

Université de Montréal

Bases génétiques de la sténose valvulaire aortique calcifiée
(SVAC)

par

Christian EYENDJA

Département des sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès science
en Sciences biomédicales option recherche clinique

Décembre 2010

© Christian EYENDJA, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Bases génétiques de la sténose valvulaire aortique calcifiée (SVAC)

Présenté par :
Christian EYENDJA

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Arsène Basmadjian, président-rapporteur
Jean-Claude Tardif, directeur de recherche
John David Rioux, co-directeur
Gregor Andelfinger, membre du jury

Résumé

La sténose valvulaire aortique (SVA) est une valvulopathie résultant en l'ouverture incomplète de la valve aortique. La calcification des feuillets associée au vieillissement est la cause la plus importante de la SVA. Sa pathogénèse implique des dépôts de lipoprotéines, de l'inflammation et de la calcification des feuillets. Notre étude vise à identifier les gènes associés à une prédisposition à la SVA afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette maladie et potentiellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour ce faire, nous avons recruté 190 patients avec SVA dégénérative et 192 témoins, appariés pour l'âge et le sexe, puis effectué une étude d'association par gènes candidats en utilisant des marqueurs génétiques polymorphiques (SNP). Les gènes candidats choisis incluent (1) ceux dont les polymorphismes ont été présumés associés à la SVA dans des études antérieures (*APOB*, *APOE*, *ESR1*, *PTH* et *VDR*) (2) des gènes dont les polymorphismes ont été significativement associés et validés pour quelques maladies inflammatoires (*IL-10*, *TNFAIP3*) ou pour le métabolisme lipidique (*PCSK9*, *LDLR*) dans des études d'association pangénomiques, et (3) des gènes impliqués dans la pathogénie de la SVA à partir d'études faites sur des modèles animaux en lien avec la calcification (*BMP2*, *CCR5*, *CTGF*, *LRP5*, *MSX2*, *WNT3*), le remodelage tissulaire (*CTSS*, *MMP9*) ou le métabolisme lipidique (*SMPD1*). Pour les gènes des groupes (1) et (2), nous avons utilisé les SNPs rapportés dans la littérature comme étant significativement associés. Pour le groupe (3), nous avons effectué une approche par «tagSNP» qui consiste à sélectionner un groupe de SNP capturant la variabilité génétique dans la région ciblée. Au total, 81 SNPs dans 18 gènes ont été testés. Nous avons trouvé une association nominale avec les gènes *BMP2* (OR = 1.55, IC95%: 1.14-2.10, p = 0.004) et *LRP5* (OR = 1.47, IC95%: 1.06-2.03, p = 0.023) après ajustement pour la maladie coronarienne.

Les gènes *BMP2* et *LRP5*, impliqués dans la calcification selon certains modèles expérimentaux, sont donc associés à la SVA. Ce travail devrait être validé dans une cohorte indépendante plus large dans un avenir rapproché et il pourrait être étendu à d'autres gènes.

Mots-clés : sténose valvulaire aortique, gènes candidats, SNP

Abstract

Aortic valve stenosis (AVS) is a valvular heart disease caused by calcification leading to incomplete opening of the aortic valve. Calcification of valve leaflets associated with aging is the most common cause of AVS. AVS pathogenesis involves lipoprotein deposits, chronic inflammation and calcification of the aortic valve leaflets. Our study aims to identify genes associated with AVS in order to better understand its mechanisms and potentially identify new therapeutic targets.

We recruited 190 cases with AVS of different severity and 192 controls matched for age and sex. Then we conducted a candidate gene association study using single nucleotide polymorphisms (SNPs). The candidate genes selected include: (1) those with polymorphisms putatively implicated in previous genetic association studies of AVS (*APOB*, *APOE*, *ESR1*, *PTH* and *VDR*); (2) those with validated associations to inflammatory diseases (*IL-10*, *TNFAIP3*) or lipid metabolism (*LDLR*, *PCSK9*) in genome-wide association studies and, (3) genes implicated in AVS pathogenesis from studies with animal models and thought to be involved in calcification (*BMP2*, *CCR5*, *CTGF*, *LRP5*, *MXS2*, *WNT3*); tissue remodeling (*CTSS*, *MMP9*) or lipid metabolism (*SMPDI*). For the first two categories of genes, we tested the SNPs reported to be associated in the literature and, in the third category we used a tag-SNP approach which consists of selecting a subset of SNPs to capture variability in the target region. Finally, 81 SNPs in 18 genes were tested. We found a nominal association of *BMP2* (OR=1.55, CI: 1.14 – 2.10, p=0.004) and *LRP5* (OR=1.47, CI: 1.06 – 2.03, p=0.023) with presence of AVS after adjustment for coronary heart disease.

The genes *BMP2* and *LRP5*, which are known to be involved in calcification based on animal models, are associated with AVS. The result of the current study should be validated in a larger independent cohort in the near future and then, it could also be extended to the study of other genes.

Keywords: aortic valve stenosis, candidate gene, SNP

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Remerciements	ix
Chapitre I : INTRODUCTION	1
1. GÉNÉRALITÉS	2
1.1. DÉFINITION	2
1.2. ÉPIDÉMIOLOGIE	3
1.3. ÉTIOLOGIE	4
1.3.1. La malformation congénitale de la valve	4
1.3.2. La SVAC d'origine rhumatismale	4
1.3.3. La SVAC d'origine dégénérative.....	4
1.4. PHYSIOPATHOGENÈSE	4
1.4.1. La composante lipidique	6
1.4.2. La composante inflammatoire.....	6
1.4.3. La composante phosphocalcique	8
1.5. DIAGNOSTIC DE LA SVAC	9
1.5.1. Symptomatologie clinique	9
1.5.1.1. <i>Signes fonctionnels</i>	9
1.5.1.2. <i>Les signes physiques</i>	10
1.5.2. Signes échocardiographiques.....	10
1.5.2.1. <i>Aire valvulaire aortique</i>	11
1.5.2.2. <i>Le jet de vélocité</i>	12
1.5.2.3. <i>Le gradient moyen de pression</i>	12
1.5.2.4. <i>Autres signes mesurés par l'écho-Doppler</i>	13
1.6. QUELQUES CONCEPTS ET ÉTUDES EN GÉNÉTIQUE	13
1.6.1. Les concepts en génétique	13
1.6.2. Les études en génétique	15
1.6.2.1. <i>Les études de liaison</i>	15

