	nr	nr
AVSD	3%–4%	nr	10%–14%	1%
PA	1%	3%	nr	nr
TA	1%	3%	nr	nr
TGA	1%–2%	5%	nr	nr
L-TGA	5%–6%	nr	nr	nr
Ebstein anomaly	1%	3%	6%	nr
Heterotaxy	5%–6%	nr	nr	nr
<b>Overall</b>	<b>1%–6%</b>	<b>3%–10%</b>	<b>2%–20%</b>	<b>1%–5%</b>

ASD = atrial septal defect. AS = aortic stenosis. AVSD = atrioventricular septal defect. CoA = coarctation of the aorta. HLHS = hypoplastic left heart syndrome. L-TGA = congenitally corrected transposition of the great arteries. nr = not reported. PA = pulmonary atresia. PS = pulmonary stenosis. TA = truncus arteriosus. TGA = transposition of the great arteries. TOF = tetralogy of Fallot. VSD = ventricular septal defect. ◆

Une étude s'est intéressée à la concordance (i.e. la survenue de la même CHM) dans la récurrence de CHM au sein des membres d'une même famille. Elle démontre que les taux de concordance varient avec une concordance exacte de 37% (intervalle de 0 à 80%). La concordance exacte était plus élevée chez les familles avec trois cas ou plus de CHM à 55%. [4]



Afin de cerner le rôle potentiel des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux, plusieurs études de jumeaux dizygotiques ont été réalisées.[123-125] Ces études permettent de comparer des membres d'une même fratrie qui possèdent un génome différent, mais qui se sont développés dans le même utérus. L'étude la plus robuste sur le sujet comprend une cohorte de 1743 patients consécutifs avec malformations cardiaques congénitales dont 66 paires de jumeaux/triplets (66 garçons/72 fillettes).[125] Le taux de récurrence est plus élevé dans le groupe des jumeaux lorsqu'on le compare au groupe des non-jumeaux et leur fratrie (13.6% vs 4%). La concordance exacte des CHM était de 100% dans le groupe des jumeaux contre 51.4% dans le groupe des non-jumeaux. De plus, une méta-analyse récente des études de jumeaux retrouve un risque de récurrence de CHM de 9.18%.[126]

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypothèse multifactorielle infère que c'est l'interaction entre plusieurs facteurs génétiques et facteurs environnementaux qui donne naissance à la maladie. L'un des arguments en faveur de l'hypothèse multifactorielle est que le risque de récurrence des CHM non-syndromiques est de 2 à 10%. Ce taux de récurrence est intermédiaire entre le haut de taux de récurrence observé dans les cas monogénique hautement pénétrant et le taux négligeable dans les cas de CHM d'origine seulement environnemental. À ce jour, quelques mutations communes ayant une faible pénétrance et quelques mutations rares ayant une pénétrance réduite ont été associées aux CHM non-syndromiques. (Tableau 3 et tableau 5)

En résumé, l'origine génétique des CHM non-syndromiques reste encore imprécise malgré tous les progrès réalisés à ce jour, car :

- Il y a seulement un petit nombre de mutations hautement/intermédiairement pénétrantes et affectant un seul gène qui ont été identifiées comme causant des CHM. Cette observation ne permet pas de proposer une contribution majeure de ce groupe d'altérations génétiques.
- La contribution des mutations communes à l'étiologie des CHM non-syndromiques reste largement inconnue et il est donc impossible de savoir si elles jouent un rôle majeur.

Avec l'arrivée des nouvelles technologies de séquençage de nouvelle génération qui permettent de séquencer le génome ou l'exome entier des familles ou des cas sporadiques de CHM, il sera très intéressant de voir quelles mutations seront identifiées. De plus, avec la quantité d'information génétique que ces études génèreront, elles auront le potentiel de pouvoir analyser les différentes interactions entre les facteurs génétiques à une échelle qui n'était pas possible auparavant et qui pourront peut-être supporter ou réfuter l'hypothèse multifactorielle des CHM.

## **CHAPITRE 1.2 : Les facteurs de risque non-génétiques des malformations cardiaques congénitales**

Comme nous l'avons constaté dans le chapitre 1, les facteurs génétiques des CHM font l'objet de recherches intensives. Cependant, la littérature concernant les facteurs de risques non-génétiques n'a pas évolué à la même vitesse et moins d'information est disponible sur le sujet. Ce chapitre fait un tour d'horizon rapide des facteurs de risques non-génétiques en lien avec les CHM. Nous présenterons certaines études sur les polluants environnementaux, la maladie durant la grossesse, la prise de médicament durant la grossesse et nous discuterons de deux molécules non-thérapeutiques utilisées par beaucoup de femmes enceintes ou en âge de procréer soit l'alcool et le tabac. Même si plusieurs études sont nécessaires dans ce domaine, cette discussion permettra de discuter différentes opportunités potentielles pour la prévention de la maladie.

### **Les polluants environnementaux**

#### **Les solvants organiques**

Dans le cas des solvants organiques, il existe des études rapportant une augmentation de l'incidence de malformations du cœur gauche (LVOTO) lors d'exposition à des solvants, des dégraissants et de la peinture. [127] Aussi, certaines études établissent un lien entre l'exposition occupationnelle aux solvants organiques, aux laques, aux huiles minérales et à la peinture et les risques de communications intra-ventriculaires (CIV)[128], de malformations conotruncales[129] et de coarctation de l'aorte (CoA)[130].

## **Les herbicides, pesticides et rodenticides**

Dans le cas des chimiques agricoles, les premières observations émanent d'une publication réalisée dans la région d'Atlanta, aux États-Unis, qui suggérait une association entre les malformations conotruncales et les pesticides.[131] Dans la BWIS, il était possible d'observer une augmentation du risque de transposition des gros vaisseaux lors d'exposition possible aux pesticides et rodenticides et d'anomalie du retour veineux pulmonaire et de communications interventriculaires lors d'exposition possible aux herbicides.[127] Des études plus récentes tendent à soutenir les tendances observées dans les premières études. [132, 133]

## **Qualité de l'eau et de l'air**

La qualité de l'eau et de l'air représente une variable qui est de plus en plus explorée par les écotoxicologistes pour son impact sur les malformations congénitales. Une étude récente réalisée en Californie, aux États-Unis, démontre un lien possible entre les niveaux de gaz ambiants et les CHM. Ainsi, les chercheurs de cette étude démontrent une association entre des niveaux élevés de monoxyde de carbone et les CIV, entre des niveaux élevés d'ozone durant le 2<sup>e</sup> trimestre de grossesse et les anomalies de l'aorte et des valves cardiaques et une diminution des risques lorsque la qualité de l'air est acceptable durant le 3<sup>e</sup> trimestre.[134] Des tendances similaires ont aussi été observées dans une autre étude indépendante réalisée au Texas, aux États-Unis.[135] Lorsqu'on s'intéresse à la qualité de l'eau, les études publiées démontrent une augmentation de la prévalence des malformations cardiaques lorsqu'il y a consommation d'eau contaminée par la mère, par exemple, au trichloréthylène.[136, 137]

## **La maladie de la mère durant la grossesse**

### **Le diabète pré-gestationnel**

Plusieurs études ont démontré une association entre les CHM et le diabète pré-gestationnel.[9, 138-142] Le diabète pré-gestationnel est un diabète qui existait avant la grossesse et il doit être distingué du diabète de grossesse qui survient ou qui est reconnu pour la première fois durant la grossesse. Le diabète pré-gestationnel a été associé avec plusieurs types de CHM : la coarctation de l'aorte, la transposition des gros vaisseaux, les communications

interauriculaires , les communications interventriculaires , l'hypoplasie du coeur gauche, les cardiomyopathies et le canal artériel persistant.

L'étiologie des CHM associées au diabète pré-gestationnel reste encore à déterminer, mais il apparaît que l'hyperglycémie pourrait y jouer un rôle.[141] En effet, il existe une association positive entre l'hyperglycémie maternelle durant l'embryogénèse et le risque de malformations congénitales chez les enfants de mère diabétique.[143, 144] La prévalence de malformations congénitales chez les femmes diabétiques avec un bon contrôle de leur glycémie est similaire à la population générale. [144]

### **Maladie fébrile, rubéole et influenza**

#### **La rubéole**

Les premières associations entre des maladies infectieuses et les CHM proviennent d'études ayant observé une relation entre la rubéole et le syndrome rubéolaire du nouveau-né, dès 1945.[145] Il est maintenant bien établi que la rubéole peut entraîner des sténoses des branches pulmonaires[146] et un canal artériel persistant.[146-149] Une immunisation adéquate de la mère permet d'éliminer presque entièrement ce risque.[150]

#### **L'influenza**

Certaines de ces études se sont aussi intéressées à l'association entre l'influenza et les CHM. Elles ont démontrées une association positive entre l'influenza et les CHM[151-153]. Cependant, la pathogénèse des CHM causées par l'influenza reste à déterminer.

#### **La fièvre**

Certaines études se sont intéressées à l'association avec la fièvre durant la grossesse et ont mises en évidence que la fièvre durant le 1<sup>er</sup> trimestre peut être associée à certaines CHM. Ainsi, les mères faisant de la fièvre durant le 1<sup>er</sup> trimestre ont deux fois plus de risque de mettre au monde un enfant ayant une CHM.[127, 154] La pathogénèse de ces associations reste à déterminer.

## La prise de médicament durant la grossesse

Les agences réglementaires comme la FDA et Santé Canada possèdent un registre des médicaments associés aux malformations congénitales, mais pas nécessairement des effets spécifiques sur la formation du cœur. Certaines molécules peuvent être associées à un risque plus élevé de CHM lorsqu'elles sont consommées par la mère durant la grossesse.

La thalidomide est un médicament qui est connu pour son effet tératogène sur le cœur. La prise de la thalidomide est donc formellement contre-indiquée durant la grossesse.[155]

### La vitamine A

Les dérivés de vitamine A, comme l'isotretinoïne qui est utilisée pour traiter l'acné, sont connus pour leurs effets tératogène sur le cœur. En effet, ils sont associés à un syndrome polymalformatif qui incluent des malformations cardiaques, comme des transpositions des gros vaisseaux.[156] L'importance de l'acide rétinoïque (RA) dans le développement du cœur fœtal chez les mammifères a été établie dans plusieurs études.[157-160] Une déficience ou un excès de RA lors du développement entraînera des malformations cardiaques congénitales. Les informations obtenues par les études s'intéressant aux embryopathies induites par l'acide rétinoïque dans des modèles animaux et aux modèles murins ayant un knockout des récepteurs de l'acide rétinoïque suggèrent des rôles multiples pour le développement cardiaques. (pour une revue, voir [161])

En premier lieu, prenons connaissance de certains mécanismes moléculaires de la voie de signalisation de RA. L'acide rétinoïque, qui est la forme active de la vitamine A, s'attache à plusieurs récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR). Ces récepteurs (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  et RAR $\gamma$ ) et leurs partenaires (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  et RXR $\gamma$ ) forment un complexe qui agit ensuite comme un facteur de transcription en se liant aux éléments de réponse de l'acide rétinoïque. Ces étapes sont essentielles pour plusieurs aspects du développement embryonnaire.[162-164] Pour le développement cardiaque, la signalisation s'effectue principalement via le récepteur RAR $\alpha$  et dans une moindre mesure par le récepteur RAR $\beta$ . [165] L'enzyme responsable de la synthèse endogène de RA est RALDH2 et elle est exprimée très tôt dans l'embryogénèse dans des structures entourant le nœud sino-auriculaire.[166-168] (voir Figure 12)

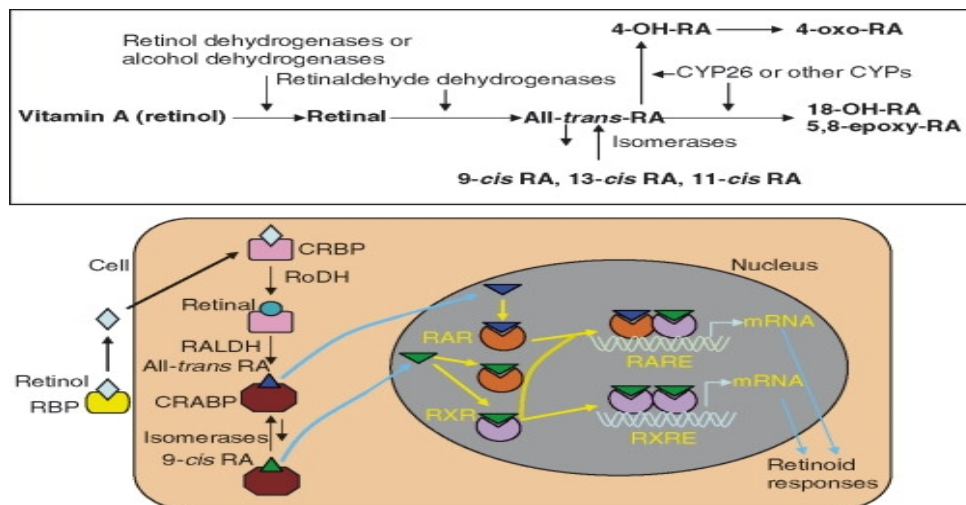


Figure 12 : Métabolisme et voie de signalisation de l'acide rétinoïque. Tiré de Retinoic Acid and the Heart. [161]

Ensuite, plusieurs études réalisées dans des modèles animaux permettent d'observer que la balance de la signalisation de RA est nécessaire pour le développement cardiaque normal. Des études sur la souris et le poulet montrent qu'une réduction de la signalisation (en altérant les récepteurs RAR ou par une déficience en RA (alimentaire ou en altérant RALDH2) entraînera des malformations cardiaques.[167, 169-176] Certaines de ces études identifient des mécanismes moléculaires recoupant l'expression de certains gènes connus pour leur rôle dans l'embryogénèse cardiaque comme, par exemple, GATA4.[175, 176] Des études démontrent aussi qu'un excès de RA est tératogène durant le développement précoce du cœur.[177-180] Pris ensemble, ces résultats démontrent bien qu'une régulation précise de RA est essentiel pour une cardiogénèse normale.

L'isotretinoïne ou les médicaments dérivés de RA sont donc contre-indiqués durant la grossesse, ainsi que chez les femmes qui planifient leur grossesse. En Amérique du Nord, plusieurs aliments sont fortifiés en vitamine A et une femme enceinte devrait éviter les multivitamines qui contiennent plus de 5000 IU de vitamine A.[181]

## **Les antibiotiques**

L'utilisation d'antibiotiques durant la grossesse a été étudiée et il est accepté que leur utilisation durant le 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> trimestre de grossesse est sécuritaire. L'utilisation de l'ampicilline[182, 183], de la pénicilline[184-186] et du métronidazole[187] a été associée à un risque similaire de CHM au sein des groupes ayant reçu des antibiotiques versus les groupes contrôles. À noter que le triméthoprim-sulfonamide, ayant un mécanisme d'action relié à la synthèse de l'acide folique, est par-contre associé à une augmentation du risque de CHM lorsque consommé durant le premier trimestre et doit être évité comme choix d'agent thérapeutique.[188, 189]

## **Les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS)**

L'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS) a aussi été largement étudiée. Les résultats des études sont mixtes, mais il est possible d'observer une tendance vers une légère augmentation du risque de CHM lorsque des AINS sont consommés durant la grossesse. L'utilisation d'ibuprofène a été associée à la transposition des gros vaisseaux, aux CIV membranaires et aux valves aortiques bicuspidées.[190] L'utilisation de naproxen, diclofenac, ketoflénac, indométacine et sulindac a aussi été associée à l'hypertension pulmonaire persistante et à la fermeture précoce du canal artériel. [191-194]

## **L'exposition à des molécules non-thérapeutiques durant la grossesse**

### **La caféine**

La caféine est une molécule qui est connue pour pouvoir passer au travers du placenta. L'Académie Américaine de Pédiatrie (AAP) et la Fondation Américaine du Cœur recommandent aux femmes enceintes de limiter leur dose de caféine quotidienne.[195] Cependant, il est à noter que plusieurs études n'ont pas réussies à démontrer une association entre la prise de caféine et les malformations cardiaques ou tout autre fonction tératogène de la caféine [196-199]



## **L'alcool**

Depuis la publication de la description du syndrome d'alcoolisation fœtal en 1973, les études ont continuées à démontrer que la consommation d'alcool durant la grossesse avait des effets tératogènes entraînant entre autres des CHM. (pour une revue, voir [200-202] )

Plusieurs études ont démontrées que la consommation de un à deux verres d'alcool quotidiennement n'est pas associée à une augmentation du risque de CHM. [128, 203] Cependant, une consommation intense de boissons alcoolisées par la mère (de l'anglais binge drinking) est associée avec un risque plus élevé de CHM chez son enfant à naître.[204-206]

Une hypothèse a été proposée postulant que l'alcool pourrait avoir un impact sur le développement cardiaque par un mécanisme qui empêche la conversion du rétinol en acide rétinoïque.[207, 208]. À ce jour, il n'y a cependant pas de relation de cause à effet qui a été démontrée et des recherches additionnelles sont requises pour supporter cette théorie.[209]

## **Le tabac**

L'utilisation du tabac durant la grossesse est aussi un sujet de controverse. Les études sur une population large comme la BWIS ne démontrent pas d'association entre la consommation de tabac durant la grossesse et les CHM. Ces résultats sont corroborés par une méta-analyse réalisé sur les études de 1971 à 1999.[210]

Une ré-analyse plus stricte des résultats disponibles dans la BWIS, publiée en 2011, démontre cependant que l'utilisation de la cigarette durant la grossesse est un risque modéré de CHM comme un ventricule unique ou une transposition des gros vaisseaux.[211] Ces résultats démontrent bien la nécessité de nouvelles études populationnelles ayant une classification et une méthodologie standardisées afin de mieux quantifier le risque associé au tabac.

## CHAPITRE 2 : L'analyse de liaison génétique

### Les marqueurs génétiques

Le génome humain est composé de plusieurs types de variations qui représentent environ 0.1 à 0.4 % des paires de base. Ces variations génétiques sont extrêmement importantes pour la cartographie d'un trait (QTL, Analyse de liaison) lié à la maladie.