1.6.2.2. <i>Les études d'association</i>	15
1.6.2.2.1. Les études d'association par gènes candidat	16
1.6.2.2.2. Les études pangénomiques	16
1.7. GÉNÉTIQUE DE LA SVAC	17
1.7.1. Sélection et étude sommaire des gènes candidats	18
1.7.1.1. <i>Sélection des gènes candidats</i>	18
1.7.1.2. <i>Informations sommaires des gènes candidats sélectionnés</i>	19
1.7.1.2.1. Gènes présumés associés à la SVAC dans les études antérieures (groupe1).....	19
1.7.1.2.2. Gènes impliqués dans les maladies inflammatoires et le métabolisme des lipides (groupe2).....	22
1.7.1.2.3. Gènes candidats impliqués dans les études fonctionnelles en rapport avec la pathogénie de la SVAC (groupe 3).....	24
Chapitre II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
2.1. LA COLLECTE DES DONNÉES	31
2.1.1. RECRUTEMENT DES PATIENTS.....	31
2.1.2. DONNÉES CLINIQUES ET ÉCHOCARDIOGRAPHIQUES	32
2.1.3. LES ÉCHANTILLONS SANGUINS.....	33
2.2. LE GÉNOTYPAGE	33
2.2.1. Sélection des SNP	35
2.2.2. Conception des «pools»	37
2.2.3. Technique de génotypage	39
2.2.3.1. <i>Ajustement des amorces</i>	39
2.2.3.2. <i>Amplification par PCR</i>	40
2.2.3.3. <i>Le traitement des amplicons par Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)</i>	41
2.2.3.4. <i>La réaction d'élongation des amorces</i>	42
2.2.3.5. <i>Spectrophotomètre de masse (MALDI-TOF MS)</i>	43
2.3. ANALYSES STATISTIQUES	43
2.3.1. Les variables cliniques et biométriques	43

2.3.2. Le contrôle de qualité	44
2.3.3. Les tests d'association	45
Chapitre III : RÉSULTATS	47
3.1. ANALYSE DES DONNÉES DU RECRUTEMENT	48
3.1.1. Caractéristiques cliniques des patients	48
3.1.2. Étude des variables échocardiographiques	49
3.1.3. Étude des variables biométriques.....	50
3.2. RÉSULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES	51
3.2.1. Résultats du contrôle de qualité	51
3.2.2. SNP associés à la SVAC après un test du khi-carré	52
3.2.3. SNP associés à la SVAC après ajustement pour le sexe	53
3.2.4. SNP associés à la SVAC après ajustement pour la maladie coronarienne	54
Chapitre IV : DISCUSSION	54
4.1. ANALYSE DES RÉSULTATS NON GÉNÉTIQUES.....	57
4.2. ANALYSE DES RÉSULTATS DES TESTS D'ASSOCIATIONS.....	59
4.2.1. Les gènes associés à la SVAC dans les études antérieures.....	61
4.2.2. Association du gène BMP2 à la SVAC	63
4.2.3. Association du gène LRP5 à la SVAC	65
Conclusion	69
BIBLIOGRAPHIE.....	71
ANNEXE.....	i
Tests de normalité des paramètres cliniques et biométriques.....	ii
Résultats du test du khi-carré des 81 SNP	iii
Graphique de puissance pour détecter une association au seuil 0,05	Erreur ! Signet non défini.i
Différents pools de SNP et amorces pour génotypage.....	viii

Liste des tableaux

Tableau I: Classification de la sténose valvulaire aortique [26]	13
Tableau II: Gènes du groupe 1 nominalement associés à la SVAC	19
Tableau III: Gènes associés au métabolisme des lipides et aux maladies inflammatoires (groupe 2).....	22
Tableau IV: Localisation chromosomique, nombre d'exons et longueur des différents gènes étudiés	29
Tableau V: SNP associés à la SVAC dans les études d'association précédentes ainsi que les types de population étudiés.	35
Tableau VI: SNP identifiés dans le métabolisme lipidique et dans l'inflammation par les études d'associations pangénomiques	36
Tableau VII: Composition de la réaction de PCR.....	41
Tableau VIII: Composition de la réaction de SAP	41
Tableau IX: Composition de la réaction iPLEX	42
Tableau X: Comparaison des facteurs de risque dans les groupes étudiés	48
Tableau XI: Comparaison des moyennes et médianes des variables échocardiographiques entre les deux groupes.....	49
Tableau XII: Comparaison des moyennes et médianes des variables biométriques entre les deux groupes	50
Tableau XIII: Résultats du contrôle de qualité des variants testés	51
Tableau XIV: SNP associés à la SVAC après un test du khi-carré	52
Tableau XV: SNP associés à la SVAC après ajustement pour le sexe	53
Tableau XVI: Résultats des SNP associés à la SVAC après ajustement pour la maladie coronarienne.....	54

Liste des figures

Figure 1: Schéma d'une valve aortique normale et d'une valve bicuspide	2
Figure 2: Représentation histologique d'un feuillet normal de valve aortique.....	5
Figure 3: Représentation histologique d'une valve aortique calcifiée	8
Figure 4: Représentation schématique de l'équation de continuité.....	11
Figure 5: Régulation de l'ostéogenèse par la voie Wnt3/Lrp5/ β -caténine	28
Figure 6: Description sommaire des étapes du génotypage par SEQUENOM.....	34
Figure 7: Exemple de séquence FASTA modifiée.....	37
Figure 8: Corrélation des SNP dans la région du SNP rs235737	64
Figure 9: Corrélation des SNP dans la région du SNP rs4930573	67