Il existe plusieurs types de variations génétiques utilisés pour la cartographie. Parmi les plus fréquents, il y a:

- A) Les polymorphismes de nucléotide simple (SNP) sont des changements de seulement un nucléotide qui sont présents dans au moins un pourcent de la population. ex. Référence C/C, SNP C/T.
- B) Les microsatellites (SSR/STR) sont des séquences répétées de deux à six nucléotides. Elles sont répétées de quelques fois à plus de cent fois. À ce jour, on estime qu'il y a environ 10000 microsatellites dans le génome humain. Ces variations sont couramment utilisées comme outils de médecine légale afin de faire l'empreinte génétique d'un individu. ex. Référence (CA)<sub>n</sub>, Génotype (CA)<sub>3</sub> = CACACA

Initialement, les SSR/STR étaient l'outil de prédilection en cartographie génétique. Cependant, ils ont rapidement été remplacés par les SNP. En effet, les SNP sont majoritairement bi-alléliques, ils sont plus abondants, ils sont plus denses, ils se retrouvent facilement sur des régions codantes du génome et ils sont génétiquement plus stables. Aussi, les développements technologiques ont permis la mise au point de puces à ADN qui sont spécialement conçues pour le génotypage des SNP et qui permettent une automatisation du procédé et une augmentation du débit de production des données. Ils permettent ainsi d'identifier des régions candidates plus petites, réduisent le taux d'erreur du génotypage et permettent une plus grande liberté dans la sélection des marqueurs à utiliser.

## L'analyse de liaison

L'analyse de liaison est une technique d'analyse génétique qui est basée sur la ségrégation des gènes et des marqueurs génétiques de génération en génération. Cette ségrégation est la conséquence des recombinaisons homologues des chromosomes lors de la méiose. Il est donc possible de capitaliser sur la co-ségrégation d'un gène et de ses marqueurs. (figure 13)

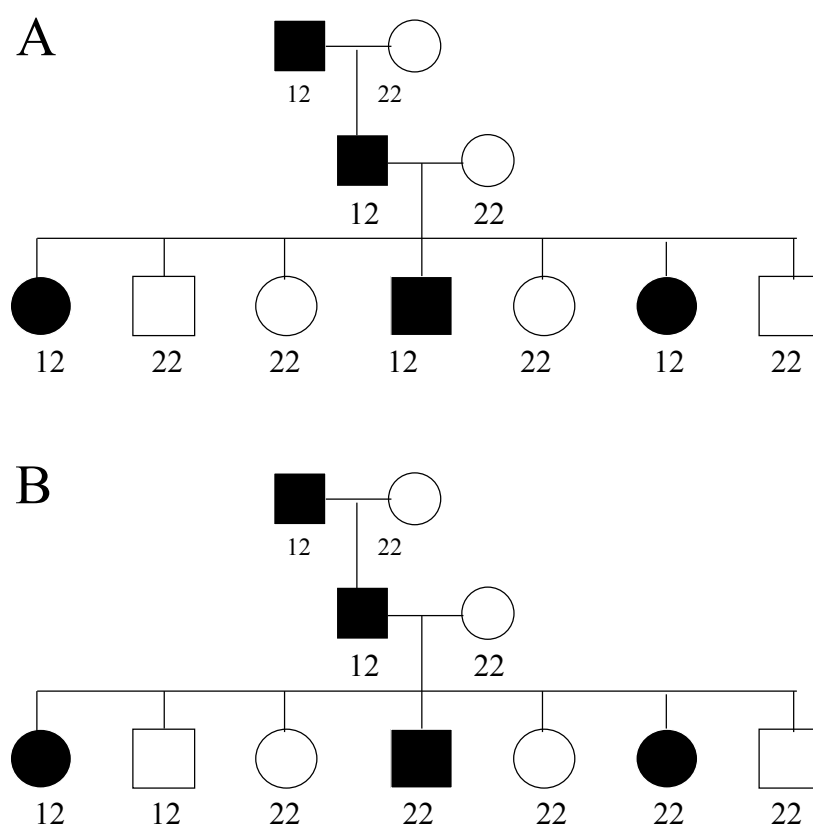


Figure 13 : Exemple de ségrégation des marqueurs utilisés dans l'analyse de liaison avec un gène de la maladie. A) Les combinaisons de marqueurs 12 sont toujours présent chez les individus affectés (noirs) et absent des individus non-affectés (blanc) B) Les combinaisons de marqueurs 12 et 22 sont présent autant chez les individus affectés que non-affectés.

Dans le cas d'un trait génétique causant un phénotype clair, comme une malformation cardiaque congénitale, il est possible d'apprécier la ségrégation du trait et des marqueurs associés en parallèle avec l'observation du génotype. C'est donc en comparant les informations génétiques des individus affectés par rapport aux individus non-affectés qu'il est possible d'identifier une ou des régions qui sont liées à la maladie.

Ces analyses peuvent être effectuées dans un contexte non-paramétrique (lorsque les informations sur le mode de transmission ne sont pas connues) ou paramétrique (lorsque les informations sur le mode de transmission sont connues). Il est aussi possible d'effectuer des analyses en deux points (chaque paire de marqueurs individuellement) ou des analyses multipoints (tous les blocs de marqueurs qui sont liés par la ségrégation sont analysés en même temps). Les analyses multipoints paramétriques sont puissantes, car elles permettent de calculer un score LOD pour chaque marqueur, de déduire une distance relative et un ordre entre les marqueurs et elle capitalise sur la recombinaison entre les marqueurs et un locus de la maladie. Pour ces raisons, elles permettent d'extraire plus d'informations que les analyses en deux points et permettent de donner un meilleur estimé de la localisation du gène causant la maladie.

Comme il a été mentionné précédemment, les analyses de liaison capitalisent sur la recombinaison génétique pour établir si un locus est significativement lié au trait causant la maladie. En effet, cette technique statistique tient compte des recombinaisons entre les individus afin d'établir l'étendu du locus lié à la maladie. L'échelle génétique utilisée pour mesurer les recombinaisons est mesurée en centimorgan (cM). Lorsque deux marqueurs sont assez proches pour être séparé une seule fois sur cent lors de la méiose, on dira que la distance génétique qui les sépare est de un centimorgan. Autrement dit, un centimorgan représente une probabilité de un pourcent que les deux allèles observés soient séparés lors d'une recombinaison.

L'analyse de liaison permet donc de calculer pour l'ensemble du génome (ou de la région étudiée) la probabilité qu'une région chromosomique soit liée au trait causant la maladie et de calculer la probabilité qu'elle ne soit pas liée au trait causant la maladie. Cette probabilité est exprimée sous la forme d'un logarithme des probabilités appelé LOD-score et elle représente le logarithme du ratio entre une évidence de liaison et une absence de liaison.

Un LOD-score de -2 est le pointage qui permet l'exclusion d'une région. Un LOD-score d'au moins 3 est nécessaire pour suggérer une liaison significative. Ce pointage correspond à la probabilité d'observer 1000 fois une liaison positive pour une liaison négative. C'est donc un seuil de signification très robuste.

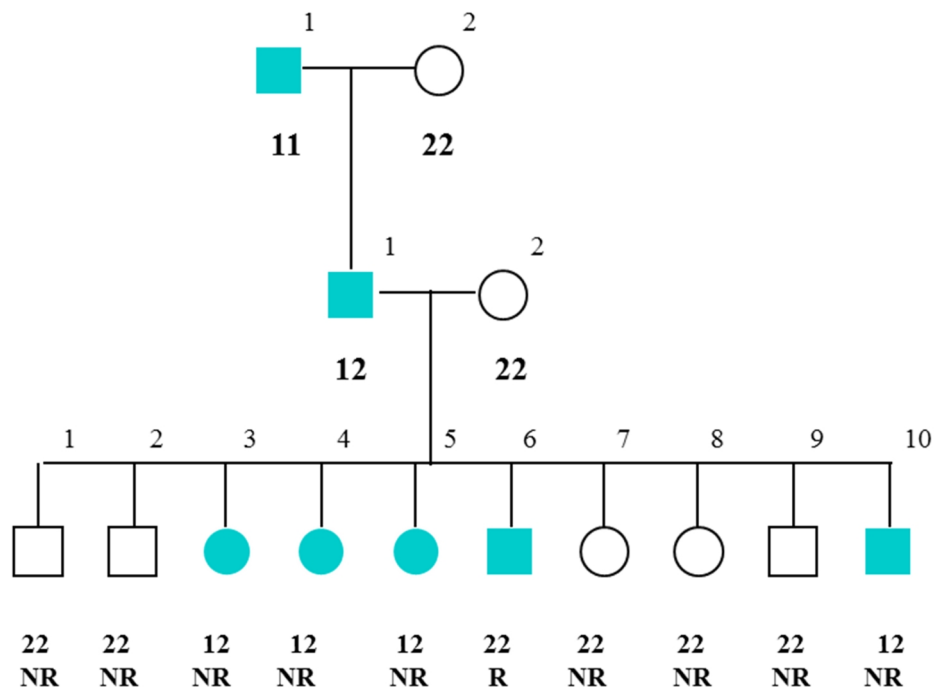
Le score LOD est calculé en fonction de plusieurs fractions de recombinaison  $\theta$ .

Pour une valeur de  $\theta$  donnée, un score LOD est calculé comme suit:

$$LOD = \log_{10} \left[ \frac{P(liaison)}{P(non-liaison)} = \frac{P(\theta=x)}{P(\theta=0.5)} = \frac{(\theta^R(1-\theta)^{NR})}{(0.5)^n} \right]$$

Donc, pour calculer un LOD score il suffit d'avoir en main le nombre d'individus dans la famille ( $n$ ), le nombre de recombinaisons au locus d'intérêt ( $R$ ) et le nombre de non-recombinant ( $NR$ ).

Par exemple, la figure 14 donne un exemple de calcul pour certaines fréquences de recombinaison.



		$\theta$						
		0.01	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40
		0.97	1.51	1.60	1.55	1.44	1.09	0.62

$$\frac{0.01}{1.51} \quad \frac{0.10}{1.60} \quad \frac{0.15}{1.55} \quad \frac{0.20}{1.44} \quad \frac{0.30}{1.09} \quad \frac{0.40}{0.62}$$

$$LOD = \log_{10} \left[ \frac{(\theta^1 (1 - \theta)^9)}{(0.5)^{10}} \right]$$

Figure 14 : Exemple de calcul de LOD score pour différente fraction de recombinaison.

Ainsi, pour chaque marqueur informatif complètement lié au locus de la maladie, chaque méiose de phase connue contribue au score LOD. Une règle du pouce permet de voir qu'au moins 10 méioses informatives sont requises pour atteindre un score de 3.0.

L'analyse de liaison permet l'identification d'une région génétique significativement liée au trait observé : elle ne permet pas l'identification directe d'un gène ou d'une mutation causale.

## **Le clonage positionnel**

Il existe plusieurs méthodes d'investigation génétique afin d'identifier le ou les gènes responsables d'une maladie/phénotype. De façon classique, elles ont été divisées en deux catégories soit le clonage positionnel et le clonage fonctionnel.

Le clonage fonctionnel est utilisé lorsque les systèmes biologiques affectés par la maladie sont bien connus. Il est ainsi possible d'identifier les gènes les plus probablement en cause et de concentrer les efforts de recherche sur ces suspects. Par exemple, dans le chapitre précédent, nous avons observé que plusieurs mutations de haute pénétrance ont été identifiées comme contribuant à l'étiologie des CHM. L'utilisation du clonage fonctionnel, dans ce cas, serait d'effectuer le séquençage de ces gènes (ie. NKX2.5, GATA4, etc.)

Alternativement, il est possible d'utiliser la technique de clonage positionnel. En premier lieu, une analyse de liaison est réalisée afin d'identifier les régions du génome qui sont liées au trait à l'étude. Lorsqu'il est possible d'identifier une ou des régions liées au trait, il est possible d'entreprendre le clonage positionnel. Cela consiste à effectuer le séquençage direct des gènes annotés sur l'intervalle. S'il y a trop de gènes sur l'intervalle, la meilleure approche consiste à dresser une liste de priorisation biologique pour déterminer quels gènes sont les plus susceptibles de jouer un rôle dans l'étiologie du trait à l'étude.

Afin de maximiser les chances de succès d'un clonage positionnel, il est impératif de: A) Avoir des échantillons d'ADN génomique de qualité, B) Avoir une plateforme de génotypage de l'ADN qui contient une quantité adéquate de marqueurs polymorphiques (préférentiellement adaptés selon les origines ethniques des individus à l'étude) et C) Avoir un nombre de cas et de contrôles adéquat (il est préférable de recruter des familles étendues pour maximiser l'information disponible) et D) Avoir un phénotype clair et une caractérisation rigoureuse des individus à l'étude.

La qualité des échantillons d'ADN et de la technique de génotypage est essentielle afin de minimiser les faux-positifs ou les faux-négatifs. L'utilisation d'une puce à ADN qui contient des marqueurs polymorphiques adaptés à l'ethnicité des individus est essentielle afin de maximiser la puissance du génotypage qui est dépendante de l'informativité des marqueurs.

Si la puce contient des marqueurs qui ne sont pas hautement variables dans une population donnée, on réduit notre pouvoir de détection. Finalement, avoir des familles étendues sous la main représente une porte d'entrée inestimable pour les analyses de liaison. Non seulement la puissance de l'analyse augmente avec le nombre d'individus apparentés à l'étude, mais il sera plus facile d'effectuer les analyses subséquentes, car les données sur la ségrégation du trait entre les individus affectés et non-affectés seront disponibles.

Un exemple classique de cette approche est la cartographie de la dystrophie musculaire de Duchenne qui a été liée au chromosome Xp21. Dans les années 1980, plusieurs groupes avaient identifié cette région comme étant significativement liée à la maladie. L'approche par clonage positionnel a permis d'identifier un candidat biologique de choix : la dystrophine, une protéine musculaire géante.

Les méthodes classiques pour identifier les changements génétiques responsables du trait étudié sont le clonage par PCR et le séquençage direct des fragments par la technique de Sanger. Il est ainsi possible d'apprécier les changements de la séquence de nucléotides, d'identifier les changements possiblement pathogéniques présents chez les individus affectés et absents des individus sains et de dresser une liste de gènes candidats.

### **L'identification de gènes candidats et les études fonctionnelles des variants possiblement pathogéniques**

À la suite de l'identification d'une variation génétique possible pathogénique, il faut être en mesure de faire le lien de cause à effet entre celle-ci et le phénotype observé. Pour une maladie monogénique causée par un allèle rare de haute pénétrance, il est possible d'établir une courte liste de critères de confirmation :

Premièrement, la variation génétique doit impérativement se transmettre de la même façon que la maladie. Elle doit être présente dans le génome de tous les affectés et absente ou dans une phase non-pathogénique (ex. une seule copie de la variation pour une maladie récessive, etc.) chez les porteurs et les non affectés.



Deuxièmement, il est possible de confirmer rapidement le lien de cause à effet, si l'on est capable d'identifier la même variation dans une cohorte de patients indépendante exprimant le même phénotype. Cependant, ces cohortes de patients sont rares.

Finalement, il faut démontrer de façon expérimentale, soit de façon *in vitro* dans un modèle cellulaire, soit dans un modèle animal, le potentiel de la mutation. Le modèle expérimental traditionnel consiste à inactiver le gène d'intérêt durant le développement embryonnaire (morpholinos, siRNA, etc.) et d'observer le phénotype clinique et moléculaire qui est engendré. Lorsque l'on observe une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe expérimental, il est impératif de renverser l'effet de cette inactivation par la complémentation artificielle de la protéine (transfection, vecteur d'expression ou clone d'ADNc) du gène durant le développement. Enfin, la dernière étape d'expériences fonctionnelles consiste généralement à produire un modèle animal stable de la maladie afin de caractériser systématiquement l'effet de la variation ou du gène candidat. Lorsque tous ces critères sont respectés, il est possible d'affirmer que le gène est responsable de la maladie et de décrire son rôle dans l'étiologie de la maladie.

## **CHAPITRE 3 : Description du projet de recherche**

### **Description de la cohorte de patients avec malformations cardiaques congénitales**

Notre cohorte provinciale de patients avec malformations cardiaques congénitales est composée de plus de 1600 participants provenant de plus de 300 familles. De ce lot, plus de 50% sont des familles étendues comportant plus d'un individu diagnostiqué avec une CHM. La majorité des familles affectées sont atteintes de malformations cardiaques affectant le cœur gauche (LVOTO). De plus, la cohorte dispose d'échantillons de candidats/familles en santé afin d'effectuer les études de contrôle.[212]

Chaque famille participante est recrutée selon un processus standardisé qui maximise la qualité de l'information disponible. Tous les candidats sont préalablement rencontrés afin d'obtenir leur consentement éclairé et leur expliquer les buts de l'étude. Ensuite, les individus sont rencontrés à la clinique de cardiologie afin de remplir un questionnaire médical, un questionnaire sur l'histoire familiale recoupant 3 générations, de subir un électrocardiogramme, une échographie cardiaque transthoracique 2-D et d'être examiné par un cardiologue. Finalement, des échantillons biologiques (sang, salive) sont prélevés et codifiés. L'ADN/ARN/Protéine sont extraits de ces échantillons et stockés selon les besoins. Une telle façon de faire permet un large éventail de possibilités dans la préparation des devis d'études et permet d'effectuer une analyse cartographique de haute qualité des malformations cardiaques congénitales répertoriées.

### **Recrutement d'une famille étendue avec CIV**

La famille qui a fait l'objet de notre étude est composée de 33 individus de descendance européenne et habitant l'Australie. De ce lot, 10 individus sont porteurs d'une CIV/aneurysme du septum interventriculaire, 1 individu est porteur d'une tétralogie de Fallot et 22 individus présentent un phénotype cardiaque similaire à la population générale. Le ratio homme : femme est de 3:2 pour les individus avec une CIV.

## **Hypothèse**

Basé sur les informations précédentes, nous avons posé comme hypothèse que le trait phénotypique observé (CHM) dans cette famille est compatible avec un mode de transmission mendélienne autosomale dominant . Ainsi, une analyse de liaison du génome entier pourrait permettre de cartographier un ou des marqueurs génétiques associés au phénotype présent dans cette famille.

Le but principal du projet est donc de cartographier les marqueurs génétiques associés aux communications interventriculaires de cette famille en utilisant les outils d'analyses de liaison disponibles. Ainsi, nous avons fixés les objectifs spécifiques suivants :

1. Effectuer le génotypage de la famille
2. Effectuer le contrôle de qualité des données de génotypage
3. Effectuer l'analyse de liaison
4. Effectuer une reconstruction des haplotypes, si nous obtenions une liaison significative
5. Effectuer une priorisation biologique des candidats positionnels en se basant sur les données de l'analyse de liaison et de reconstruction des haplotypes, si nous obtenions une liaison significative
6. Effectuer le clonage des candidats positionnels, si nous obtenions une liaison significative

Nous espérons ainsi identifier des gènes candidats qui pourraient être utilisés dans des études fonctionnelles permettant de faire le lien entre la mutation observée et le phénotype de cette famille.

## **Échantillons biologiques et génotypage**

Toutes les études ont été approuvées par les comités d'éthique des institutions participantes. Brièvement, des échantillons de sang périphériques ont été prélevés chez tous les membres de la famille. L'ADN génomique des lymphocytes a été extrait en utilisant le kit Genra Pure Gene de Quiagen. Les échantillons ont ensuite été envoyés au Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill pour effectuer un génotypage sur la plateforme Illumina Human Linkage panel 12 qui contient 7092 marqueurs SNPs sur le génome entier.

## **Contrôle de qualité et analyse de liaison**

Les génotypes obtenus ont été analysés dans un contexte familial afin de s'assurer de l'exactitude des données. Les marqueurs ayant un taux de succès de moins de 95% ont été éliminés et les erreurs mendéliennes ont été corrigées lorsque possible. Ces analyses ont été effectuées à l'aide des logiciels ALOHOMORA, GRR et PedCheck. L'analyse de liaison a été réalisée en utilisant Merlin v1.1.2 sur linux et Genehunter via le programme EasyLinkage 5.08. Un modèle de transmission autosomale dominant a été utilisé : pénétrance 0.90, phénotypie 0.01 et fréquence de l'allèle de la maladie 0.001. Les haplotypes ont aussi été reconstitués par Genehunter et analysés au besoin avec HaploPainter pour Windows.

## **Séquençage des gènes candidats**

Les séquences codantes des candidats positionnels IDI1, IDI2, WDR37, PFKP et PITTRM1 ont été clonées par PCR dans au moins un individu affecté et un individu non-affecté et séquencées par Sanger.

## **Publication des résultats dans un article de revue avec comité de pairs**

### **Apport de co-auteurs**

#### **Groupe de Dorothy Radford au Prince Charles Hospital de Brisbane, Australie**

- Jonathan Ginns
  - MD responsable du recrutement de la famille
- Edwina Duhig
  - MD Pathologiste consultant pour les études de microscopie de la Figure 2
- Dorothy Radford:
  - MD responsable du design et du financement de l'étude et co-investigateur

#### **Groupe de Gregor Andelfinger au CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada**

- Nicolas Tremblay
  - A effectué l'assurance qualité des données de génotypage pour l'analyse de liaison
  - À fait le devis des scénarios d'analyses de liaison
  - À fait les analyse de liaison
  - À fait l'analyse de données et il a participé à l'interprétation
  - À participer à la rédaction du manuscrit
  - À réaliser toutes les figures et tableaux du manuscrit, sauf la figure 2
  - À participer au séquençage des gènes candidats et à l'interprétation du séquençage
- Yang Shi Wei
  - À participer à l'interprétation des données cliniques
- Marc-Phillip Hitz
  - À participer à l'interprétation des données cliniques
  - À participer à l'analyse des résultats
- Géraldine Asselin
  - À participer à l'analyse des données de génotypage
  - À donner des conseils techniques sur l'utilisation des logiciels d'analyse de liaison
- Kathleen Riopel
  - À participer au séquençage des gènes candidats
  - Supervision du travail des étudiants
- Roxane Gendron
  - Responsable de la biobanque provinciale
- Alexandre Montpetit

- Responsable du génotypage au Centre d'Innovation Génome Québec de l'Université McGill.
- Marie-Pierre Dubé
  - Biostatisticienne responsable du design et du financement de l'étude et co-investigateur
  - Supervision de l'analyse et de la rédaction du manuscrit
- Gregor Andelfinger
  - MD responsable du design et du financement de l'étude et investigateur principal
  - Supervision de l'analyse et de la rédaction du manuscrit

**CHAPITRE 4 : Intégral de l'article de recherche originale publié  
dans l'European Heart Journal - European Heart Journal (2011)  
32, 568–5731**

**Familial ventricular aneurysms and septal defects map to chromosome 10p15**

Tremblay Nicolas<sup>1</sup>, BSc, Yang Shi Wei, MD<sup>1</sup>, Hitz Marc-Phillip, MD<sup>1</sup>, Asselin Géraldine, MSc<sup>2</sup>, Ginns Jonathan, MB BS FRACP<sup>3</sup>, Riopel Kathleen, MSc<sup>1</sup>, Gendron Roxanne, MSc<sup>1</sup>, Montpetit Alexandre<sup>3</sup>, PhD, Duhig Edwina, MB BS FRCPA<sup>4</sup>, Dubé Marie-Pierre, PhD<sup>2</sup>, Radford Dorothy, MD, FRACP<sup>4</sup>, Andelfinger Gregor, MD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cardiovascular Genetics, Department of Pediatrics, Centre Hospitalier Universitaire Sainte Justine, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Montreal Heart Institute, University of Montreal, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup> McGill Genome Québec Innovation Center, McGill University, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup> Department of Cardiology, The Prince Charles Hospital, Brisbane, Queensland, Australia

Brief title: Tremblay N et al, Ventricular aneurysms map to chromosome 10p15

## 2.1 - Introduction

Septal defects are the most prevalent congenital heart malformation, accounting for 25 to 50 % of all congenital heart defects. The most common septal defects are atrial septal defects of the secundum type (ASD II) as well as muscular ventricular septal defects (1). The association of septal defects with other congenital heart disease is well recognized, as an example, atrial septal defect can occur concomitantly with pulmonary valve stenosis. Despite the high incidence of septal defects, relatively little is known about the genetic origin of these diseases.

In most cases, these defects occur sporadically, i.e., family history is negative for other members with congenital heart disease. However, genetic contributions to these malformations are increasingly recognized (2). Familial recurrence of atrial septal defects has been reported more frequently than that of ventricular septal defects, and recurrence risks in these lesions have been estimated at up to 23 % (3). At least 4 genes have been causally identified in non-syndromic atrial septal defects, namely NKX2.5, GATA4, MYH6 and ACTC (4-7). Taken together, it can be estimated that these genes account for approximately 6 to 8 % of ASDII. Mutations in causative genes can occur de novo, or be transmitted in an autosomal dominant fashion with recurrence risks of 50 %.

Recurrence risks in ventricular septal defects (VSD) have been estimated at 0.9 to 4.3 %, which is lower than the numbers reported in ASD II (8). VSDs with a known genetic etiology have been mostly described in more complex congenital heart disease, such as tetralogy of Fallot caused by mutations in NKX2.5, JAG1 or FOG2. Likewise, recurrence risks for tetralogy of Fallot within families has been estimated at 2.5 – 3.0% , with relatively high concordance (9).

One of us previously reported a large pedigree segregating ventricular septal defects and aneurysms as an autosomal dominant trait with variable expressivity and high penetrance (10). In addition, a single individual with tetralogy of Fallot was identified in this pedigree.



We hypothesized that the disease trait in this family is a monogenic trait amenable to a whole genome scan. Here, we report significant linkage to a locus on chromosome 10p15 not previously implicated in septal defects.

## **2.2 - Materials and Methods**

### **2.2.1 - Samples and genotyping.**

Results of phenotypical characterization of this family were described previously (10). The family members underwent a cardiac exam including electrocardiogram (ECG) and echocardiography. The study was carried out in keeping with the tenets of Helsinki and approved by the respective Institutional Review Boards at The Prince Charles Hospital, Brisbane, QLD, Australia, and Sainte Justine Hospital, Montréal, QC, Canada. All participants gave informed consent to participate in the study. DNA was extracted from whole blood using the PureGene isolation kit (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA) or the Oragene saline self sampling kit (Oragene, Kanata, ON, Canada). We used the Illumina HumanLinkage 12 panel to perform a whole-genome SNP scan according to the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA).

### **2.2.2 - Linkage analysis.**

We used ALOHOMORA\_M, GRR and PedCheck for the preparation of input files (11-13). Linkage analysis was performed using Merlin v1.1.2 on Linux (14), and Genehunter using the easyLINKAGE 5.08 interface (15). We assumed an autosomal dominant model with the following parameters: penetrance 0.90, phenocopy rate 0.01 and disease allele frequency 0.001. Construction of haplotypes was performed using the output of the Genehunter software. Family members affected with ventricular septal aneurysm, ventricular septal defect or atrial septal defect were set to affected. For the individual III-1 with tetralogy of Fallot, three linkage scenarios were considered: a first one in which he was considered to be of unknown phenotype status, and one in which he was considered to be unaffected.

The first scenario is justified by the fact that the morphologic and genetic relationship between tetralogy of Fallot and the septal pathologies observed in the other family members is unknown.

The second scenario is motivated by the stark discrepancy of the observed phenotypes. Moreover, tetralogy of Fallot is relatively more common than familial septal aneurysms, therefore this individual could constitute a phenocopy. The third linkage scenario was included to test the hypothesis that a monogenic trait is responsible for all cardiac malformations encountered in this family.

### **2.2.3 - Candidate gene sequencing**

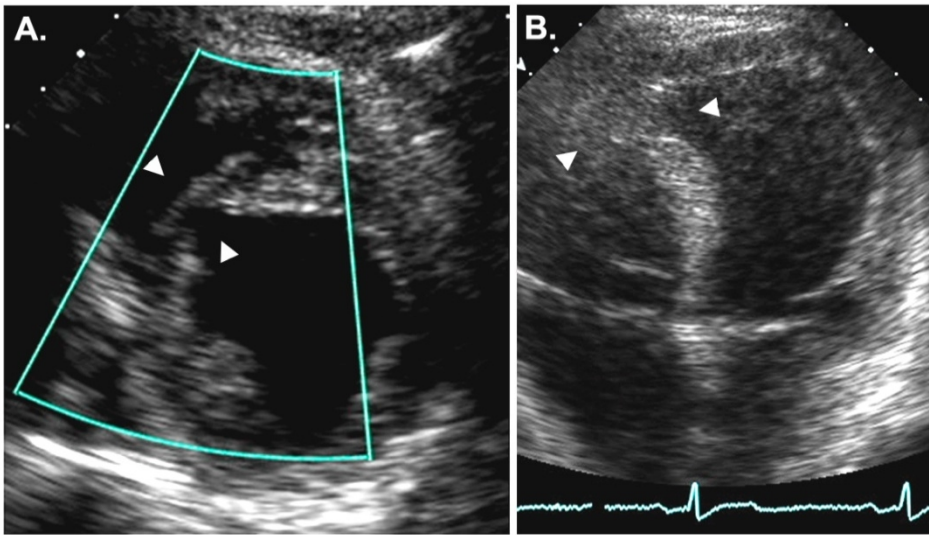
The following candidate genes from the critical interval were sequenced bidirectionally in at least one affected and one unaffected individual from the pedigree: IDI1, IDI2, WDR37, and PFKP.

## **2.3 - Results**

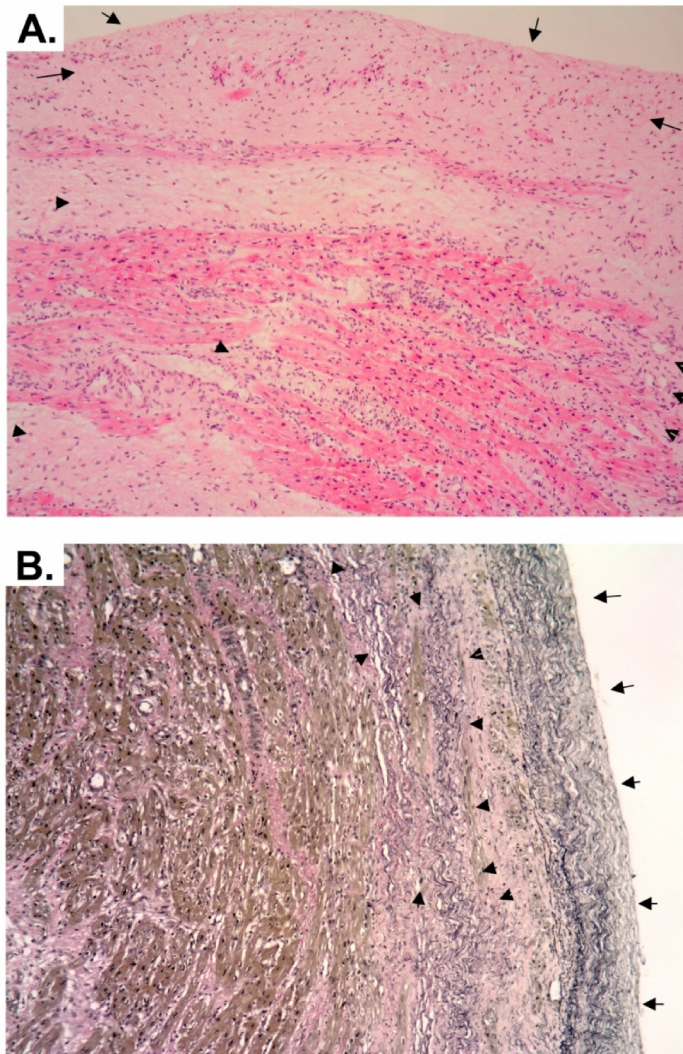
### **2.3.1 - Recruitment of additional family members.**

In addition to our previous report<sup>10</sup>, more detailed phenotypic information became available for individual II-8, previously reported to have hypertrophic obstructive cardiomyopathy. A detailed echocardiographic study now shows a marked apical septal aneurysm and dyskinesis. A similar finding was made in individual II-2, in whom marked thinning of the apical septum was found, with slight bulging towards the right ventricular cavity, but without clear aneurysm formation. These defects are similar to those reported in the other family members, with the notable exception of individual III-1, who carries a diagnosis of tetralogy of Fallot (Figure 1). A more detailed histological analysis of a sample of tissue obtained from patient IV-1 in the course of surgical resection of the septal aneurysms demonstrated a thin ventricular septum with fibroelastotic thickening of the endocardium and fibrosis within the myocardium (Figure 2A).

The fibrosis within the myocardium extended between individual myocytes. The cardiac myocytes have a variable morphology with some appearing atrophic and others showing changes of hypertrophy with nuclear enlargement. An elastin stain (Verhoff Van Gieson) confirmed the increased elastic fibres within the endocardium (Figure 2B). Electron microscopy did not reveal any structural changes of the sarcomeres (data not shown).



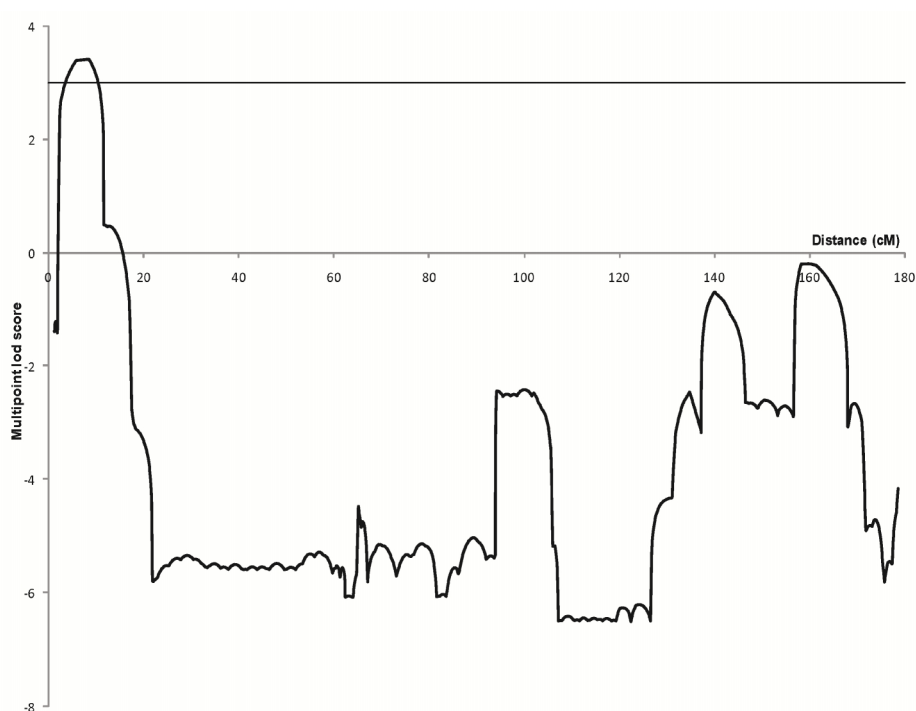
**Figure 1:** Two-dimensional echocardiography in family members recruited in addition to those included in our previous report <sup>10</sup>. Arrowheads depict septal thinning/aneurysm. A. Parasternal short-axis view in individual II-2 showing marked septal thinning at mid-septal/apical level, with slight bulging of the thinned interventricular septum into the right ventricular cavity. B. Apical four-chamber view in individual II-8 of a marked apical aneurysm.



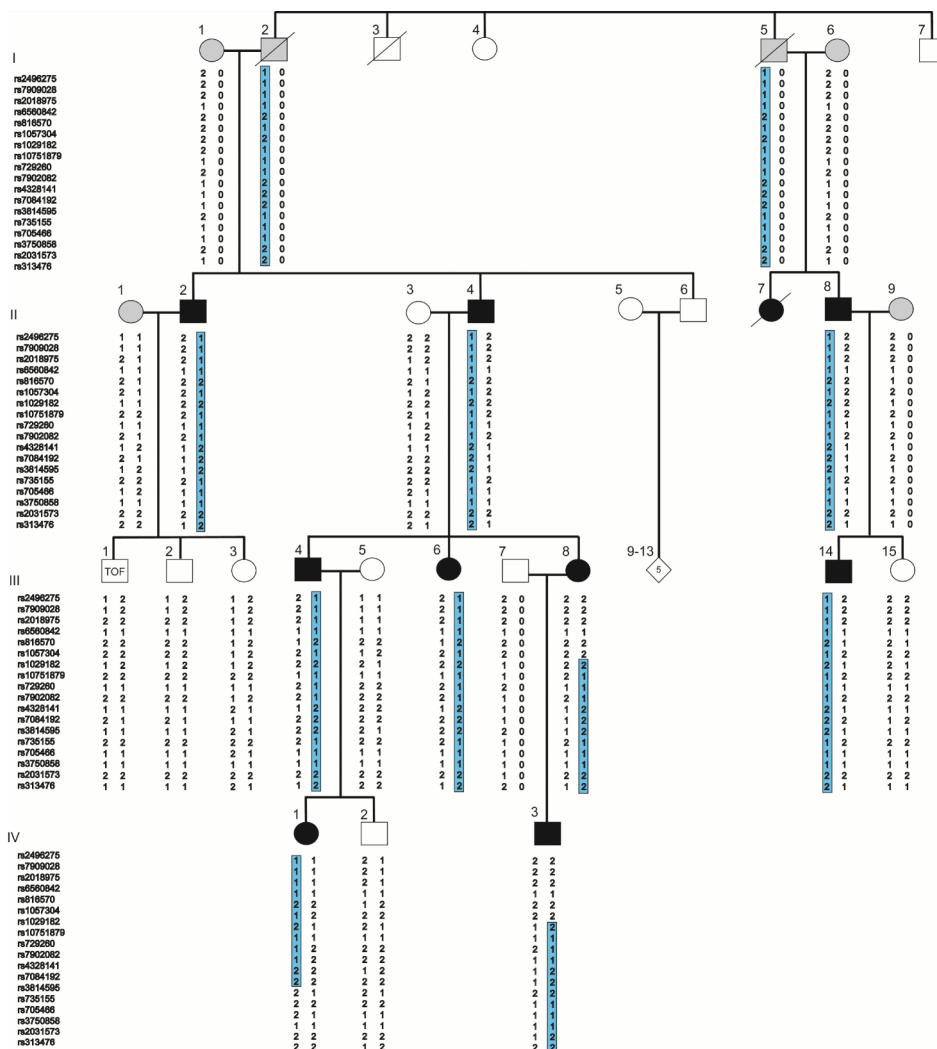
**Figure 2:** Histology of excised tissue of ventricular septal aneurysm of patient IV-1. A. Hematoxylin/eosin stain of surgical specimen at 100x magnification. Arrows depict thickened endocardium, arrowheads depict invasion of myocardium with fibroblastic material. B. Verhoeff-VanGieson staining for elastic fibers, 100x magnification (blue-black). Arrows indicate thickened endocardium, arrowheads increase of elastic fibers and fibrotic material.