Liste des abréviations

ADN:	acide désoxyribonucléique
APOB:	apolipoprotéine B
APOE:	apolipoprotéine E
ARNm:	acide ribonucléique messenger
BMP2:	<i>bone morphogenic protein 2</i>
CCR5:	<i>C-C chemokine receptor 5</i>
CTSS:	<i>cathepsin S</i>
ds:	déviation standard
ECA:	enzyme de conversion de l'angiotensine
ESR1:	<i>estrogen receptor 1</i>
HDL:	<i>high density lipoprotein</i>
IL-10:	Interleukine 10
KS:	Kolmogorov-Smirnov
LDL:	<i>low-density lipoprotein</i>
LRP5:	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
m:	médiane
MAF :	<i>minor allele frequency</i>
MMP :	métalloprotéase matricielle
MMP9 :	métalloprotéase matricielle 9
MSX2:	<i>muscle segment homeobox 2</i>
NOTCH1 :	<i>Notch homolog 1</i>
OR :	rapport de cotes (<i>odds ratio</i>)
p :	valeur de p
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne
PCSK9 :	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>
PTH :	hormone parathyroïde
RANK-L	<i>Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand</i>
SMPD1:	<i>Sphingomyelin phosphodiesterase 1 acid lysosomal</i>
SNP :	polymorphisme nucléotidique simple (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SVAC :	sténose valvulaire aortique calcifiée
TGF β 1 :	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TGF β 2 :	<i>Transforming growth factor beta 2</i>
TIMP :	<i>Tissue inhibitor of metalloproteases</i>
TNFAIP3 :	<i>Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3</i>
VLDL :	<i>very low density lipoprotein</i>

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens à remercier mon directeur de mémoire Dr Jean-Claude Tardif pour la confiance qu'il m'a manifesté en me proposant ce projet ainsi que mon co-directeur Dr John Rioux qui s'est toujours montré disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire malgré ses charges académiques et professionnelles.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux Drs Éric Rhéaume et David Rhains qui ont eu la gentillesse de lire et corriger ce travail.

Dr Philippe Goyette, Claudine Beauchamp et Gabrielle Boucher pour leurs précieuses contributions.

J'exprime ma gratitude à tous les membres du laboratoire du Dr John Rioux et celui du Dr Guillaume Lettre, le personnel de la cohorte génétique hospitalière sans oublier celui de la clinique d'échocardiographie pour leur aide.

Je n'oublie pas mon fils Anthony qui a été compréhensif durant toutes ces années d'éloignement, ma compagne pour son soutien et notre enfant qui naîtra d'ici quelques mois.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Chapitre I : INTRODUCTION

1. GÉNÉRALITÉS

La sténose valvulaire aortique calcifiée (SVAC) est la principale cause du remplacement valvulaire en Europe et en Amérique du Nord et la troisième cause des maladies cardiovasculaires [1]. Sa prévalence augmente en lien avec le vieillissement de la population [2]. Sa pathogénie reste mal connue et son traitement principal demeure le remplacement valvulaire.

1.1. DÉFINITION

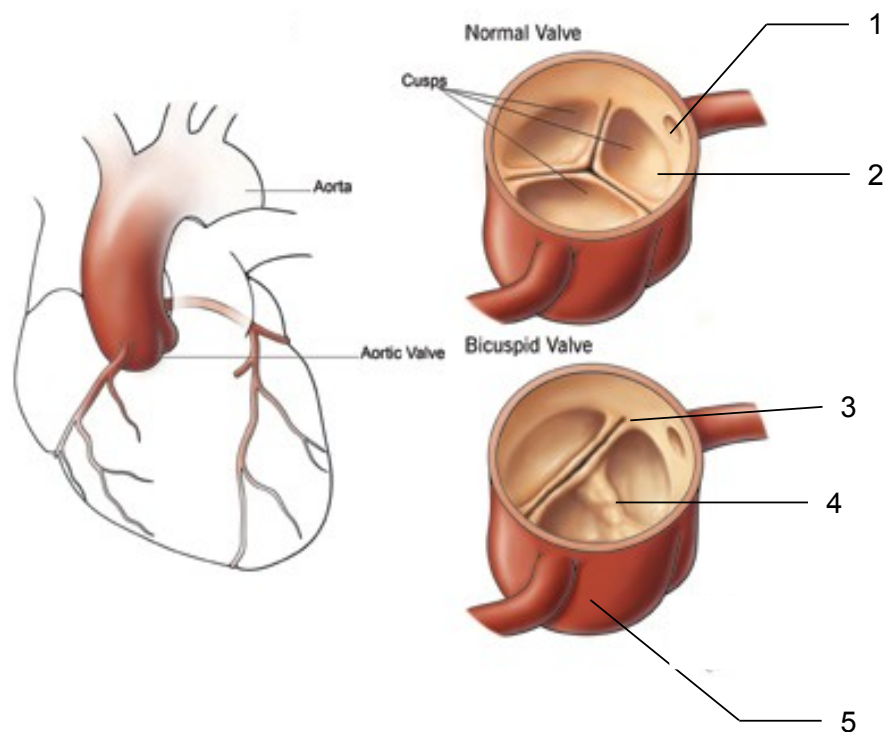


Figure 1: Schéma d'une valve aortique normale et d'une valve bicuspide

Normal valve: valve normale; *cusps* : cuspidés ; *bicuspid valve* : valve bicuspide;
Aorta : aorte; *aortic valve* : valve aortique; 1 : origine de l'artère coronaire gauche
 2 : feuillet; 3 : commissure; 4 : raphé; 5 : sinus de Valsalva

Adapté de la source:

http://my.clevelandclinic.org/heart/disorders/bicuspid_aortic_valve_disease.aspx

La valve aortique normale est constituée de 3 feuillets ou cuspidés séparés par des commissures (cf. Fig. 1). Elle se situe entre le ventricule gauche du cœur et l'aorte, vaisseau par lequel le sang éjecté est redistribué dans tout l'organisme. La SVAC se caractérise par un épaississement des feuillets de la valve, qui se calcifient. Cette calcification provoque une réduction de l'orifice aortique entraînant une ouverture incomplète de la valve, une gêne à l'évacuation du sang hors du cœur et des conséquences sur le myocarde telles que l'hypertrophie du ventricule gauche.

La SVAC a été décrite pour la première fois en 1904 par Mönckeberg [2-4]. À cette époque, les études ont révélé une sclérose et un épaississement des feuillets. En conséquence, la sclérose aortique (épaississement sans sténose) et la sténose de la valve aortique ont longtemps été considérées comme deux entités pathologiques différentes. Des données récentes suggèrent que celles-ci représentent différents processus d'une même maladie [5]. La sclérose résulte du développement des lésions valvulaires qui évoluent lentement vers la calcification pour créer la sténose [3].