### 2.3.2 - Linkage analysis and construction of haplotypes.

As described above, we considered three distinct scenarios for linkage analysis. In the first scenario, in which Individual III-1 with tetralogy of Fallot was considered unknown, parametric two-point analysis yielded a maximum LOD score of 2.32 on chromosome 12 at marker rs1995257 (117 857 059 bp). Multipoint analysis did not confirm any further evidence for linkage of this region. In parametric multipoint analysis, LOD scores above 2 were obtained only on chromosome 10 (marker rs4328141 (2 888 143 bp) to marker rs3814595 (3 201 429 bp)) with a maximum LOD score of 3.03 from marker rs7902082 (2 785 366 bp) to marker rs4328141 (2 877 893 bp) (see Supplementary material online, Table S1). Construction of the haplotype pedigree shows recombination events in Individuals III-8 and IV-1, yielding a telomeric border at marker rs1057304 (852 356 bp) and a centromeric border at marker rs3814595 (3 201 678 bp) (Figures 3 and 4).



**Figure 3.** Distribution of parametric multipoint LOD scores for ventricular aneurysms and septal defects on chromosome 10. X axis: Genetic distances in cM. Y axis: LOD score. The maximum LOD score is 3.41. A line is indicated for the significance threshold of 3.0.



**Figure 4.** Haplotype pedigree of the family described. Disease haplotypes are boxed. Filled symbols indicate affected clinical status; open symbols, unaffected clinical status; and grey symbols, unknown status. Circles indicate females; squares, males; slash, deceased. III-5, IV-1 and IV-3 are recombinant for disease allele. No DNA samples were available in individuals without haplotypes. Haplotypes were inferred for individuals I-1, I-2, I-5, I-6, II-9, and III-7

In the second scenario, in which Individual III-1 with tetralogy of Fallot was considered to be unaffected, parametric two-point analysis yielded a maximum LOD score of 2.02 on chromosome 11 at marker rs1365406 (12 562 720 bp). Multipoint analysis did not confirm any further evidence for linkage of this region. In parametric multipoint analysis, LOD scores above 2 were obtained only on chromosome 10 between marker rs1029182 (1 965 937 bp) to rs3814595 (3 201 679 bp) with a maximum LOD of 3.29 from marker rs7902082 (2 785 366 bp) to rs4328141 (2 888 143 bp) (see Supplementary material online, Table S1; Figures 3 and 4). Construction of the haplotype pedigree yielded an identical result when compared with the first linkage scenario. Common to both scenarios was the exclusion of 84.8% of the genome at LOD scores of 22 and lower.

In the third scenario, in which Individual III-1 with tetralogy of Fallot was set to affected and therefore an obligate carrier of the disease haplotype, parametric multipoint analysis yielded a maximum LOD score of 1.88 on chromosome 11 at rs1050068 (11 769 948 bp).

**Table 1.** Multipoint LOD scores at the critical region in two linkage scenarios.

Chr	Marker	Position (bp)	Position (cM)	Multipoint LOD scores	
				Scenario 1	Scenario 2
10	rs2496275	250 794	1,18	-0,81	-1,38
10	rs7909028	165 058	1,18	-0,81	-1,38
10	rs2018975	307 751	1,22	-0,81	-1,39
10	rs6560842	482 233	1,42	-0,79	-1,22
10	rs816570	670 225	1,64	-0,79	-1,23
10	rs1057304	842,828	1,83	-0,86	-1,40
10	rs1029182	1,955,937	4,441	2,92	3,20
10	rs10751879	2,517,177	5,818	3,11	3,40
10	rs729260	2,521,174	5,822	3,11	3,40
10	rs7902082	2,785,366	7,499	3,13	3,41
10	rs4328141	2,877,893	8,507	3,13	3,41
10	rs7084192	3,050,550	10,389	2,74	3,02
10	rs3814595	3,191,679	11,194	2,32	2,58
10	rs735155	3,364,178	11,649	1,18	0,49

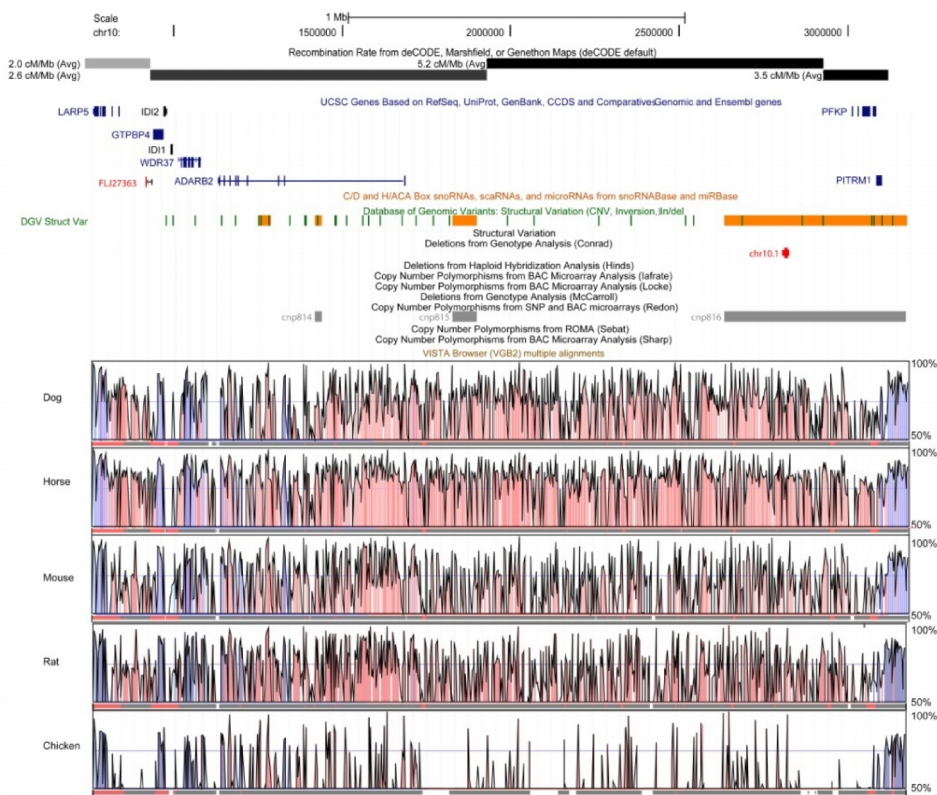
10	rs705466	3,636,050	12,367	1,15	0,46
10	rs3750858	3,791,163	12,780	1,13	0,47
10	rs2031573	3,991,897	13,306	1,09	0,47
10	rs313476	4,576,052	14,881	0,61	0,22

Abbreviations: bp, basepairs. cM, centimorgan.

In the first two scenarios, the disease haplotype segregating with ventricular septal aneurysm, VSD, and ASD is not shared by Individual III-1, who is affected with tetralogy of Fallot. A more detailed comparison shows no overlap of the phenotypes in Individual III-1 and the remainder of the family, i.e. he does not exhibit any septal thinning, and none of the other affected family members have heart disease reminiscent of tetralogy of Fallot such as seen in Individual III-1.

The critical interval spans a relatively gene-poor region of approximately 2.3 Mb on chromosome 10p15, with a total of 12 genes (4 non-coding) and 30 different transcripts in this region according to the ENSEMBL database (Figure 5, Table 2). The recombination rate in this interval varies between 2.0 cM/Mb and 5.2 cM/Mb. Cross-species comparisons reveal high conservation of long stretches of non-coding DNA among mammals. Several genomic copy number variants have been mapped in this region according to publicly available databases (Figure 4) (16).





**Figure 5:** UCSC Genome Browser view of the critical interval on chromosome 10, 842865 - 3,191,679 bp (accessed August 21<sup>st</sup>, 2009). The top track displays recombination rate from different genetic maps. The following track indicates RefSeq and Ensembl gene annotations for protein coding genes. The third track shows snoRNAs and miRNAs. The fourth track displays small copy number variants and copy number polymorphisms in individuals without apparent major disease phenotype, according to public databases. The bottom tracks shows conservation across the interval on a 5 species alignment retrieved from the VISTA Browser (VGB2)(accessed august 21<sup>st</sup>, 2009).

**Table 2.** Gene content of the critical interval.

<b>Gene Name</b>	<b>Ensembl gene ID</b>	<b>Ensembl gene transcripts</b>	<b>Gene function</b>
LARP4B/ LARP5	ENSG00000107929	ENST00000263154, ENST00000316157, ENST00000406525	La ribonucleoprotein domain family
tRNA pseudogene	ENSG00000209363	ENST00000386628	No protein product
FLJ27363	ENSG00000205740	ENST00000381466	Unknown
GTPBP4	ENSG00000107937	ENST00000360803, ENST00000360059	GTP binding protein
IDI2	ENSG00000148377	ENST00000277517	isoprenoid synthesis
IDI1	ENSG00000067064	ENST00000381344	isoprenoid synthesis
WDR37	ENSG00000047056	ENST00000358220, ENST00000381329, ENST00000263150	WDR repeat protein, unknown function
ADARB2	ENSG00000185736	ENST00000381312, ENST00000381310, ENST00000381307, ENST00000337857, ENST00000381305	RNA editing, RNA- specific adenosine deaminase
NCRNA00 168	ENSG00000205696	ENST00000381301	No protein product
AL354747. 12	ENSG00000212156	ENST00000390854	U6 spliceosomal RNA
PFKP	ENSG00000067057	ENST00000381188, ENST00000381072, ENST00000381085, ENST00000397834, ENST00000381075, ENST00000381125	Phosphofructokinase, platelet-type
PITRM1	ENSG00000107959	ENST00000380978, ENST00000380980, ENST00000380994, ENST00000224949, ENST00000380989	Metallopeptidase

## 2.4 - Discussion

In this study, we provide further evidence for the genetic heterogeneity of septal defects by mapping a novel autosomal dominant trait of ventricular septal defects/aneurysms and atrial septal defects to chromosome 10p15. The phenotypes observed in this family show few variation, with a relatively homogenous phenotype of ventricular aneurysms, ventricular septal defects and atrial septal defects. The exception of individual III-1 with a tetralogy of Fallot is notable in this context. Interestingly, the most plausible linkage scenarios strongly suggest that this case of tetralogy of Fallot is genetically distinct from the septal defect phenotype observed in all other family members.

This is further corroborated by the haplotype analysis and hints to genetic heterogeneity of septal defects and a conotruncal defect within a single extended family. Despite the mapping of the disease-linked interval to the telomeric end of chromosome 10, we are confident that the recombinants observed on both sides of the critical interval avoid a misspecification of the linkage model with a false-positive signal, in particular due to the recombination between markers rs1057304 and rs1029182 in individual III-8.

Interestingly, despite the rarity of the clinical entity of congenital septal aneurysms, several familial cases are reported in the literature (17-20). Inheritance patterns in these families are consistent with autosomal dominance, and the anatomic characteristics of interventricular septal thinning and myocardial disease are similar to that reported in this current pedigree.

In four of the five reported familial cases, atrial septal defects have been described. Tetralogy of Fallot has not been reported in those familial cases, corroborating the linkage scenarios presented in the current study.

Prior linkage and candidate gene studies have assigned a role for several key developmental molecules in human septal defects, and genes identified through linkage analysis in extended families or in animal models have been used successfully as candidates in sporadic cases of congenital heart disease (for review, see 2). Some genotype-phenotype correlations emerge from these studies, such as the association of AV block with NKX2.5 mutations, and that of pulmonary stenosis with GATA4 mutations (21). However, the

prototypical clinical phenotype in the family described here does not fit any of the known genetic causes of septal defects reported to date, nor does the critical interval harbor any obvious candidates previously implicated in heart development. Of note, no cardiac specific transcription factor or signaling molecule was found, nor is any of the biological functions associated with the positional candidates particularly suggestive for being involved in cardiovascular phenotypes.

According to database searches, several of the positional candidates are expressed in the heart; however, detailed expression studies during the development of the heart have not yet been undertaken. Also, the critical interval clearly lies in a recombination hotspot as indicated through the regional recombination rate.

The paucity of clear functional candidates in the critical interval as defined by haplotype analysis as well as its 2.3 Mb size raise the possibility that the disease-causing sequence change may not affect known coding, but rather non-coding regulatory sequence (22-25). A comparative genomic analysis shows that this interval harbors long conserved segments of non-coding sequence. In fact, recent studies suggest that long-range genetic effects in non-coding sequences can control gene expression and be involved in disease pathogenesis (25). As such, KLF6, a kruppel-like factor strongly expressed in the heart and the developing vasculature, is in the direct proximity of the critical interval and may underlie control through elements within it (26).

Previous studies have identified the 300-kb interval between D10S547 and D10S585 on chromosome 10p14 as critical for DiGeorge syndrome type 2 27, 28. Interestingly, the critical interval mapped in the family described here does not overlap with this interval. However, genotype-phenotype correlation of patients with 10p- syndromes has revealed that the most telomeric deletions involving 10p15 are associated with septal defects (mostly ASD II and VSD) or other congenital heart disease in at least 15 of 21 patients (29).

However, no ventricular aneurysms have been reported in those patient. The DECIPHER database (30) reports two patients with microdeletions partially overlapping the critical interval (patients 1232 and 2319), and one patient with a complete overlap (patient 3807). None of those patients is reported to have an overt cardiovascular phenotype. A recent study

assessing copy-number variation at a genome-wide level in tetralogy of Fallot has identified several novel loci associated with septal defects, but not the novel locus described here (31).

Taken together, we speculate that the critical interval mapped in our study harbors novel candidates which may be different from those that are causative in DiGeorge syndrome type 2, or that the mutation exerts its effects through mechanisms other than haploinsufficiency. The finding of a novel locus for septation defects extends the concept that congenital heart disease can be influenced by strong genetic determinants. The additional finding of cardiomyopathy and septal aneurysms provides a unique opportunity to tease apart disease processes which lead to these overlapping phenotypes. The genetic heterogeneity of these conditions is further highlighted by the fact that within a single extended family, a single member with the more common phenotype of tetralogy of Fallot does not contribute to the linkage signal. All molecular cascades of chamber septation do not lead to disease in the same fashion when disturbed, and divergent pathogenetic events rather than a final common pathway may have been triggered. Further molecular investigation of the rare entity in this family will provide a unique opportunity to deepen our understanding of the mechanisms governing septal formation.

## **2.5 - Funding**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada, GMHD79045 (to GA), and the André Nussia Aisenstadt Foundation. GA is a Clinician-Scientist of the Canadian Institutes of Health Research.

## **2.6 - Acknowledgements**

We gratefully acknowledge the contribution of all family members and supporting staff to this project.

## **2.7 - Conflict of interest**

None declared.

## 2.8 - References

- (1) Moons P, Sluysmans T, De WD, Massin M, Suys B, Benatar A, Gewillig M. Congenital heart disease in 111 225 births in Belgium: birth prevalence, treatment and survival in the 21st century. *Acta Paediatrica*. 2009; 98:472-477.
- (2) Andelfinger G. Genetic factors in congenital heart malformation. *Clinical Genetics*. 2008; 73:516-527.
- (3) Caputo S, Capozzi G, Russo MG, Esposito T, Martina L, Cardaropoli D, Ricci C, Argiento P, Pacileo G, Calabro R. Familial recurrence of congenital heart disease in patients with ostium secundum atrial septal defect. *European Heart Journal*. 2005; 26:2179-2184.
- (4) Ching YH, Ghosh TK, Cross SJ, Packham EA, Honeyman L, Loughna S, Robinson TE, Dearlove AM, Ribas G, Bonser AJ, Thomas NR, Scotter AJ, Caves LS, Tyrrell GP, Newbury-Ecob RA, Munnich A, Bonnet D, Brook JD. Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nature Genetics*. 2005; 37:423-428.
- (5) McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *Journal of The American College of Cardiology*. 2003; 42:1650-1655.
- (6) Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernandez X, Rodriguez I, Dumont C, Cazon L, Cuesta MG, Gonzalez-Juanatey C, Peteiro J, Alvarez N, Penas-Lado M, Castro-Beiras A. Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *European Heart Journal*. 2007; 16:1953-1961.
- (7) Tomita-Mitchell A, Maslen CL, Morris CD, Garg V, Goldmuntz E. GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease. *Journal of Medical Genetics*. 2007; 4:779-783.
- (8) Nora JJ, Nora AH. Genetic epidemiology of congenital heart diseases. *Progress in Medical Genetics*. 1983; 5:91-137.
- (9) Calcagni G, Digilio MC, Sarkozy A, Dallapiccola B, Marino B. Familial recurrence of congenital heart disease: an overview and review of the literature. *European Journal of Pediatrics*. 2007; 166:111-116.

- (10) Nicolae MI, Summers KM, Radford DJ. Familial muscular ventricular septal defects and aneurysms of the muscular interventricular septum. *Cardiology in The Young*. 2007; 17:523-527.
- (11) Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. GRR: graphical representation of relationship errors. *Bioinformatics*. 2001; 17:742-743.
- (12) O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*. 1998; 63:259-266.
- (13) Ruschendorf F, Nurnberg P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics*. 2005; 21:2123-2125.
- (14) Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nature Genetics*. 2002; 30:97-101.
- (15) Hoffmann K, Lindner TH. easyLINKAGE-Plus--automated linkage analyses using large-scale SNP data. *Bioinformatics*. 2005; 21:3565-3567.
- (16) Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature Genetics*. 2004; 36:949-951.
- (17) Donofrio MT, Allen DR, Tekin M, Bodurtha J. Autosomal dominant myocardial disease diagnosed by fetal presentation of proband with an aneurysm of the muscular interventricular septum. *Pediatric Cardiology*. 2002; 23:27-31.
- (18) Fujiwara M, Sase M, Kondou O, Furukawa S. Congenital aneurysm of the muscular interventricular septum in a fraternal case diagnosed by fetal echocardiography. *Pediatric Cardiology*. 2001; 22:353-356.
- (19) Eriksson H, Cooper SM, Rosenbaum KN, Ruckman RN. Familial occurrence of congenital aneurysm of the muscular interventricular septum. *Pediatric Cardiology*. 1998; 19:249-252.
- (20) Chen MR, Rigby ML, Redington AN. Familial aneurysms of the interventricular septum. *British Heart Journal*. 1991; 65:104-106.
- (21) Hirayama-Yamada K, Kamisago M, Akimoto K, Aotsuka H, Nakamura Y, Tomita H, Furutani M, Imamura S, Takao A, Nakazawa M, Matsuoka R. Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *American Journal of Medical Genetics A*. 2005; 135:47-52.

(22) Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, Shibata M, Suzuki M, Takahashi E, Shinka T, Nakahori Y, Ayusawa D, Nakabayashi K, Scherer SW, Heutink P, Hill RE, Noji S. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proceedings of The National Academy of Sciences*. 2002; 99:7548-7553.

(23) D'Haene B, Attanasio C, Beysen D, Dostie J, Lemire E, Bouchard P, Field M, Jones K, Lorenz B, Menten B, Buysse K, Pattyn F, Friedli M, Ucla C, Rossier C, Wyss C, Speleman F, De PA, Dekker J, Antonarakis SE, De BE. Disease-causing 7.4 kb cis-regulatory deletion disrupting conserved non-coding sequences and their interaction with the FOXL2 promoter: implications for mutation screening. *PLoS Genetics*. 2009; 5:e1000522.

(24) Kleinjan DA, van Heyningen, DV. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *American Journal of Human Genetics*. 2005; 76:8-32.

(25) Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, McBride D, Golzio C, Fisher M, Perry P, Abadie V, Ayuso C, Holder-Espinasse M, Kilpatrick N, Lees MM, Picard A, Temple IK, Thomas P, Vazquez MP, Vekemans M, Crollius HR, Hastie ND, Munnich A, Etchevers HC, Pelet A, Farlie PG, Fitzpatrick DR, Lyonnet S. Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nature Genetics*. 2009; 41:359-364.

(26) Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G, Friedman SL. Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6. *Blood*. 2006; 107:1357-1365.

(27) Lichtner P, Attié-Bitach T, Schuffenhauer S, Henwood J, Bouvagnet P, Scambler PJ, Meitinger T, Vekemans M. Expression and mutation analysis of BRUNOL3, a candidate gene for heart and thymus developmental defects associated with partial monosomy 10p. *Journal of Molecular Medicine*. 2002; 80:431-442.

(28) Schuffenhauer S, Lichtner P, Peykar-Derakhshandeh P, Murken J, Haas OA, Back E, Wolff G, Zabel B, Barisic I, Rauch A, Borochowitz Z, Dallapiccola B, Ross M, Meitinger T. Deletion mapping on chromosome 10p and definition of a critical region for the second DiGeorge syndrome locus (DGS2). *European Journal of Human Genetics*. 1998; 6:213-225.



(29) Yatsenko SA, Yatsenko AN, Szigeti K, Craigen WJ, Stankiewicz P, Cheung SW, Lupski JR. Interstitial deletion of 10p and atrial septal defect in DiGeorge 2 syndrome. *Clinical Genetics*. 2004; 66:128-136.

(30) Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van VS, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *American Journal of Human Genetics*. 2009; 84; 4:524-533.

(31) Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, Depalma SR, Israel SJ, Mesquita SM, Ergul E, Conta JH, Korn JM, McCarroll SA, Gorham JM, Gabriel S, Altshuler DM, Quintanilla-Dieck MdeL, Artunduaga MA, Eavey RD, Plenge RM, Shadick NA, Weinblatt ME, De Jager PL, Hafler DA, Breitbart RE, Seidman JG, Seidman CE. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nature Genetics*. 2009; 41:931-935.

**Supplementary Table 1:** Summary of clinical findings in enrolled individuals.

Individual / Sex	Affection status	Diagnosis	ECG	Echo	Comments
II-1 / f	Unaffected	n/a			
II-2 / m	Affected	Thinning of interventricular septum	Normal	Membranous ventricular septal defect, spontaneous closure	
II-3 / f	Unaffected	n/a	Normal	normal	
II-4 / m	Affected	VSD	n/a	VSD, spontaneous closure	
II-7 / f	Affected				Deceased
II-8 / m	Affected	Aneurysm of IVS	Sinus rhythm, T-wave sagging/inversion in infero-lateral leads	Thinning / aneurysm of apical IVS	Loud systolic murmur known in childhood Initial diagnosis hypertrophic cardiomyopathy
II-9 / f	Unavailable for study				
III-1 / m	See text	Tetralogy of Fallot	Atrial fibrillation, left axis	Tetralogy of Fallot s/p repair	Pulmonary arterial hypertension

			deviation, RBBB,	s/p pulmonary valve replacement s/p tricuspid valve repair Persistent left superior vena cava Mild biatrial enlargement Normal LV size and function Moderately dilated RV with mild dysfunction Dilated aortic root Allograft pulmonary valve replacement	s/p pulmonary embolus x2
III-2 / m	Unaffected	n/a	Normal	Normal	
III-3 / f	Unaffected	n/a	Normal	Normal	
III-4 / m	affected	Ventricular septal defect, patent ductus arteriosus	AV block I, left axial deviation, right bundle branch block; ventricular tachycardia and higher degree AV block documente d by implanted Reveal recorder	Dilated right atrium, normal right ventricle, significant paradoxical septal motion, no residual VSD	s/p pulmonary artery banding and closure of patent ductus arteriosus after birth s/p VSD repair at 21 months
III-5 / f	Unaffected	n/a	Normal	Normal	Cardiovascular exam normal
III-6 / f	Affected	Ventricular septal defects	Normal	Membranou s VSD, spontaneous closure; small apical muscular VSD	
III-7 / m	Unaffected				Unavailable for further study; reported to be

					in good cardiovascular health
III-8 / f	Affected	Multiple VSDs	Generalized non-specific T-wave flattening	No residual VSD, site of repair visible. No ASD.	s/p VSD repair in childhood
III-14 / f	Affected	Thinning of muscular IVS VSD	Normal	Thinning of mid-muscular IVS Small muscular VSD	
III-15 / f	Unaffected	n/a	Normal	normal	
IV-1 / f	Affected	Aneurysm of IVS, left axial deviation	SR, left anterior hemiblock	Apical septum dyskinetic; recovery of LV function after resection of IVS aneurysm	Resection of IVS aneurysm
IV-2 / m	Unaffected	n / a			Normal cardiovascular exam
IV-3 / m	Affected	ASD Multiple mid-muscular VSDs	Normal	Spontaneous closure of ASD and VSDs at 4 years of age	

**Supplemental Table 2.** Multipoint LOD scores at the critical region for three linkage scenarios.

Chr	Marker	Position (bp)	Position (cM)	Scenario 1	Scenario 2	Scenario 3
10	rs2496275	270145	1.18	-0.91	-1.48	-3.44
10	rs7909028	175058	1.18	-0.91	-1.48	-3.44
10	rs2018975	317751	1.22	-0.91	-1.49	-3.45
10	rs6560842	492233	1.42	-0.89	-1.32	-3.3
10	rs816570	680225	1.64	-0.89	-1.33	-3.29
10	rs1057304	852828	1.83	-0.96	-1.5	-3.09
10	rs1029182	1965937	4,441	2.81	3.07	1.48
10	rs10751879	2527177	5,818	3.02	3.27	1.66
10	rs729260	2531174	5,822	3.02	3.27	1.66

10	rs7902082	2795366	7,499	3.02	3.29	1.67
10	rs4328141	2887893	8,507	3.03	3.29	1.67
10	rs7084192	3060550	10,389	2.64	2.89	1.27
10	rs3814595	3201679	11,194	2.22	2.47	1.07
10	rs735155	3374178	11,649	0.88	0.39	-1.01
10	rs705466	3646050	12,367	0.85	0.36	-3.09
10	rs3750858	3801163	12,780	0.83	0.37	-5.17
10	rs2031573	4001897	13,306	0.79	0.37	-7.25
10	rs313476	4586052	14,881	0.31	0.12	-9.33

Abbreviations: bp, basepairs. cM, centimorgan.

**Supplemental Table 3.** Gene / transcript content and annotations of the critical interval.

Gene Name	Ensembl gene ID	Ensembl transcripts	gene	Gene function
<b>LARP4B/ LARP5</b>	ENSG00000107929	ENST00000263154, ENST00000316157, ENST00000406525	La	ribonucleoprotein domain family
<b>tRNA pseudogene</b>	ENSG00000209363	ENST00000386628		No protein product
<b>FLJ27363</b>	ENSG00000205740	ENST00000381466		Unknown
<b>GTPBP4</b>	ENSG00000107937	ENST00000360803, ENST00000360059		GTP binding protein
<b>IDI2</b>	ENSG00000148377	ENST00000277517		isoprenoid synthesis
<b>IDI1</b>	ENSG00000067064	ENST00000381344		isoprenoid synthesis
<b>WDR37</b>	ENSG00000047056	ENST00000358220, ENST00000381329, ENST00000263150		WDR repeat protein, unknown function
<b>ADARB2</b>	ENSG00000185736	ENST00000381312, ENST00000381310, ENST00000381307, ENST00000337857, ENST00000381305		RNA editing, RNA-specific adenosine deaminase
<b>NCRNA00168</b>	ENSG00000205696	ENST00000381301		No protein product
<b>AL354747.12</b>	ENSG00000212156	ENST00000390854		U6 spliceosomal RNA
<b>PFKP</b>	ENSG00000067057	ENST00000381188, ENST00000381072, ENST00000381085, ENST00000397834, ENST00000381075, ENST00000381125		Phosphofructokinase, platelet-type
<b>PITRM1</b>	ENSG00000107959	ENST00000380978,		Metallopeptidase

---

ENST00000380980,  
 ENST00000380994,  
 ENST00000224949,  
 ENST00000380989

---

**Supplemental Table 4:** Summary of SNPs in sequenced candidate genes

<b>gene</b>	<b>rs number</b>	<b>Major minor allele</b>	<b>/ observed allele(s)</b>	<b>location</b>
<b>PFKP</b>	rs4881074	A/G	A	intronic
<b>PFKP</b>	rs4269839	G	T	intronic
<b>PFKP</b>	rs4424569	C/G	G	intronic
<b>PFKP</b>	rs4469783	A/G	A	intronic
<b>PFKP</b>	rs4256893	A/G	A	intronic
<b>PFKP</b>	rs2306299	A/G	A/G	intronic
<b>PFKP</b>	rs2306301	C/T	C/T	intronic
<b>PFKP</b>	rs2306304	A/G	A/G	intronic
<b>PFKP</b>	rs9804219	A/G	A/G	intronic
<b>PFKP</b>	rs7903250	C/T	C	intronic
<b>PFKP</b>	rs7903389	C/T	C	intronic
<b>PFKP</b>	rs35686601	A/G	A	intronic
<b>PFKP</b>	rs35455312	A/T	T	intronic
<b>PFKP</b>	rs35308134	C/G	C	intronic
<b>PFKP</b>	rs7896691	C/T	T	intronic
<b>PFKP</b>	rs6602023	C/T	C	intronic
<b>PFKP</b>	rs6602024	A/G	G	intronic
<b>PFKP</b>	rs7906901	C/T	C	intronic
<b>PFKP</b>	rs3816700	C/T	T	intronic
<b>PFKP</b>	rs3816701	C/T	T	intronic
<b>PFKP</b>	rs4881085	A/G	G	intronic
<b>PFKP</b>	rs7086902	C/T	T	intronic
<b>PFKP</b>	rs2306305	A/G	A/G	intronic
<b>PFKP</b>	rs2306306	A/T	A/T	intronic
<b>PFKP</b>	rs4881098	A/G	A/G	intronic
<b>PFKP</b>	rs3829913	C/T	C/T	intronic
<b>PFKP</b>	rs3829914	C/T	C/T	intronic

<b>PFKP</b>	rs3829916	A/G	A/G	intronic
<b>PFKP</b>	rs17285851	A/C	A/C	intronic
<b>PFKP</b>	rs3829917	C/G	C/G	intronic
<b>PFKP</b>	rs4881080	A/C	C	exon 4
<b>PFKP</b>	rs11542777	C/T	C/T	exon 4
<b>PFKP</b>	rs11251719	A/C	A/C	intronic
<b>PFKP</b>	rs1052309	A/G	G	intronic
<b>PFKP</b>	rs4881087	C/G	C	intronic
<b>PFKP</b>	rs4881098	A/G	A	Intronic
<b>PFKP</b>	rs3829913	C/T	C	intronic
<b>PFKP</b>	rs17285851	A/C	C	intronic
<b>PFKP</b>	rs9423464	A/G	A	intronic
<b>PFKP</b>	rs1052333	C/T	T	exon17
<b>PFKP</b>	rs1052337	C/T	T	exon17
<b>PFKP</b>	rs56335916	A/G	A/G	intronic
<b>PFKP</b>	rs10552310	-	-	intronic
		/AAAAAC	/AAAAAC	
<b>PFKP</b>	rs7924111	C/T	C/T	intronic
<b>PFKP</b>	rs6602025	C/T	T	intronic
<b>PFKP</b>	rs6602026	A/G	A	intronic
<b>PFKP</b>	rs2306311	C/T	C/T	intronic
<b>PFKP</b>	rs2306312	A/G	A	intronic
<b>PFKP</b>	rs71199953	CA/TG	CA/TG	intronic
<b>PFKP</b>	rs2306293	C/G	C/G	intronic
<b>WDR37</b>	rs7087931	C/T	C	intronic
<b>WDR37</b>	rs10794716	C/T	C	intronic

\*\*\*No variants were found in IDI1 and IDI2

## **Chapitre 5 : Identification d'un nouveau locus significativement lié aux CIV/Anévrisme du septum interventriculaire.**

Les résultats présentés dans ce mémoire ont permis d'identifier la région 10p15 comme étant significativement liée aux CIV/anévrisme du septum interventriculaire observés dans la famille sous étude.

Pour ce faire, nous avons réalisé un génotypage du génome entier à basse densité, une analyse de liaison paramétrique multipoint suivant 3 scénarios de transmission et une reconstruction des haplotypes. En plus de permettre l'identification d'un seul locus, ces analyses nous permettent d'exclure 84,8% du génome en raison de son LOD-score inférieur à -2.

Il est ainsi possible de circonscrire une région critique de 2.3Mb qui comprend seulement 12 gènes (4 gènes annotés mais non-codants) et 30 transcrits différents. Cette région contient de grandes régions non-codantes conservées et plusieurs CNV y sont annotées dans les bases de données publiques.

Comme nous l'avons mentionné auparavant, dans la famille à l'étude, 10 individus sont porteurs d'une CIV/anévrisme du septum interventriculaire, 1 individu est porteur d'une Tétralogie de Fallot (III-1) et 22 individus présentent un phénotype cardiaque similaire à la population générale. Tous les individus affectés ont donc un type de malformation du septum cardiaque, mais l'individu III-1 sort de ce groupe. Le scénario de liaison le plus plausible suggère que la Tétralogie de Fallot observée au sein de cette famille est d'une origine génétique différente du phénotype de malformations septales observé chez tous les autres membres de la famille. Comme nous l'avons vu précédemment, un scénario de liaison significatif est seulement obtenu lorsque l'individu III-1 est identifié comme étant non-affecté ou ayant une condition inconnue. (Scénario 1 et 2) Lorsque le scénario de liaison est significatif, il supporte qu'un facteur monogénique soit lié à la maladie.

De plus, cette observation est supportée par une analyse des haplotypes : l'individu III-1 n'est pas porteur du même haplotype que les individus affectés. Lorsque nous considérons ensemble les scénarios de liaison et l'analyse des haplotypes, ces résultats pointent vers une

hétérogénéité génétique des défauts septaux et de la Tétralogie de Fallot observés dans cette famille.

En regardant la littérature pour identifier des familles similaires, il est possible de retrouver quelques rapports décrivant des cas familiaux d'anévrisme du septum interventriculaire.[213-216] Tous ces rapports décrivent un phénotype similaire à celui décrit dans notre famille et ils décrivent une maladie compatible avec un mode de transmission autosomale dominant. Aucun cas de Tétralogie de Fallot n'est décrit dans ces familles ce qui est compatible avec l'observation que l'individu avec la Tétralogie de Fallot de notre famille est une phénocopie. À notre connaissance, il s'agit de la seule description familiale qui indique une hétérogénéité génétique d'une CHM au sein d'une même famille.

## **Séquençage des candidats positionnels**

### **Séquençage de IDI1/IDI2 et rationnelle biologique dans les CHM**

Les gènes IDI1/IDI2 codent pour des enzymes localisées dans les péroxysomes des cellules qui ont pour fonction l'interconversion entre l'isopentenyl diphosphate (IPP) et son isomère hautement électrophilique le diméthylallyl diphosphate (DMAPP). Ces deux substrats sont utilisés successivement dans les réactions de synthèse du cholestérol. [217] Ces deux gènes sont associés au syndrome de Zellweger (ZS : Syndrome cérébro-hépatorenal) qui est causé par un désordre de la biogénèse des péroxysomes. Cette maladie affecte environ une pour 50000 naissances à terme et les malformations cardiaques congénitales ne sont pas des lésions prototypiques associées au ZS.[218]

Le clonage des régions codantes et des régions 5' et 3' par PCR suivi d'un séquençage des fragments par Sanger n'ont pas identifié de variation de la séquence de référence.