1.2. ÉPIDÉMIOLOGIE

La fréquence des SVAC est en augmentation avec le vieillissement de la population en Amérique du Nord et en Europe où elle constitue un problème majeur de santé publique. En général, la sclérose aortique est présente chez 20 à 30 % des personnes âgées de plus de 65 ans et 48% au delà de 85 ans, tandis que la sténose aortique est présente dans les proportions de 2% et 4% respectivement [2, 3, 6-8]. *Lung et al.* ont observé chez des patients atteints de sclérose aortique une progression de 16% vers la SVAC sévère après une période de suivi de 7 ans [9]. On note une prédominance masculine. Deux patients sur trois sont des hommes [10].

1.3. ÉTIOLOGIE

Jusqu'à présent, trois étiologies ont été attribuées à la SVAC : la malformation congénitale, la fièvre rhumatismale et la dégénérescence de la valve due au vieillissement.

1.3.1. La malformation congénitale de la valve

La malformation congénitale de la valve ou bicuspidie congénitale est identifiée par la présence de 2 cuspidés au lieu de 3. Dans sa forme la plus fréquente, elle fait suite à un épaissement et à une calcification du raphé (ligne réunissant les deux cuspidés) avec accumulation de calcaire [11].

1.3.2. La SVAC d'origine rhumatismale

La SVAC d'origine rhumatismale est habituellement d'évolution très lente. Elle est due aux séquelles d'une infection au streptocoque pyogène. Elle résulte de la fusion d'une, deux ou plus souvent trois commissures. Cette forme est souvent accompagnée d'une sténose mitrale.

1.3.3. La SVAC d'origine dégénérative

La SVAC d'origine dégénérative représente 60% des cas de SVAC dans les pays occidentaux. Elle est encore appelée maladie de Mönckeberg et résulte d'un épaissement sous-endothélial suivi d'une calcification progressive des valves et des sigmoïdes [12]. C'est cette forme qui a été pris en compte dans notre projet.

1.4. PHYSIOPATHOGENÈSE

Histologiquement, les feuillets de valves normales sont macroscopiquement lisses, minces, opalescents avec des couches de tissus clairement définies. Au niveau microscopique, ils ont très peu de cellules [3]. Ces feuillets sont constitués essentiellement de myofibroblastes, des fibres de collagène et d'élastine [13, 14]. Entre les couches endothéliales, on distingue 3 entités : la fibrosa, la spongiosa et la ventricularis (cf. Fig. 2). La fibrosa est composée essentiellement de myofibroblastes et quelques fibres de collagènes. La spongiosa, en plus

des composantes précédemment énumérées, comprend des protéoglycans tandis que la ventricularis se distingue par une quantité d'élastine plus importante.

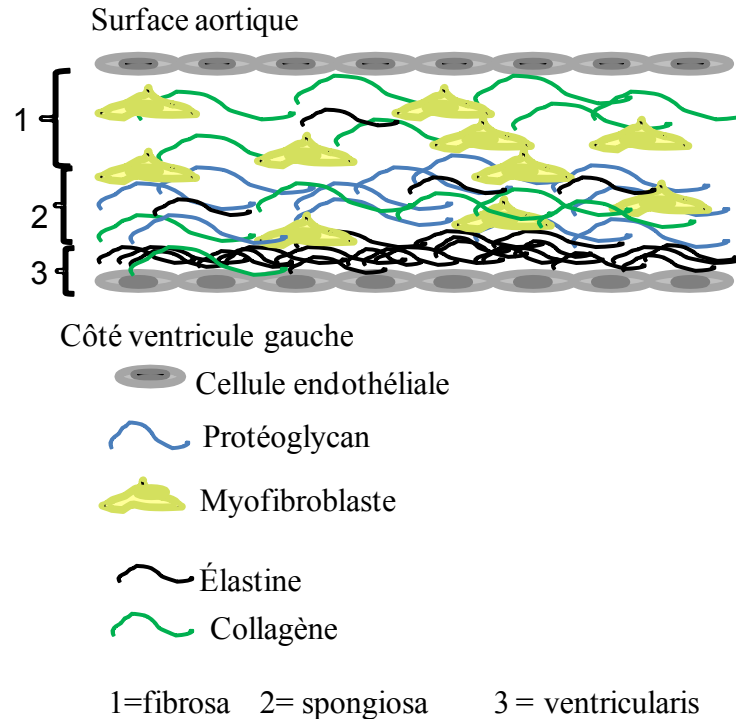


Figure 2: Représentation histologique d'un feuillet normal de valve aortique

Avec le vieillissement, apparaît un épaississement non spécifique au niveau de la valve puis une augmentation du nombre et du type de cellules, ainsi que de la couche fibro-élastique. Les facteurs initiateurs dans le développement de la SVAC semblent être soit un stress mécanique et/ou des facteurs génétiques [15], soit une valve bicuspide qui est présente à des proportions variant de 0,5 à 0,8% dans la population générale. La valve bicuspide est visualisée par l'échocardiographie ou retrouvée dans l'anatomie des valves aortiques après un remplacement valvulaire. La dynamique des fluides peut également jouer un rôle dans la détérioration de la valve aortique. Dès le départ, les lésions sont souvent localisées à un endroit de la valve où le stress de cisaillement est élevé [16]. Certains facteurs de risque au niveau épidémiologique comme l'âge, le sexe masculin, le taux élevé des lipoprotéines de

faible densité (LDL), le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète ou le syndrome métabolique peuvent favoriser la progression des lésions [17].

Jusqu'à présent, la grande majorité des travaux soutiennent l'hypothèse selon laquelle la calcification de la valve aortique est un processus cellulaire actif impliquant plusieurs composantes lipidiques, inflammatoires, et phosphocalciques [18].

1.4.1. La composante lipidique

Dans la SVAC, l'hypothèse selon laquelle la lésion initiale est une perte d'intégrité de la paroi endothéliale est celle souvent évoquée. Cette rupture favorise la pénétration des lipides circulants principalement les LDL dans le tissu interstitiel. Les LDL sont ensuite oxydées dans le tissu interstitiel et attirent les macrophages et monocytes stimulant ainsi l'activité inflammatoire mais également la minéralisation [16, 19]. L'accumulation des LDL présente au début des lésions valvulaires, augmente au fur et à mesure que progresse la lésion. Les LDL oxydées dans le tissu interstitiel valvulaire, sont ensuite phagocytées par les macrophages pour former les cellules spumeuses (cf. figure 3) [16].