### **Séquençage de WDR37 et rationnelle biologique dans les CHM**

Le gène WDR37 code pour une protéine de répétition WD. Les protéines WD sont des protéines d'environ 40 acides aminés qui se trouvent dans des régions conservées du génome. Elles sont impliquées dans une multitude de processus comme la progression du cycle cellulaire, la transduction de signal, l'apoptose et la régulation de l'expression des gènes.[217]



Le clonage de la région codante par PCR suivi d'un séquençage des fragments par Sanger n'ont identifié aucune variation de la séquence de référence pouvant expliquer le phénotype observé.

### **Séquençage de PITRM1 et rationnelle biologique dans les CHM**

Le gène PITRM1 code pour une protéase ATP-indépendante qui dégrade les peptides de transit mitochondriaux. Elle peut aussi dégrader d'autres peptides non-structurés de 10 à 65 acides aminés.

Elle a été identifiée comme étant capable de dégrader la protéine amyloïde bêta-A4 qui, lorsqu'elle s'accumule dans les mitochondries, est associée à la maladie d'Alzheimer.[217]

Le rôle exact de PITRM1 reste encore à découvrir et elle n'est pas associée aux malformations cardiaques congénitales. Cependant, il a été démontré que l'expression de cette métallopeptidase est sous le contrôle de la voie de signalisation Hedgehog. Son expression est maximale dans les muscles squelettiques et cardiaques et elle est co-localisée dans les cellules musculaires progénitrices exprimant PAX-3.[219] PITRM1 pourrait ainsi être un joueur important dans le développement embryonnaire des tissus sous le contrôle de Hedgehog (HH) Une caractérisation de l'expression de PITRM1 indique aussi que son expression est plus abondante dans les muscles et les tissus cardiaques que dans d'autre tissus et qu'il joue probablement un rôle très large dans la régulation cellulaire. [220]

Le clonage de la région codante par PCR suivi d'un séquençage des fragments par Sanger n'ont identifié aucune variation de la séquence de référence.

### **Séquençage de PFKP et rationnelle biologique dans les CHM**

Le gène PFKP code pour le type plaquettaire de la phosphofructokinase. Cette enzyme catalyse la conversion irréversible du fructose-1-phosphate en fructose-1-6-phosphate ce qui en fait une enzyme-clé de la régulation de la glycolyse.[217]

Le rôle physiologique de PFKP est très bien décrit pour son rôle dans la glycolyse et il est probable qu'elle ait des fonctions dans le développement embryonnaire qui ne sont pas décrites à ce jour.

Le clonage de la région codante par PCR suivi d'un séquençage des fragments par Sanger n'ont identifié aucune variation de la séquence de référence pouvant expliquer le phénotype observé.

Le syndrome cardiaque PRKAG2 (figure 15) est un bon exemple de pathologie touchant l'entreposage du glycogène dans le cœur, entraînant une cardiomyopathie progressive, des arythmies et des problèmes de conduction cardiaque.[221, 222] PRKAG2 code pour l'unité régulatrice de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPk). L'AMPk joue un rôle central dans la régulation du métabolisme du glucose dans les cellules cardiaques, dans la régulation enzymatique de l'utilisation du glucose et de la synthèse/dégradation du glycogène.[223-226] Les mutations de PRKAG2 désassemblent la sous-unité  $\gamma$ -2 de l'AMPk qui est requise pour son activation.

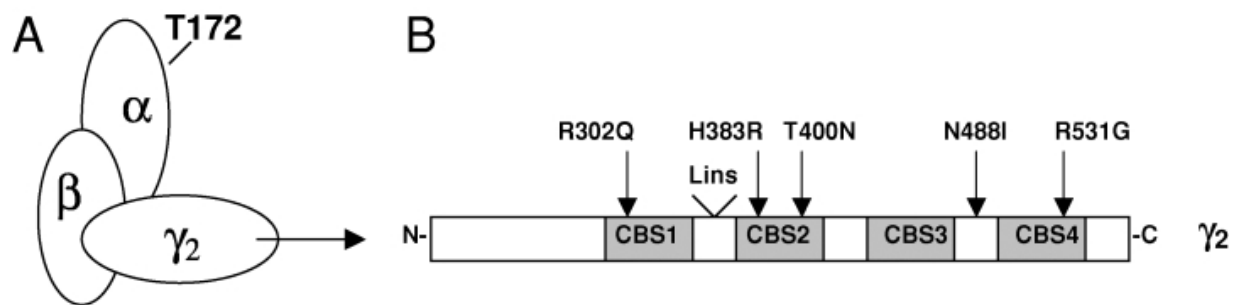


Figure 15 : Représentation schématique des quelques mutations humaines de PRKAG2, tiré de Familial Wolff-Parkinson-White Syndrome: A Disease of Glycogen Storage or Ion Channel Dysfunction, DOI: 10.1111/j.1540-8167.2006.00399.x

Les mutations de PRKAG2 entraînent une diminution de l'affinité des molécules régulatrices pour l'AMPk, ce qui conduira à une augmentation de son activité de base en raison d'une phosphorylation accrue. Cette activation soutenue favorisera la néoglycogénèse et une accumulation pathologique de glycogène dans les cellules cardiaques. Ce déséquilibre du métabolisme des sucres entraîne concrètement l'apparition de phénotypes variables qui incluent des cardiomyopathies hypertrophiques et des syndromes de pré-excitation de type Wolf-Parkinson-White.[26, 221, 227-229] De façon intéressante, il a été démontré, dans un modèle murin qui exprimait une forme mutée de PRKAG2 répressible par la tétracycline, que le phénotype était réversible en rétablissant la fonction normale du gène.[230]

En effet, l'administration de tétracycline induisait la répression des allèles mutés et l'expression de l'allèle sauvage, avec comme résultat de réduire la quantité de glycogène cardiaque et une résorption du phénotype.

## **Vers l'identification du gène causant la maladie**

### **L'importance des séquences non-codantes**

Le séquençage des séquences codantes des gènes candidats positionnels n'a permis de mettre en évidence aucune mutation pathogénique pouvant expliquer les phénotypes observés dans la famille.

Une approche intéressante serait d'entreprendre la caractérisation des régions non-codantes qui couvrent l'intervalle de liaison identifié sur le chromosome 10p15.

En effet, les efforts menés par plusieurs groupes de recherche ont permis de mettre en lumière que la régulation de l'expression des gènes des eucaryotes supérieurs est beaucoup plus complexe que ce qui était décrit et que ce processus fait intervenir plusieurs facteurs. Pour plusieurs gènes, les régions non-transcrites (5' et 3' UTR) et les introns semblent jouer un rôle-clé dans la régulation de l'expression. (figure 16)

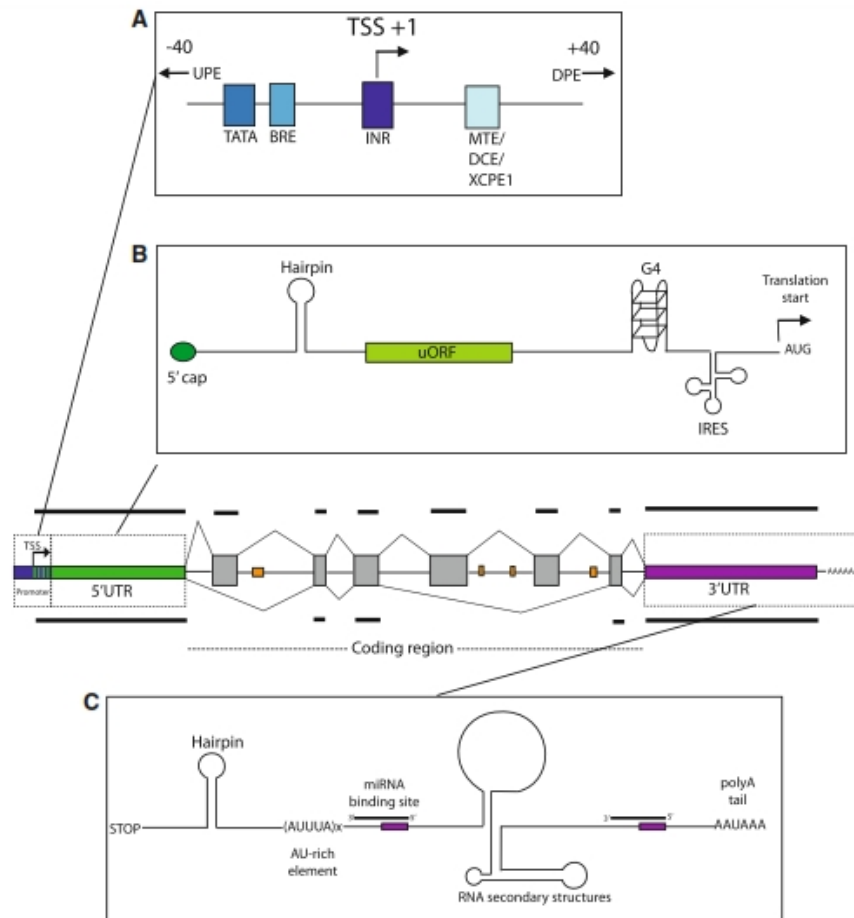


Figure 16 : Éléments de régulation de l'expression des gènes situés dans des régions non-codantes. A) Éléments de régulation de la région du promoteur B) Éléments de régulation de la région 5' UTR C) Éléments de régulation de la région 3' UTR Tiré de Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements [231]

Pendant plusieurs années, les régions non-codantes de l'ADN ont été qualifiées de régions-poubelles (de l'anglais junk DNA). Cependant, plusieurs études récentes démontrent qu'elles jouent un rôle bien réel dans le contrôle de l'expression des gènes et donnent des exemples de rôles pour plusieurs régions du génome [232-234]

Par exemple, la région 5' UTR est une région régulatrice de l'ADN qui est située à l'extrémité 5' de tous les gènes codants pour des protéines. Elle est transcrite en ARNm, mais pas en protéines. Elle contient plusieurs éléments de contrôle (voir section B de la figure précédente)

et joue un rôle majeur dans l'initiation de la transcription. Une mutation dans cette région pourrait être délétère, car elle pourrait interférer avec l'expression du gène sous son contrôle et entraîner une maladie. [235] Un exemple rapporté de maladie liée à une mutation située dans la région 5' est l'Hypotrichose héréditaire Marie Unna, une forme autosomale dominante de perte de cheveux héréditaire.[236]

Pour une revue générale portant sur le rôle des régions non-codantes, le lecteur est encouragé à consulter la référence 231 [231] ou de consulter le site web du Projet ENCODE qui vise à caractériser tous les éléments fonctionnels du génome : <http://www.genome.gov/10005107>

Un exemple qui s'applique bien à notre problématique est la découverte d'un des mécanismes pouvant causer le Syndrome Pierre Robin. ([237, 238] Le syndrome Pierre Robin est un syndrome polymalformatif qui est caractérisé par une triade oro-faciale qui inclut un rétrognathisme (menton en retrait), une fente vélo-palatine postérieure médiane et une glossoptose (la langue part en arrière dans la gorge). Initialement, le groupe de Benko et al. a identifié, dans une famille étendue, la région 17q24.3-25.1 comme étant significativement liée au syndrome Pierre Robin. Un séquençage des séquences codantes des gènes de l'intervalle (SOX9, KCNJ2, KCNJ6 et MAP2K6) n'a pas révélé de mutation pouvant expliquer la maladie. Le recrutement de familles additionnelles a permis au groupe de caractériser l'ensemble de l'intervalle et a mis en lumière une altération dans un élément non-codant très conservé. Des tests in vitro et dans des modèles murins ont ensuite permis de mettre en évidence que la mutation identifiée dans cette région non-codante déstabilise un site de liaison du facteur de transcription MSX1. Cela semble responsable d'une altération de l'expression de SOX9, ce qui serait responsable du phénotype observé.

Ainsi, il est possible de voir que les régions non-codantes peuvent jouer un rôle dans l'apparition d'une maladie et qu'il serait justifié de poursuivre le projet de séquençage des régions non-codantes dans le contexte de notre analyse de liaison positive.

## Hétérogénéité des défauts septaux

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les analyses de liaisons ont été réalisées en suivant 3 scénarios distincts. Dans les deux premiers, l'individu III-1, qui est porteur d'une Tétralogie de Fallot, était annoté comme non-affecté et inconnu, respectivement. Le troisième scénario incluait la Tétralogie de Fallot comme étant un phénotype homogène aux CIV/Anévrisme du septum interventriculaire observés dans cette famille. Les scénarios 1 et 2 permettent d'obtenir un LOD-score de 3.29 et de lier significativement le locus 10p15 au trait de la famille alors que le scénario 3 donne un LOD-score de 1.88. Ces résultats suggèrent fortement que l'individu III-1 est une phénocopie des CIV/Anévrisme du septum interventriculaire de cette famille

En raison des limitations du génotypage et de l'analyse de liaison pour l'identification des gènes responsables d'une maladie, il serait aussi utile d'utiliser d'autres techniques pour atteindre l'objectif initial d'identifier des gènes candidats. Un génotypage à plus grande densité permettrait d'obtenir les informations nécessaires pour effectuer une analyse des variations du nombre de copies (CNV) ou de raffiner l'intervalle de liaison dans cette famille.

Le séquençage familial de l'exome ou du génome entier en utilisant les technologies de séquençage à haut-débit permettrait aussi d'augmenter la probabilité d'identifier une mutation causale dans la séquence codante d'un gène ou même dans les régions intergéniques.

### L'utilisation du séquençage de nouvelle génération - l'exemple de MYH6

Un exemple d'utilisation de ces techniques est l'un des premiers rapports de séquençage de nouvelle génération dans une famille avec CHM.[239] Dans cette étude, Arrington et al. présentent une famille étendue avec une prépondérance de communications interauriculaires, mais aussi certains cas de coarctation de l'aorte, de communications interventriculaires, de sténose aortique et de valve aortique bicuspidale. L'analyse préliminaire des résultats du séquençage de l'exome a permis de prioriser 18 des 46 mutations candidates pour des analyses au sein de tous les membres de la famille. Ces analyses ont mis en lumière qu'aucune variation n'était partagée par tous les individus affectés.

Cependant, une mutation ponctuelle dans le gène MYH6 (Ala230Pro) était présente chez 10 des 11 individus affectés. Pour cet individu, le groupe a décidé d'analyser séparément les séquences codantes de gènes connus pour causer des CHM (GATA4, NKX2.5, TBX5, TBX20 et MYH6). Deux nouvelles mutations ont été identifiées dans NKX2.5 et MYH6, mais aucune n'était prédite comme étant délétère.

À la lumière de ces résultats et de l'état actuel de la connaissance, ce groupe postule que la mutation de MYH6 identifiée (Ala230Pro) joue probablement un rôle dans l'étiologie des CHM observées dans cette famille :

- Le résidu Alanine 230 de MYH6 a déjà été associé à des CHM[240]
- Le rôle de MYH6 a été démontré dans la septation auriculaire dans deux études sur le poulet [81, 241]
- Ils suggèrent une expressivité réduite de la mutation, car certains individus non-affectés identifiés dans ces deux rapports sont porteurs d'une mutation Ala230
- Il y a une variabilité dans les phénotypes des porteurs de la mutation Ala230Pro de MYH6

Est-ce que cette mutation est responsable de l'ensemble des phénotypes observés dans cette famille?

Certains membres de la famille ont des pathologies aortiques (coarctation/dissection). MYH6 n'est pas un gène exprimé dans l'aorte. Il est donc prudent de croire que des mutations additionnelles sont responsables de la variation des phénotypes observés.

En raison de l'approche utilisée (séquençage de l'exome), il se pourrait que certaines mutations situées dans les régions non-codantes puissent aussi jouer un rôle dans la variabilité du phénotype. Un séquençage du génome entier pourrait peut-être permettre d'identifier ces variations. De plus, une analyse des variations du nombre de copies n'a pas été effectuée et elles pourraient aussi jouer un rôle.

Enfin, l'individu qui n'est pas porteur de la mutation Ala230Pro de MYH6 est l'individu de la famille avec le phénotype le moins grave indiqué par la fermeture spontanée de sa communication interauriculaire à l'âge adulte. Ainsi, il pourrait s'agir d'un cas sporadique d'une origine génétique différente des autres phénotypes observés dans la famille.

Cette étude démontre bien que même au sein d'une même famille l'étiologie génétique d'une CHM peut être complexe à définir. Elle permet de voir comment l'individu III-1 de notre scénario de liaison génétique pourrait être un cas sporadique de CHM au sein d'une famille partageant une étiologie commune pour un autre phénotype.

## **Résumé et perspectives**

Nous avons présenté dans ce mémoire la cartographie génétique d'une forme familiale autosomale dominante d'anévrysmes du septum interventriculaire et de communications interventriculaires liée au chromosome 10p15.

Cette analyse de liaison a permis de mettre en relief que la tétralogie de Fallot présente dans cette famille est sans doute une phénocopie et qu'elle est donc d'une origine génétique différente des malformations septales observées dans cette famille. L'observation d'un cas sporadique de Tétralogie de Fallot dans cette famille permet d'apporter un argument supplémentaire en faveur de l'hétérogénéité des malformations cardiaques congénitales et des malformations septales.

Malgré un dépistage moléculaire systématique des régions codantes des candidats positionnel et des facteurs de transcription NKX2-5 et GATA4, aucun gène ne semble se démarquer génétiquement au sein de l'intervalle de liaison comme un candidat pouvant jouer un rôle dans la pathogénèse des CIV observées dans cette famille.

Certains gènes pourraient quand même jouer un rôle dans la maladie même si leurs fonctions biologiques dans les malformations cardiaques ne sont pas encore établies. Il se pourrait que la maladie observée dans cette famille soit liée à un changement génétique des gènes situés sur l'intervalle qui n'est pas détectable par séquençage Sanger.



La caractérisation des séquences non-codantes situées sur l'intervalle de liaison du chromosome 10p15 serait d'un grand intérêt et pourrait permettre d'identifier une mutation potentiellement causale.

Il s'agit, à notre connaissance, d'un des rares rapports significatifs de cartographie génétique d'une malformation cardiaque congénitale et le seul exemple rapporté dans la littérature d'une phénocopie d'une CHM identifiée dans une famille étendue avec des CHM par analyse de liaison.

Avec l'arrivée des nouvelles technologies de séquençage de nouvelles générations qui permettent de séquencer le génome ou l'exome entier des familles ou des cas sporadiques de CHM, il sera très intéressant de voir quels gènes seront identifiés. Continuerons-nous d'identifier des ensembles de gènes appartenant aux groupes des facteurs de transcription et des effecteurs du développement cardiaque? Aurons-nous l'information nécessaire pour caractériser la contribution des mutations des régions non-codantes de l'ADN? Pourrons-nous observer les interactions entre les différents variants de pénétrance intermédiaire ou faible? Bref, aurons-nous les outils nécessaires pour supporter ou réfuter l'hypothèse multifactorielle des CHM?