1.4.2. La composante inflammatoire

La pénétration des LDL dans la matrice extracellulaire provoque une réaction inflammatoire. Cette réaction fait intervenir les lymphocytes T qui s'infiltrent sous l'endothélium et les macrophages qui sécrètent les cytokines IL-1 β et TGF β 1 [16]. Les cytokines se lient à leurs récepteurs respectifs situés à la surface des fibroblastes valvulaires, ce qui favorise la prolifération cellulaire puis le remodelage tissulaire par l'intermédiaire des enzymes dégradant la matrice extracellulaire (les métalloprotéases matricielles ou MMP) [2]. L'activité tissulaire des MMP est contrôlée à 3 niveaux: la régulation de la transcription, l'activation latente des pro-enzymes et l'inhibition de l'activité protéolytique [6]. Les MMP sont produites comme pro-enzymes (pro-MMP) nécessitant le clivage du peptide N-terminal via l'activité des MMP de type membranaire

(MT-MMP). Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) inhibent l'activité des métalloprotéases en formant un complexe irréversible non-covalent avec les MMP [15, 20]. Les MMP2 et MMP9 modifient également l'activité biologique des protéines non matricielles et des cytokines [21]. Ces deux MMP ont été détectées dans les calcifications des feuillets de valve aortique [22]. L'état d'activation des MMP diffère qualitativement et quantitativement à chaque étape de la dégénérescence valvulaire.

L'augmentation des fibres de collagène, d'élastine et des cellules fibroblastes apparaît à un stade avancé de l'inflammation de la valve. Il se produit ainsi une fibrose. La production accrue de collagène par les fibroblastes et l'accumulation des composantes de la matrice extracellulaire conduisent à un épaissement des feuillets de la valve [14]. En outre l'augmentation de la production du collagène et la dégradation de l'élastine sous l'effet de l'élastase provoquent une diminution du ratio élastine/collagène au niveau de la valve, ce qui contribue encore plus à une augmentation de la rigidité valvulaire.

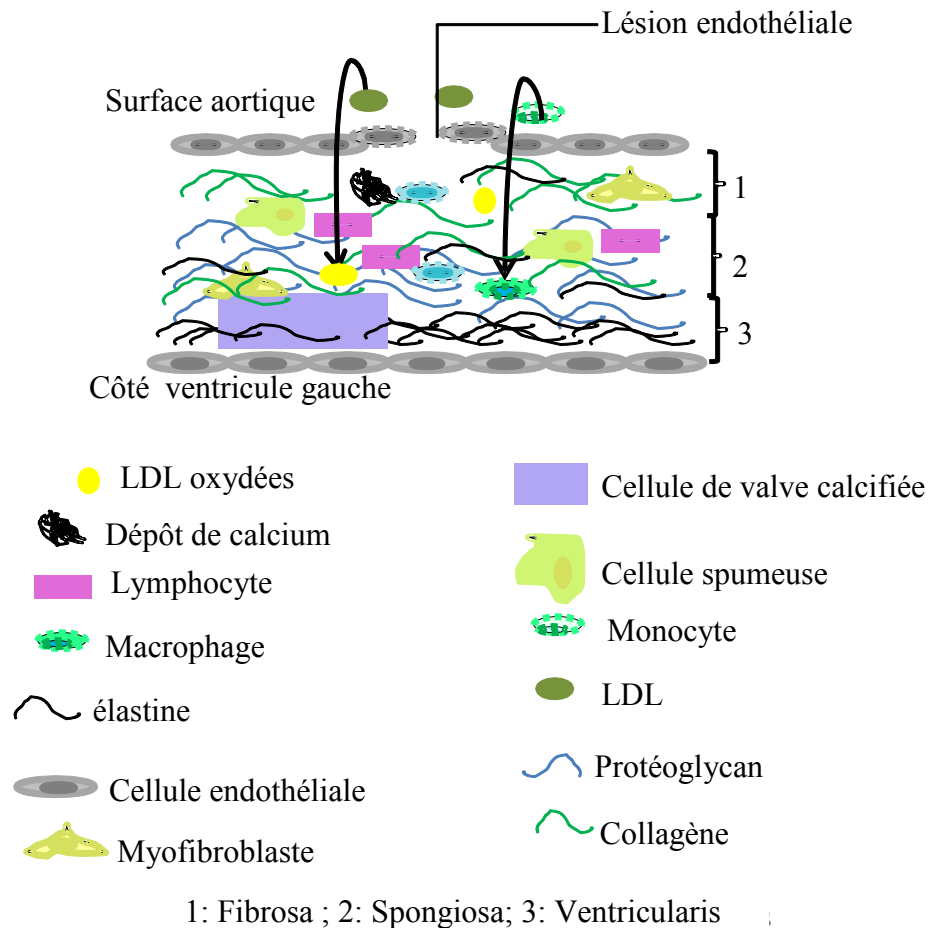


Figure 3: Représentation histologique d'une valve aortique calcifiée

1.4.3. La composante phosphocalcique

Les protéines de la matrice osseuse, composantes du métabolisme phosphocalcique, restent mal définies dans la SVAC, malgré que la calcification des valves aortiques et l'ossification aient été décrites dans la littérature depuis de nombreuses années [23]. De plus, plusieurs composantes comme l'ostéopontine, les BMP (*bone morphogenic proteins*), le calcium, le TGFB1 (*transforming growth factor, beta 1*), le ligand pour le récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANK-L), ou des processus comme la transformation des fibroblastes en myofibroblastes et ostéoblastes impliqués dans la régulation de la

calcification tissulaire sont capables d'induire la formation osseuse et la production de nodules calcifiés. Toutes ces composantes ont été détectées dans les valves calcifiées. [24]. RANK-L est exprimé dans les feuillets de valves normales mais ne se retrouve pas dans les lésions de valves. RANK-L et l'ostéoprotégérine (OPG), un inhibiteur de la résorption osseuse, sont exprimés par les cellules ostéoblastiques du stroma, tandis que l'ARNm de RANK-L est produit par les précurseurs des ostéoclastes [25]. Les ostéoblastes sont responsables de la formation osseuse, tandis que les ostéoclastes contrebalancent l'action des ostéoblastes pour dégrader la masse osseuse dans les conditions homéostatiques. La calcification de la valve aortique pourrait se produire lorsque l'équilibre physiologique entre la formation et la dégradation osseuse est perturbée.

1.5. DIAGNOSTIC DE LA SVAC

1.5.1. Symptomatologie clinique

1.5.1.1. Signes fonctionnels

Les signes fonctionnels dépendent de l'adaptation du ventricule gauche à la diminution fonctionnelle de la valve aortique due au rétrécissement [10, 26]. Les patients avec SVAC restent longtemps asymptomatiques. Les manifestations cliniques apparaissent habituellement lorsque la surface d'ouverture valvulaire aortique devient inférieure ou égale à 1 cm². Cette réduction de la surface aortique entraîne une gêne à l'éjection du sang hors du ventricule gauche qui s'adapte à cette nouvelle condition de fonctionnement grâce à des mécanismes de compensation [12]. Ainsi, les signes fonctionnels sont surtout des symptômes à l'effort, à savoir :

- L'angor d'effort

L'angor d'effort est une douleur ou une gêne thoracique d'une durée de plusieurs minutes, provoquée par l'effort ou l'anxiété. Celle-ci est localisée le plus souvent dans la région rétro-sternale, pouvant irradier vers le bras gauche. L'angor d'effort évoque une ischémie

myocardique. Ce symptôme peut être dû exclusivement à la sténose aortique ou parfois à une maladie coronarienne associée.

- La dyspnée d'effort

La dyspnée d'effort ou difficulté respiratoire à l'effort est le signe clinique le plus fréquent. Elle est de degré variable. Elle précède habituellement les manifestations d'insuffisance ventriculaire gauche voire d'insuffisance cardiaque.

- La syncope et la lipothymie

La syncope et la lipothymie sont déclenchées par l'effort. Parfois, elles sont précédées d'une douleur thoracique. La lipothymie est une simple sensation de faiblesse avec malaise général, sans perte de connaissance. Par contre en cas de syncope, la perte de connaissance est complète et de brève durée. La syncope évoque l'ischémie cérébrale d'effort. Elle représente un symptôme fonctionnel inquiétant qui fait craindre l'éventualité d'une mort subite.

1.5.1.2. Les signes physiques

Les signes physiques se résument le plus souvent à la constatation d'un souffle systolique à l'auscultation [10]. Il s'agit d'un souffle systolique éjectionnel, distant du premier bruit (B1) et du deuxième bruit (B2), maximal à la base, classiquement au foyer aortique (deuxième espace intercostal droit) [27]. Ce souffle irradie de façon ascendante vers les vaisseaux du cou. Il est habituellement rude et râpeux. Le B2 est diminué et souvent absent. D'autres signes physiques comme le choc apexien, le frémissent systolique ainsi que le pouls artériel petit et lent sont en rapport avec la sévérité de la SVA [28].

1.5.2. Signes échocardiographiques

L'échocardiographie couplée au Doppler est l'examen-clé du diagnostic de la SVAC [10, 26]. L'utilisation plus répandue de l'écho-Doppler chez des porteurs de souffle systolique a

permis de dépister de très nombreux cas de SVAC. C'est grâce à cette technique que la prévalence élevée de cette pathologie a pu être découverte chez les personnes de plus de 60 ans. Morphologiquement, cet examen montre l'épaississement des feuillets de la valve aortique, précise le caractère tricuspide ou bicuspide de la valve et montre souvent des calcifications [27]. L'échocardiographie couplée au Doppler permet de mesurer l'aire valvulaire, le jet de vélocité, le gradient moyen et maximal de pression et les paramètres en rapport avec le retentissement de la SVAC sur le myocarde.

1.5.2.1. Aire valvulaire aortique

L'aire valvulaire aortique normale est comprise entre 2,5 et 3 cm². Elle diminue en cas de sténose aortique et peut atteindre des valeurs inférieures à 0,75 cm² dans les formes très sévères [10, 26]. Celle-ci peut être calculée en combinant l'échocardiographie au Doppler en utilisant l'équation de continuité qui stipule que dans un cylindre où l'écoulement est laminaire, le débit d'entrée est égal au débit de sortie. Elle peut également être calculée par une évaluation indirecte de la surface aortique.

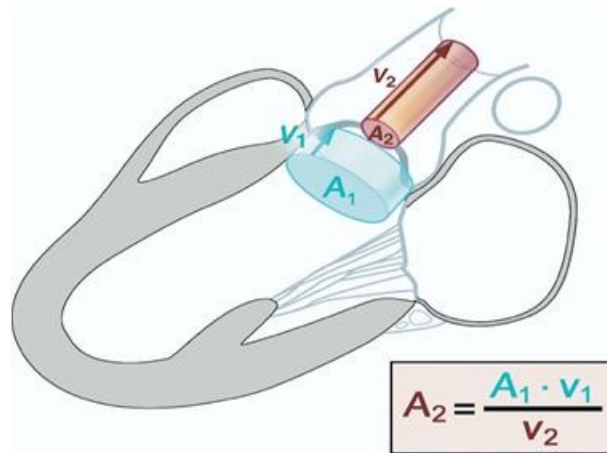


Figure 4: Représentation schématique de l'équation de continuité

A_1 : Aire dans la voie d'éjection du ventricule Gauche ; A_2 : Aire au niveau de la valve aortique; V_1 : vitesse du flux sanguin dans la voie d'éjection ; V_2 : vitesse du flux sanguin à travers la valve aortique ; $A_1 \cdot V_1 = A_2 \cdot V_2$ Adapté de *Baumgartner et al.* [26].

L'évaluation par l'équation de continuité se fait en comparant le flux sanguin dans la voie d'éjection du ventricule gauche avec celui au travers de la valve aortique (cf. figure 4) [29]. L'aire valvulaire aortique est égale au produit de l'aire de la chambre de chasse du ventricule gauche par la vitesse du flux sanguin à ce niveau divisée par la vitesse maximale du flux à travers la valve. La taille et le poids sont également pris en compte dans ce calcul [26]. Cependant la normalisation par le poids et la taille peut engendrer des fausses conclusions chez les obèses. Globalement, la longueur de la racine aortique et plus spécifiquement l'aire aortique n'augmentent pas généralement avec l'excès de poids [30].

1.5.2.2. Le jet de vitesse

Le jet de vitesse traduit la vitesse sanguine trans-valvulaire (ou trans-sténotique). Cette vitesse est déterminée à l'aide d'un Doppler continu par voie apicale ou supra-sternale. La vitesse au niveau de l'orifice aortique normal est voisine de 1 m/s [12]. Dans les sténoses aortiques, cette vitesse peut monter jusqu'à 6 m/s.