## Bibliographie

1. van der Linde, D., et al., *Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(21): p. 2241-7.
2. Brenner, J.I., et al., *Cardiac malformations in relatives of infants with hypoplastic left-heart syndrome*. Am J Dis Child, 1989. **143**(12): p. 1492-4.
3. Digilio, M.C., et al., *Recurrence risk figures for isolated tetralogy of Fallot after screening for 22q11 microdeletion*. J Med Genet, 1997. **34**(3): p. 188-90.
4. Gill, H.K., et al., *Patterns of recurrence of congenital heart disease: an analysis of 6,640 consecutive pregnancies evaluated by detailed fetal echocardiography*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(5): p. 923-9.
5. Oyen, N., et al., *Recurrence of congenital heart defects in families*. Circulation, 2009. **120**(4): p. 295-301.
6. Oyen, N., et al., *Recurrence of discordant congenital heart defects in families*. Circ Cardiovasc Genet, 2010. **3**(2): p. 122-8.
7. Whittemore, R., J.A. Wells, and X. Castellsague, *A second-generation study of 427 probands with congenital heart defects and their 837 children*. J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(6): p. 1459-67.
8. Botto, L.D., A. Correa, and J.D. Erickson, *Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects*. Pediatrics, 2001. **107**(3): p. E32.
9. Loffredo, C.A., *Epidemiology of cardiovascular malformations: prevalence and risk factors*. Am J Med Genet, 2000. **97**(4): p. 319-25.
10. Keane, J.F., J. Lock, and D. Fyler, *Keane: Nadas' Pediatric Cardiology, 2nd ed.* 2nd ed. 2006: Elsevier Inc.
11. Pollex, R.L. and R.A. Hegele, *Copy number variation in the human genome and its implications for cardiovascular disease*. Circulation, 2007. **115**(24): p. 3130-8.
12. Kirkpatrick, J.N., Y.Y. Kim, and B.D. Kaufman, *Ethics priorities in adult congenital heart disease*. Prog Cardiovasc Dis, 2012. **55**(3): p. 266-273 e3.
13. Oda, T., et al., *Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 235-42.
14. McDaniell, R., et al., *NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(1): p. 169-73.
15. Showell, C., O. Binder, and F.L. Conlon, *T-box genes in early embryogenesis*. Dev Dyn, 2004. **229**(1): p. 201-18.
16. Basson, C.T., et al., *Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 30-5.
17. Tartaglia, M., et al., *Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome*. Nat Genet, 2001. **29**(4): p. 465-8.
18. Healy, S., et al., *Histone H3 phosphorylation, immediate-early gene expression, and the nucleosomal response: a historical perspective*. Biochem Cell Biol, 2012. **90**(1): p. 39-54.
19. Romano, A.A., et al., *Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines*. Pediatrics, 2010. **126**(4): p. 746-59.
20. Schott, J.J., et al., *Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5*. Science, 1998. **281**(5373): p. 108-11.

21. Garg, V., *Molecular genetics of aortic valve disease*. Curr Opin Cardiol, 2006. **21**(3): p. 180-4.
22. Kirk, E.P., et al., *Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(2): p. 280-91.
23. Beekman, R.H. and M. Robinow, *Coarctation of the aorta inherited as an autosomal dominant trait*. Am J Cardiol, 1985. **56**(12): p. 818-9.
24. Grobman, W. and E. Pergament, *Isolated hypoplastic left heart syndrome in three siblings*. Obstet Gynecol, 1996. **88**(4 Pt 2): p. 673-5.
25. Kojima, H., et al., *Hypoplastic-left-heart syndrome in siblings*. Lancet, 1969. **2**(7622): p. 701.
26. Mehdiraz, A.A., et al., *Electrophysiologic characteristics of accessory atrioventricular connections in an inherited form of Wolff-Parkinson-White syndrome*. J Cardiovasc Electrophysiol, 1999. **10**(5): p. 629-35.
27. Menahem, S., *Familial aggregation of defects of the left-sided structures of the heart*. Int J Cardiol, 1990. **29**(2): p. 239-40.
28. Burn, J., et al., *Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study*. Lancet, 1998. **351**(9099): p. 311-6.
29. Roessler, E., et al., *Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including FOXH1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly*. Am J Hum Genet, 2008. **83**(1): p. 18-29.
30. van Driel, L.M., et al., *Eight-fold increased risk for congenital heart defects in children carrying the nicotinamide N-methyltransferase polymorphism and exposed to medicines and low nicotinamide*. Eur Heart J, 2008. **29**(11): p. 1424-31.
31. Verkleij-Hagoort, A.C., et al., *Genetic and lifestyle factors related to the periconception vitamin B12 status and congenital heart defects: a Dutch case-control study*. Mol Genet Metab, 2008. **94**(1): p. 112-9.
32. Wessels, M.W. and P.J. Willems, *Mutations in sarcomeric protein genes not only lead to cardiomyopathy but also to congenital cardiovascular malformations*. Clin Genet, 2008. **74**(1): p. 16-9.
33. Garg, V., et al., *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 270-4.
34. McBride, K.L., et al., *NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(18): p. 2886-93.
35. McKellar, S.H., et al., *Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007. **134**(2): p. 290-6.
36. 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, 2006. **345**(4): p. 1460-5.
37. Bamford, R.N., et al., *Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects*. Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 365-9.
38. Ozcelik, C., et al., *Mutations in the EGF-CFC gene cryptic are an infrequent cause of congenital heart disease*. Pediatr Cardiol, 2006. **27**(6): p. 695-8.

39. Kosaki, K., et al., *Characterization and mutation analysis of human LEFTY A and LEFTY B, homologues of murine genes implicated in left-right axis development.* Am J Hum Genet, 1999. **64**(3): p. 712-21.
40. Kosaki, R., et al., *Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB.* Am J Med Genet, 1999. **82**(1): p. 70-6.
41. Karkera, J.D., et al., *Loss-of-function mutations in growth differentiation factor-1 (GDF1) are associated with congenital heart defects in humans.* Am J Hum Genet, 2007. **81**(5): p. 987-94.
42. Mohapatra, B., et al., *Identification and functional characterization of NODAL rare variants in heterotaxy and isolated cardiovascular malformations.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(5): p. 861-71.
43. Eldadah, Z.A., et al., *Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene.* Hum Mol Genet, 2001. **10**(2): p. 163-9.
44. Krantz, I.D., et al., *Jagged1 mutations in patients ascertained with isolated congenital heart defects.* Am J Med Genet, 1999. **84**(1): p. 56-60.
45. Garg, V., et al., *GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5.* Nature, 2003. **424**(6947): p. 443-7.
46. Hirayama-Yamada, K., et al., *Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect.* Am J Med Genet A, 2005. **135**(1): p. 47-52.
47. Nemer, G., et al., *A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot.* Hum Mutat, 2006. **27**(3): p. 293-4.
48. Okubo, A., et al., *A novel GATA4 mutation completely segregated with atrial septal defect in a large Japanese family.* J Med Genet, 2004. **41**(7): p. e97.
49. Posch, M.G., et al., *Mutations in GATA4, NKX2.5, CRELD1, and BMP4 are infrequently found in patients with congenital cardiac septal defects.* Am J Med Genet A, 2008. **146A**(2): p. 251-3.
50. Sarkozy, A., et al., *Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors.* J Med Genet, 2005. **42**(2): p. e16.
51. Schluterman, M.K., et al., *Screening and biochemical analysis of GATA4 sequence variations identified in patients with congenital heart disease.* Am J Med Genet A, 2007. **143A**(8): p. 817-23.
52. Tomita-Mitchell, A., et al., *GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease.* J Med Genet, 2007. **44**(12): p. 779-83.
53. Kodo, K., et al., *GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13933-8.
54. Akcaboy, M.I., et al., *The effect of p.Arg25Cys alteration in NKX2-5 on conotruncal heart anomalies: mutation or polymorphism?* Pediatr Cardiol, 2008. **29**(1): p. 126-9.
55. Benson, D.W., et al., *Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways.* J Clin Invest, 1999. **104**(11): p. 1567-73.
56. Bjornstad, P.G. and T.P. Leren, *Familial atrial septal defect in the oval fossa with progressive prolongation of the atrioventricular conduction caused by mutations in the NKX2.5 gene.* Cardiol Young, 2009. **19**(1): p. 40-4.
57. Elliott, D.A., et al., *Cardiac homeobox gene NKX2-5 mutations and congenital heart disease: associations with atrial septal defect and hypoplastic left heart syndrome.* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(11): p. 2072-6.

58. Gioli-Pereira, L., et al., *NKX2.5 mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease*. *Int J Cardiol*, 2010. **138**(3): p. 261-5.
59. Goldmuntz, E., E. Geiger, and D.W. Benson, *NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot*. *Circulation*, 2001. **104**(21): p. 2565-8.
60. Gutierrez-Roelens, I., et al., *A novel CSX/NKX2-5 mutation causes autosomal-dominant AV block: are atrial fibrillation and syncope part of the phenotype?* *Eur J Hum Genet*, 2006. **14**(12): p. 1313-6.
61. Gutierrez-Roelens, I., et al., *Progressive AV-block and anomalous venous return among cardiac anomalies associated with two novel missense mutations in the CSX/NKX2-5 gene*. *Hum Mutat*, 2002. **20**(1): p. 75-6.
62. Hosoda, T., et al., *Familial atrial septal defect and atrioventricular conduction disturbance associated with a point mutation in the cardiac homeobox gene CSX/NKX2-5 in a Japanese patient*. *Jpn Circ J*, 1999. **63**(5): p. 425-6.
63. Ikeda, Y., et al., *Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/NKX2.5 associated with congenital heart disease*. *Circ J*, 2002. **66**(6): p. 561-3.
64. Konig, K., et al., *Familial congenital heart disease, progressive atrioventricular block and the cardiac homeobox transcription factor gene NKX2.5: identification of a novel mutation*. *Clin Res Cardiol*, 2006. **95**(9): p. 499-503.
65. McElhinney, D.B., et al., *NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **42**(9): p. 1650-5.
66. Pabst, S., et al., *A novel stop mutation truncating critical regions of the cardiac transcription factor NKX2-5 in a large family with autosomal-dominant inherited congenital heart disease*. *Clin Res Cardiol*, 2008. **97**(1): p. 39-42.
67. Rauch, R., et al., *Comprehensive genotype-phenotype analysis in 230 patients with tetralogy of Fallot*. *J Med Genet*, 2010. **47**(5): p. 321-31.
68. Watanabe, Y., et al., *Two novel frameshift mutations in NKX2.5 result in novel features including visceral inversus and sinus venosus type ASD*. *J Med Genet*, 2002. **39**(11): p. 807-11.
69. Heathcote, K., et al., *Common arterial trunk associated with a homeodomain mutation of NKX2.6*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(5): p. 585-93.
70. Sperling, S., et al., *Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital heart defects*. *Hum Mutat*, 2005. **26**(6): p. 575-82.
71. Gebbia, M., et al., *X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3*. *Nat Genet*, 1997. **17**(3): p. 305-8.
72. Ware, S.M., et al., *Identification and functional analysis of ZIC3 mutations in heterotaxy and related congenital heart defects*. *Am J Hum Genet*, 2004. **74**(1): p. 93-105.
73. Basson, C.T., et al., *Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(6): p. 2919-24.
74. Gong, W., et al., *Mutation analysis of TBX1 in non-deleted patients with features of DGS/VCFS or isolated cardiovascular defects*. *J Med Genet*, 2001. **38**(12): p. E45.
75. Rauch, A., et al., *Assessment of association between variants and haplotypes of the remaining TBX1 gene and manifestations of congenital heart defects in 22q11.2 deletion patients*. *J Med Genet*, 2004. **41**(4): p. e40.

76. Cinquetti, R., et al., *Transcriptional deregulation and a missense mutation define ANKRD1 as a candidate gene for total anomalous pulmonary venous return*. Hum Mutat, 2008. **29**(4): p. 468-74.
77. Zhu, L., et al., *Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus*. Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 343-9.
78. Matsson, H., et al., *Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(2): p. 256-65.
79. Monserrat, L., et al., *Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects*. Eur Heart J, 2007. **28**(16): p. 1953-61.
80. Olson, T.M., et al., *Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(9): p. 1687-94.
81. Ching, Y.H., et al., *Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 423-8.
82. Budde, B.S., et al., *Noncompaction of the ventricular myocardium is associated with a de novo mutation in the beta-myosin heavy chain gene*. PLoS One, 2007. **2**(12): p. e1362.
83. Lekanne Deprez, R.H., et al., *Two cases of severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy caused by compound heterozygous mutations in the MYBPC3 gene*. J Med Genet, 2006. **43**(10): p. 829-32.
84. Xin, B., et al., *Homozygosity for a novel splice site mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene causes severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy*. Am J Med Genet A, 2007. **143A**(22): p. 2662-7.
85. Zahka, K., et al., *Homozygous mutation of MYBPC3 associated with severe infantile hypertrophic cardiomyopathy at high frequency among the Amish*. Heart, 2008. **94**(10): p. 1326-30.
86. Maslen, C.L., et al., *CRELD1 mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down syndrome*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(22): p. 2501-5.
87. Robinson, S.W., et al., *Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 1047-52.
88. Zatyka, M., et al., *Analysis of CRELD1 as a candidate 3p25 atrioventricular septal defect locus (AVSD2)*. Clin Genet, 2005. **67**(6): p. 526-8.
89. De Luca, A., et al., *Exclusion of Cx43 gene mutation as a major cause of criss-cross heart anomaly in man*. Int J Cardiol, 2010. **144**(2): p. 300-2.
90. Rajagopal, S.K., et al., *Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(6): p. 677-85.
91. De Luca, A., et al., *Familial transposition of the great arteries caused by multiple mutations in laterality genes*. Heart, 2010. **96**(9): p. 673-7.
92. Pizzuti, A., et al., *Mutations of ZFPM2/FOG2 gene in sporadic cases of tetralogy of Fallot*. Hum Mutat, 2003. **22**(5): p. 372-7.
93. Muncke, N., et al., *Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries)*. Circulation, 2003. **108**(23): p. 2843-50.

94. Ransom, J.F., et al., *A rare human sequence variant reveals myocardin autoinhibition*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35845-52.
95. Goldmuntz, E., et al., *CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double-outlet right ventricle*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(3): p. 776-80.
96. Selamat Tierney, E.S., et al., *Variants of the CFC1 gene in patients with laterality defects associated with congenital cardiac disease*. Cardiol Young, 2007. **17**(3): p. 268-74.
97. Monroy-Munoz, I.E., et al., *[Changing the paradigm of congenital heart disease: from the anatomy to the molecular etiology]*. Gac Med Mex, 2013. **149**(2): p. 212-9.
98. Christensen, K.E., et al., *The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects*. Hum Mutat, 2009. **30**(2): p. 212-20.
99. van Beynum, I.M., et al., *MTRR 66A>G polymorphism in relation to congenital heart defects*. Clin Chem Lab Med, 2006. **44**(11): p. 1317-23.
100. Pei, L., et al., *Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial defects and congenital heart defects in China*. Ann Epidemiol, 2006. **16**(5): p. 352-6.
101. Shaw, G.M., et al., *Risks of human conotruncal heart defects associated with 32 single nucleotide polymorphisms of selected cardiovascular disease-related genes*. Am J Med Genet A, 2005. **138**(1): p. 21-6.
102. Lambrechts, D., et al., *Low expression VEGF haplotype increases the risk for tetralogy of Fallot: a family based association study*. J Med Genet, 2005. **42**(6): p. 519-22.
103. Stalmans, I., et al., *VEGF: a modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome?* Nat Med, 2003. **9**(2): p. 173-82.
104. Yehya, A., et al., *Differential duplication of an intronic region in the NFATC1 gene in patients with congenital heart disease*. Genome, 2006. **49**(9): p. 1092-8.
105. Ferencz, C., et al., *Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: an epidemiologic study*. J Pediatr, 1989. **114**(1): p. 79-86.
106. Cereda, A. and J.C. Carey, *The trisomy 18 syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2012. **7**: p. 81.
107. American Academy of Pediatrics. Committee on, G., *American Academy of Pediatrics: Health supervision for children with Down syndrome*. Pediatrics, 2001. **107**(2): p. 442-9.
108. Wentzel, C., et al., *Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome*. Eur J Med Genet, 2008. **51**(6): p. 501-10.
109. Barber, J.C., et al., *8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(1): p. 18-27.
110. Stewart, D.R. and T. Kleefstra, *The chromosome 9q subtelomere deletion syndrome*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2007. **145C**(4): p. 383-92.
111. Andrieux, J., et al., *Genotype phenotype correlation of 30 patients with Smith-Magenis syndrome (SMS) using comparative genome hybridisation array: cleft palate in SMS is associated with larger deletions*. J Med Genet, 2007. **44**(8): p. 537-40.
112. Robert, M.L., et al., *Alagille syndrome with deletion 20p12.2-p12.3 and hypoplastic left heart*. Clin Dysmorphol, 2007. **16**(4): p. 241-6.

113. Ghebranious, N., et al., *A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation.* Am J Med Genet A, 2007. **143A**(13): p. 1462-71.
114. Hernando, C., et al., *Comparative genomic hybridisation shows a partial de novo deletion 16p11.2 in a neonate with multiple congenital malformations.* J Med Genet, 2002. **39**(5): p. E24.
115. Brunetti-Pierri, N., et al., *Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities.* Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1466-71.
116. Christiansen, J., et al., *Chromosome 1q21.1 contiguous gene deletion is associated with congenital heart disease.* Circ Res, 2004. **94**(11): p. 1429-35.
117. Mefford, H.C., et al., *Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes.* N Engl J Med, 2008. **359**(16): p. 1685-99.
118. Soemedi, R., et al., *Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease.* Am J Hum Genet, 2012. **91**(3): p. 489-501.
119. Greenway, S.C., et al., *De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot.* Nat Genet, 2009. **41**(8): p. 931-5.
120. Erdogan, F., et al., *High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease.* J Med Genet, 2008. **45**(11): p. 704-9.
121. Calcagni, G., et al., *Familial recurrence of congenital heart disease: an overview and review of the literature.* Eur J Pediatr, 2007. **166**(2): p. 111-6.
122. Blue, G.M., et al., *Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance.* Med J Aust, 2012. **197**(3): p. 155-9.
123. Anderson, R.C., *Congenital cardiac malformations in 109 sets of twins and triplets.* Am J Cardiol, 1977. **39**(7): p. 1045-50.
124. Nora, J.J., et al., *Congenital heart disease in twins.* N Engl J Med, 1967. **277**(11): p. 568-71.
125. Caputo, S., et al., *Congenital heart disease in a population of dizygotic twins: an echocardiographic study.* Int J Cardiol, 2005. **102**(2): p. 293-6.
126. Bahtiyar, M.O., et al., *Prevalence of congenital heart defects in monozygotic/diamniotic twin gestations: a systematic literature review.* J Ultrasound Med, 2007. **26**(11): p. 1491-8.
127. Ferencz, C., et al., *The Epidemiology of Congenital Heart Disease, The Baltimore-Washington Infant Study (1981-1989).* Perspectives in Pediatric Cardiology, 1993. **4**.
128. Tikkanen, J. and O.P. Heinonen, *Risk factors for ventricular septal defect in Finland.* Public Health, 1991. **105**(2): p. 99-112.
129. Tikkanen, J. and O.P. Heinonen, *Risk factors for conal malformations of the heart.* Eur J Epidemiol, 1992. **8**(1): p. 48-57.
130. Tikkanen, J. and O.P. Heinonen, *Risk factors for coarctation of the aorta.* Teratology, 1993. **47**(6): p. 565-72.
131. Adams, M.M., J. Mulinare, and K. Dooley, *Risk factors for conotruncal cardiac defects in Atlanta.* J Am Coll Cardiol, 1989. **14**(2): p. 432-42.
132. Shaw, G.M., et al., *Maternal occupational chemical exposures and biotransformation genotypes as risk factors for selected congenital anomalies.* Am J Epidemiol, 2003. **157**(6): p. 475-84.



133. Shaw, G.M., et al., *Maternal pesticide exposure from multiple sources and selected congenital anomalies*. Epidemiology, 1999. **10**(1): p. 60-6.
134. Ritz, B., et al., *Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(1): p. 17-25.
135. Gilboa, S.M., et al., *Relation between ambient air quality and selected birth defects, seven county study, Texas, 1997-2000*. Am J Epidemiol, 2005. **162**(3): p. 238-52.
136. Goldberg, S.J., et al., *An association of human congenital cardiac malformations and drinking water contaminants*. J Am Coll Cardiol, 1990. **16**(1): p. 155-64.
137. Shaw, G.M., et al., *Maternal water consumption during pregnancy and congenital cardiac anomalies*. Epidemiology, 1990. **1**(3): p. 206-11.
138. Pradat, P., *A case-control study of major congenital heart defects in Sweden--1981-1986*. Eur J Epidemiol, 1992. **8**(6): p. 789-96.
139. Janssen, P.A., I. Rothman, and S.M. Schwartz, *Congenital malformations in newborns of women with established and gestational diabetes in Washington State, 1984-91*. Paediatr Perinat Epidemiol, 1996. **10**(1): p. 52-63.
140. Garne, E., et al., *Spectrum of congenital anomalies in pregnancies with pregestational diabetes*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012. **94**(3): p. 134-40.
141. Correa, A., et al., *Diabetes mellitus and birth defects*. Am J Obstet Gynecol, 2008. **199**(3): p. 237 e1-9.
142. Banhidy, F., et al., *Congenital abnormalities in the offspring of pregnant women with type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus: a population-based case-control study*. Congenit Anom (Kyoto), 2010. **50**(2): p. 115-21.
143. Eriksson, U.J., J. Cederberg, and P. Wentzel, *Congenital malformations in offspring of diabetic mothers--animal and human studies*. Rev Endocr Metab Disord, 2003. **4**(1): p. 79-93.
144. Ray, J.G., T.E. O'Brien, and W.S. Chan, *Preconception care and the risk of congenital anomalies in the offspring of women with diabetes mellitus: a meta-analysis*. QJM, 2001. **94**(8): p. 435-44.
145. NM, G., R.B. W, and H. M, *The occurrence of congenital defects in children following maternal rubella during pregnancy*. Med J Aust, 1945. **2**: p. 122-126.
146. Oster, M.E., T. Riehle-Colarusso, and A. Correa, *An update on cardiovascular malformations in congenital rubella syndrome*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010. **88**(1): p. 1-8.
147. Gibson, S. and K.C. Lewis, *Congenital heart disease following maternal rubella during pregnancy*. AMA Am J Dis Child, 1952. **83**(3): p. 317-9.
148. Stuckey, D., *Congenital heart defects following maternal rubella during pregnancy*. Br Heart J, 1956. **18**(4): p. 519-22.
149. Campbell, M., *Place of maternal rubella in the aetiology of congenital heart disease*. Br Med J, 1961. **1**(5227): p. 691-6.
150. Cochi, S.L., et al., *Congenital rubella syndrome in the United States, 1970-1985. On the verge of elimination*. Am J Epidemiol, 1989. **129**(2): p. 349-61.
151. Acs, N., et al., *Maternal influenza during pregnancy and risk of congenital abnormalities in offspring*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2005. **73**(12): p. 989-96.
152. Li, M., et al., *Maternal influenza-like illness, medication use during pregnancy and risk of congenital heart defects in offspring*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013.

153. Zhang, J. and W.W. Cai, *Association of the common cold in the first trimester of pregnancy with birth defects*. Pediatrics, 1993. **92**(4): p. 559-63.
154. Botto, L.D., M.C. Lynberg, and J.D. Erickson, *Congenital heart defects, maternal febrile illness, and multivitamin use: a population-based study*. Epidemiology, 2001. **12**(5): p. 485-90.
155. Smithells, R.W. and C.G. Newman, *Recognition of thalidomide defects*. J Med Genet, 1992. **29**(10): p. 716-23.
156. Dai, W.S., M.A. Hsu, and L.M. Itri, *Safety of pregnancy after discontinuation of isotretinoin*. Arch Dermatol, 1989. **125**(3): p. 362-5.
157. Clagett-Dame, M. and H.F. DeLuca, *The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 347-81.
158. Wilson, J.G., C.B. Roth, and J. Warkany, *An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation*. Am J Anat, 1953. **92**(2): p. 189-217.
159. Wilson, J.G. and J. Warkany, *Cardiac and aortic arch anomalies in the offspring of vitamin A deficient rats correlated with similar human anomalies*. Pediatrics, 1950. **5**(4): p. 708-25.
160. Zile, M.H., *Vitamin a requirement for early cardiovascular morphogenesis specification in the vertebrate embryo: insights from the avian embryo*. Exp Biol Med (Maywood), 2004. **229**(7): p. 598-606.
161. Pan, J. and K.M. Baker, *Retinoic acid and the heart*. Vitam Horm, 2007. **75**: p. 257-83.
162. Glass, C.K. and M.G. Rosenfeld, *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 121-41.
163. Ross, S.A., et al., *Retinoids in embryonal development*. Physiol Rev, 2000. **80**(3): p. 1021-54.
164. Zile, M.H., *Function of vitamin A in vertebrate embryonic development*. J Nutr, 2001. **131**(3): p. 705-8.
165. Kastner, P., et al., *Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes*. Development, 1997. **124**(23): p. 4749-58.
166. Chen, Y., et al., *Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of Xenopus embryos*. Mech Dev, 2001. **101**(1-2): p. 91-103.
167. Hochgreb, T., et al., *A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field*. Development, 2003. **130**(22): p. 5363-74.
168. Xavier-Neto, J., et al., *A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart*. Development, 1999. **126**(12): p. 2677-87.
169. Keegan, B.R., et al., *Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool*. Science, 2005. **307**(5707): p. 247-9.
170. Niederreither, K., et al., *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse*. Development, 2001. **128**(7): p. 1019-31.
171. Iulianella, A. and D. Lohnes, *Chimeric analysis of retinoic acid receptor function during cardiac looping*. Dev Biol, 2002. **247**(1): p. 62-75.
172. Sucov, H.M., et al., *RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis*. Genes Dev, 1994. **8**(9): p. 1007-18.
173. Xavier-Neto, J., et al., *Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart*. Dev Biol, 2000. **219**(1): p. 129-41.

174. Chazaud, C., P. Chambon, and P. Dolle, *Retinoic acid is required in the mouse embryo for left-right asymmetry determination and heart morphogenesis*. *Development*, 1999. **126**(12): p. 2589-96.
175. Kostetskii, I., et al., *Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation*. *Dev Biol*, 1999. **206**(2): p. 206-18.
176. Ghatpande, S., et al., *Anterior endoderm is sufficient to rescue foregut apoptosis and heart tube morphogenesis in an embryo lacking retinoic acid*. *Dev Biol*, 2000. **219**(1): p. 59-70.
177. Colbert, M.C., et al., *Cardiac compartment-specific overexpression of a modified retinoic acid receptor produces dilated cardiomyopathy and congestive heart failure in transgenic mice*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(8): p. 1958-68.
178. Dickman, E.D. and S.M. Smith, *Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid*. *Dev Dyn*, 1996. **206**(1): p. 39-48.
179. Drysdale, T.A., et al., *Retinoic acid can block differentiation of the myocardium after heart specification*. *Dev Biol*, 1997. **188**(2): p. 205-15.
180. Osmond, M.K., et al., *The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo*. *Development*, 1991. **113**(4): p. 1405-17.
181. Gillen-Goldstein, J., et al., *Nutrition in pregnancy*. 2013, Wolters Kluwer: UpToDate Health Clinical Solutions.
182. Bracken, M.B., *Drug use in pregnancy and congenital heart disease in offspring*. *N Engl J Med*, 1986. **314**(17): p. 1120.
183. Czeizel, A.E., et al., *A population-based case-control teratologic study of ampicillin treatment during pregnancy*. *Am J Obstet Gynecol*, 2001. **185**(1): p. 140-7.
184. Peters, P.W., H.M. Garbis-Berkvens, and J.G. Bannigan, *Drugs of choice in pregnancy: primary prevention of birth defects*. *Reprod Toxicol*, 1993. **7**(5): p. 399-404.
185. Czeizel, A.E., et al., *Oral phenoxymethylpenicillin treatment during pregnancy. Results of a population-based Hungarian case-control study*. *Arch Gynecol Obstet*, 2000. **263**(4): p. 178-81.
186. Dencker, B.B., et al., *Birth outcome of 1886 pregnancies after exposure to phenoxymethylpenicillin in utero*. *Clin Microbiol Infect*, 2002. **8**(4): p. 196-201.
187. Burtin, P., et al., *Safety of metronidazole in pregnancy: a meta-analysis*. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. **172**(2 Pt 1): p. 525-9.
188. Hernandez-Diaz, S., et al., *Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(22): p. 1608-14.
189. Czeizel, A.E., et al., *The teratogenic risk of trimethoprim-sulfonamides: a population based case-control study*. *Reprod Toxicol*, 2001. **15**(6): p. 637-46.
190. Wilson, P.D., et al., *Attributable fraction for cardiac malformations*. *Am J Epidemiol*, 1998. **148**(5): p. 414-23.
191. Wilkinson, A.R., A. Aynsley-Green, and M.D. Mitchell, *Persistent pulmonary hypertension and abnormal prostaglandin E levels in preterm infants after maternal treatment with naproxen*. *Arch Dis Child*, 1979. **54**(12): p. 942-5.
192. *Premature closure of the fetal ductus arteriosus after maternal use of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Adverse Drug Reactions Advisory Committee*. *Med J Aust*, 1998. **169**(5): p. 270-1.

193. Ostensen, M., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy*. Scand J Rheumatol Suppl, 1998. **107**: p. 128-32.
194. Chacon Aguilar, R., et al., [*Persistent pulmonary hypertension of the newborn following ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy*]. An Pediatr (Barc), 2008. **68**(4): p. 357-60.
195. Jenkins, K.J., et al., *Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics*. Circulation, 2007. **115**(23): p. 2995-3014.
196. Rosenberg, L., et al., *Selected birth defects in relation to caffeine-containing beverages*. JAMA, 1982. **247**(10): p. 1429-32.
197. Olsen, J., K. Overvad, and G. Frische, *Coffee consumption, birthweight, and reproductive failures*. Epidemiology, 1991. **2**(5): p. 370-4.
198. Linn, S., et al., *No association between coffee consumption and adverse outcomes of pregnancy*. N Engl J Med, 1982. **306**(3): p. 141-5.
199. Browne, M.L., et al., *Maternal caffeine consumption and risk of cardiovascular malformations*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2007. **79**(7): p. 533-43.
200. Randall, C.L., *Alcohol as a teratogen: a decade of research in review*. Alcohol Alcohol Suppl, 1987. **1**: p. 125-32.
201. Spagnolo, A., *Teratogenesis of alcohol*. Ann Ist Super Sanita, 1993. **29**(1): p. 89-96.
202. Hoyseth, K.S. and P.J. Jones, *Ethanol induced teratogenesis: characterization, mechanisms and diagnostic approaches*. Life Sci, 1989. **44**(10): p. 643-9.
203. Mills, J.L. and B.I. Graubard, *Is moderate drinking during pregnancy associated with an increased risk for malformations?* Pediatrics, 1987. **80**(3): p. 309-14.
204. Mateja, W.A., et al., *The association between maternal alcohol use and smoking in early pregnancy and congenital cardiac defects*. J Womens Health (Larchmt), 2012. **21**(1): p. 26-34.
205. Tikkanen, J. and O.P. Heinonen, *Maternal exposure to chemical and physical factors during pregnancy and cardiovascular malformations in the offspring*. Teratology, 1991. **43**(6): p. 591-600.
206. Carmichael, S.L., et al., *Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for conotruncal heart defects*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2003. **67**(10): p. 875-8.
207. DeJonge, M.H. and R.D. Zachman, *The effect of maternal ethanol ingestion on fetal rat heart vitamin A: a model for fetal alcohol syndrome*. Pediatr Res, 1995. **37**(4 Pt 1): p. 418-23.
208. Pullarkat, R.K., *Hypothesis: prenatal ethanol-induced birth defects and retinoic acid*. Alcohol Clin Exp Res, 1991. **15**(3): p. 565-7.
209. Napoli, J.L., *Effects of ethanol on physiological retinoic acid levels*. IUBMB Life, 2011. **63**(9): p. 701-6.
210. Kallen, K., *Maternal smoking and congenital heart defects*. Eur J Epidemiol, 1999. **15**(8): p. 731-7.
211. Alverson, C.J., et al., *Maternal smoking and congenital heart defects in the Baltimore-Washington Infant Study*. Pediatrics, 2011. **127**(3): p. e647-53.

212. Dube, M.P., et al., *Design and rationale of a genetic cohort study on congenital cardiac disease: experiences from a multi-institutional platform in Quebec*. *Cardiol Young*, 2011. **21**(6): p. 654-64.
213. Donofrio, M.T., et al., *Autosomal dominant myocardial disease diagnosed by fetal presentation of proband with an aneurysm of the muscular interventricular septum*. *Pediatr Cardiol*, 2002. **23**(1): p. 27-31.
214. Fujiwara, M., et al., *Congenital aneurysm of the muscular interventricular septum in a fraternal case diagnosed by fetal echocardiography*. *Pediatr Cardiol*, 2001. **22**(4): p. 353-6.
215. Eriksson, H., et al., *Familial occurrence of congenital aneurysm of the muscular interventricular septum*. *Pediatr Cardiol*, 1998. **19**(3): p. 249-52.
216. Chen, M.R., M.L. Rigby, and A.N. Redington, *Familial aneurysms of the interventricular septum*. *Br Heart J*, 1991. **65**(2): p. 104-6.
217. NIH, *The NCBI handbook [Internet]*, N.L.o.M. (US), Editor. 2002, National Center for Biotechnology Information: Bethesda (MD).
218. Waterham, H.R. and M.S. Ebberink, *Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(9): p. 1430-41.
219. Town, L., et al., *The metalloendopeptidase gene *Pitrm1* is regulated by hedgehog signaling in the developing mouse limb and is expressed in muscle progenitors*. *Dev Dyn*, 2009. **238**(12): p. 3175-84.
220. Mzhavia, N., et al., *Cloning, expression, and characterization of human metalloprotease 1: a novel member of the pitrilysin family of metalloendopeptidases*. *DNA Cell Biol*, 1999. **18**(5): p. 369-80.
221. Gollob, M.H., et al., *Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(24): p. 1823-31.
222. Gollob, M.H., et al., *Novel PRKAG2 mutation responsible for the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction system disease with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy*. *Circulation*, 2001. **104**(25): p. 3030-3.
223. Arad, M., C.E. Seidman, and J.G. Seidman, *AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease*. *Circ Res*, 2007. **100**(4): p. 474-88.
224. Carling, D., *The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control*. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(1): p. 18-24.
225. Hardie, D.G. and K. Sakamoto, *AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle*. *Physiology (Bethesda)*, 2006. **21**: p. 48-60.
226. Kemp, B.E., et al., *AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 1): p. 162-8.
227. Arad, M., et al., *Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(3): p. 357-62.
228. Blair, E., et al., *Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis*. *Hum Mol Genet*, 2001. **10**(11): p. 1215-20.
229. Anderson, K.P., H.J. Vidaillet, Jr., and M.E. Josephson, *A gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(14): p. 1063-4.
230. Wolf, C.M., et al., *Reversibility of PRKAG2 glycogen-storage cardiomyopathy and electrophysiological manifestations*. *Circulation*, 2008. **117**(2): p. 144-54.

231. Barrett, L.W., S. Fletcher, and S.D. Wilton, *Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(21): p. 3613-34.
232. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
233. Cheng, J., et al., *Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution*. Science, 2005. **308**(5725): p. 1149-54.
234. Consortium, E.P., et al., *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 799-816.
235. Chatterjee, S. and J.K. Pal, *Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases*. Biol Cell, 2009. **101**(5): p. 251-62.
236. Wen, Y., et al., *Loss-of-function mutations of an inhibitory upstream ORF in the human hairless transcript cause Marie Unna hereditary hypotrichosis*. Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 228-33.
237. Benko, S., et al., *Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence*. Nat Genet, 2009. **41**(3): p. 359-64.
238. Benko, S., et al., *[Cis-ruptions of highly conserved non-coding genomic elements distant from the SOX9 gene in the Pierre Robin sequence]*. Biol Aujourdhui, 2011. **205**(2): p. 111-24.
239. Arrington, C.B., et al., *Exome analysis of a family with pleiotropic congenital heart disease*. Circ Cardiovasc Genet, 2012. **5**(2): p. 175-82.
240. Granados-Riveron, J.T., et al., *Alpha-cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(20): p. 4007-16.
241. Rutland, C., et al., *Knockdown of alpha myosin heavy chain disrupts the cytoskeleton and leads to multiple defects during chick cardiogenesis*. J Anat, 2009. **214**(6): p. 905-15.