1.5.2.3. Le gradient moyen de pression

Le gradient moyen de pression trans-aortique (G) représente la différence de pression entre le ventricule gauche et l'aorte en systole quand ces deux pressions sont enregistrées simultanément. Il est fourni par l'application simple de l'équation de Bernoulli : $G = 4V^2$, où V est la vitesse du flux aortique [10, 12, 26, 29, 31]. Le gradient moyen de pression est calculé automatiquement par les logiciels des appareils d'échocardiographie à partir de la planimétrie de la courbe de vitesse aortique. En l'absence d'une modification du volume d'éjection, une élévation du gradient moyen témoigne de la sévérité de la sténose.

La surface aortique, le gradient de pression et le jet de vitesse permettent de faire le diagnostic et de classer la SVAC de la forme légère à la forme sévère (cf. tableau I) [26, 27, 29].

Tableau I: Classification de la sténose valvulaire aortique [26]

Paramètres échocardiographiques	Sclérose aortique	sténose		
		légère	modérée	sévère
Jet de vitesse (m/s)	≤ 2,5	2,6 - 2,9	3,0 - 4,0	> 4,0
Gradient moyen de pression (mm Hg)	nd.	< 20	20 - 40	> 40
Aire valvulaire aortique (cm ²)	nd	> 1,5	1,0 - 1,5	< 1,0
Aire valvulaire aortique indexée à la surface corporelle (cm ² /m ²)	nd	> 0,85	0,25 - 0,60	< 0,6

nd : non définie

1.5.2.4. Autres signes mesurés par l'écho-Doppler

Les paramètres tels que la masse indexée du ventricule gauche en g/m², l'épaisseur du septum inter-ventriculaire et de la paroi postérieure du ventricule gauche en mm sont également mesurés par l'écho-Doppler pour évaluer le retentissement sur le myocarde.

1.6. QUELQUES CONCEPTS ET ÉTUDES EN GÉNÉTIQUE

1.6.1. Les concepts en génétique

Le génome humain est constitué de 23 paires de chromosomes comprenant environ 20000 gènes étendus sur une distance d'environ 3 milliards de paire de bases [32]. Les chromosomes constitués de molécules d'ADN à double brin.

Chaque gène est formé d'une séquence d'ADN sur laquelle on retrouve des variations génétiques entre les individus. Plusieurs types de variations génétiques ont été identifiés. Parmi elles, nous pouvons citer les microsatellites, les insertions, les délétions, la variabilité du nombre de copies d'un gène (CNV : «*copy number variation*») et les SNP (*single nucleotide polymorphism*).

Pour ce projet, nous avons utilisé des SNP. Un SNP, formé souvent de deux allèles, provient donc d'un changement d'une paire de base à un site spécifique d'une séquence d'ADN. Il s'agit d'une modification ponctuelle survenant sur les nucléotides A, C, G ou T. Les SNP représentent la majorité des variations génétiques communes dans le génome humain. La majorité de ces SNP n'ont aucun effet. Certains définissent tout simplement un phénotype comme la couleur des yeux, la couleur de la peau, la taille et un très petit nombre vont causer un effet sur la prédisposition aux maladies. C'est cette dernière catégorie que les études génétiques visent à trouver.

Comme chaque chromosome d'un individu est composé d'une molécule d'ADN, les différents allèles des différents locus sur un même chromosome sont physiquement liés entre eux. Ainsi, à chaque génération, il se produit des recombinaisons génétiques par le biais des méioses avec pour conséquence une redistribution des allèles dont certains sont transmis conjointement dans le génome humain. Cette transmission conjointe des allèles de deux locus différents est appelée le déséquilibre de liaison (LD). L'un des avantages de connaître le déséquilibre de liaison des SNP dans une région donnée, réside dans le fait qu'il permet de sélectionner un groupe de SNP pour capturer la variabilité génétique de la région ciblée réduisant ainsi le nombre de SNP à génotyper [33]. Cette méthode de sélection est appelée en anglais «*tagging*». Les SNP ainsi sélectionnés sont appelés des SNP marqueurs ou «*tagSNPs*». Le «*tagging*» permet d'éviter la redondance et limite ainsi les coûts du génotypage. Il est rendu possible actuellement grâce à l'existence des bases de données en ligne comme HapMap et le programme Haploview. Cette base de données fournit des informations sur le LD, les fréquences des haplotypes dans la population, les blocs d'haplotypes et l'association statistique de chaque marqueur du génome humain dans un format spécifique [34]. Pour ce projet, nous avons utilisé les données du projet international HapMap pour effectuer le «*tagging*». Les données du projet HapMap ont permis d'identifier les variations génétiques communes au sein des différentes populations et d'évaluer le déséquilibre de liaison entre elles tout en les rendant disponibles pour les chercheurs [35].

1.6.2. Les études en génétique

Les études génétiques ont pour but de déterminer les facteurs de risques de nature génétique. Elles peuvent être divisées en deux grands groupes : les études d'association et les études de liaison.

1.6.2.1. Les études de liaison

Dans ces études, des échantillons familiaux de filiation connue, sont génotypés dans le but de détecter la transmission conjointe d'une région génomique et d'un phénotype [36]. Ce type d'étude nécessite le recrutement des familles et est donc difficile à appliquer dans une maladie comme la SVAC qui se déclare à un âge avancé avec une faible possibilité de retrouver les parents ou les grands-parents des patients ou même de détecter la maladie chez les enfants. Ce type d'étude est utile pour les maladies monogéniques à haute pénétrance avec un facteur génétique fort. Cependant, la résolution des patrons de déséquilibre de liaison dans ce genre d'étude est généralement faible [37]. Néanmoins, ce type d'étude permet d'utiliser des familles provenant de différentes régions sans risque de créer de faux positifs car moins sujettes à l'hétérogénéité retrouvée dans une population.

1.6.2.2. Les études d'association

Les études d'association en génétique visent à détecter un lien entre un ou plusieurs polymorphismes génétiques et un caractère. Celui-ci peut être un trait quantitatif ou discret attribué ou pas à une maladie [38, 39]. Dans le cas d'un caractère dichotomique, ces études explorent une surreprésentation des polymorphismes dans l'une des deux populations cas ou témoins. Ces études peuvent se faire selon une approche par gènes candidats ou selon une approche pangénomique. Les études d'association sont très influencées par l'hétérogénéité des populations mais elles sont plus puissantes que les études de liaison.

1.6.2.2.1. Les études d'associations par gènes candidat

L'approche par gène candidat consiste à sélectionner des gènes en fonction des informations disponibles qui peuvent provenir, par exemple, des études de modèles expérimentaux. Ces informations peuvent également provenir d'une étude d'association génétique rapportée par des publications précédentes. Une définition claire du phénotype combinée à une sélection adéquate des gènes et les fréquences alléliques des polymorphismes associés permettent de maximiser la puissance et l'efficacité de ce type d'étude [40]. L'étude d'association par gènes candidats évalue donc le lien entre certains variants génétiques et un caractère (phénotype) d'intérêt. L'avantage d'effectuer une étude centrée sur une sélection de gènes candidats réside dans le coût [41]. L'approche par gène candidat s'est avérée intéressante pour étudier l'architecture des traits complexes avec un succès limité. Cependant, cette approche permet d'identifier de nouvelles associations, mais elle se limite «a priori» à des connaissances et modèles déjà connus.

1.6.2.2.2. Les études pangénomiques

Les études pangénomiques évaluent l'association de variants génétiques avec un caractère d'intérêt en utilisant un grand nombre de SNP dispersés à travers le génome sans «a priori» particulier [42]. Étant donné le nombre de marqueurs, cette approche fait intervenir un nombre important de tests statistiques indépendants, environ 1 million. Ceci augmente le risque de voir apparaître de fausses associations. La méthode adéquate pour palier à ce phénomène est la correction pour les tests multiples. Dans ce cas le seuil de significativité p sera plus sévère; habituellement de 5×10^{-8} . Pour atteindre cette valeur seuil, il faudrait donc une taille d'échantillon assez grande. Les études pangénomiques engendrent ainsi des coûts importants. Néanmoins, elles permettent de découvrir de nombreux gènes de susceptibilités et potentiellement de nouveaux mécanismes pathophysiologiques sous-jacents à la maladie.

1.7. GÉNÉTIQUE DE LA SVAC

Plusieurs études suggèrent l'influence des facteurs génétiques dans la sténose valvulaire aortique [43-46] plus spécifiquement, son caractère héréditaire a été surtout démontré dans la SVAC d'étiologie malformative où l'on a pu mettre en évidence une transmission familiale de la SVA et identifier des mutations sur le gène *NOTCH1* [24, 47-49]. Le gène *NOTCH1* code pour un récepteur transmembranaire qui intervient dans la voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la différenciation et le sort des cellules. Il augmente l'expression des répresseurs transcriptionnels de la famille *Hairy*, médiateurs centraux des effets de Notch1 sur l'expression génétique [48]. Ceci provoque une diminution de l'expression de Runx2/Cbfa1, un médiateur-clé de la différenciation ostéoblastique [50]. Ainsi, un défaut du gène *NOTCH1* favoriserait l'augmentation de la différenciation ostéoblastique par une augmentation de la voie de Runx2/Cbfa1.

De plus, une base de données populationnelles des habitants de l'Utah (États-Unis d'Amérique) a également permis de montrer que la mort résultant d'une détérioration de la valve aortique était transmissible dans certaines familles [51]. Cette constatation suggère une composante génétique dans les décès causés par les affections de la valve aortique. Par ailleurs, certains facteurs de risque associés à la SVAC comme l'accumulation des LDL, l'hypertension artérielle, le diabète ont eux même une composante héréditaire actuellement prouvée. Tout ceci nous amène à penser que la SVAC d'étiologie dégénérative pourrait également avoir une composante génétique. Actuellement, très peu de gènes (*PTH*, *APOE*, *APOB*, *VDR* et *ESR1*) ont été nominalement associés à la SVAC ($p < 0,05$) sans être validés. Ceci est probablement dû au nombre limité d'études d'associations génétiques réalisées dans ce domaine. À l'exception du gène *PTH* qui a été associé à la SVAC dans une cohorte de plus de 500 cas et 500 témoins, la plupart de ces études ont été réalisées sur des cohortes contenant au plus 100 cas de SVAC [45, 46, 52]. De plus, chez les patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale dans sa forme autosomale récessive (ARH), il a été observé une augmentation significative de la prédisposition à la SVAC [53].

Des études fonctionnelles sur des modèles animaux de la SVAC ont permis de mettre en évidence une perturbation de l'expression des protéines codées par plusieurs gènes dont

BMP2, CTSS, LRP5, MMP9, MSX2, RUNX2/CBFA1, SMPD1, et WNT3. Ces études nous amènent à penser que ces gènes pouvaient jouer un rôle dans la prédisposition à la SVAC.

1.7.1. Sélection et étude sommaire des gènes candidats

1.7.1.1. Sélection des gènes candidats

L'approche d'étude d'association par gène candidat paraissait la méthode la plus appropriée pour cette étude. Ceci à cause du recrutement qui n'a pas été effectué sur des familles mais également à cause de la taille de l'échantillon qui n'était pas appropriée pour une étude pangénomique. Dès lors, sur la base des connaissances actuelles, il nous a paru indiqué de tester dans notre cohorte phénotypiquement bien définie l'ensemble des gènes candidats suivants pour investiguer les causes génétiques de la SVAC: *APOB, APOE, BMP2, CCR5, CTGF, CTSS, PTH, PCSK9, IL10, LRP5, MMP9, MSX2, TNFAIP3, ESRI, RUNX2/CBFA1, SMPD1, VDR, et WNT3*. Ainsi, la sélection des gènes candidats présentés ci-dessus a été faite en tenant compte des paramètres suivants :

- Dans un premier temps, l'association des gènes candidats à la SVAC rapportée dans les études antérieures avec une valeur de p inférieure à 0,05. Les gènes répondants à ce critère ou gènes du groupe 1 sont les suivants : *APOB, APOE, ESRI, PTH* et *VDR* [43-46, 52, 54].

- Ensuite, étant donné que la pathogénie de la SVAC fait intervenir l'inflammation et le métabolisme des lipides, nous avons jugé nécessaire d'introduire dans notre étude quelques gènes qui interviennent dans ces processus et dont l'association a été détectée et validée dans certaines maladies inflammatoires ou par des études pangénomiques sur les lipides. Ce sont les gènes suivants (groupe 2) : *IL10* (colite ulcéreuse); *LDLR* et *PCSK9* (maladie coronarienne) et enfin *TNFAIP3* (lupus érythémateux) [55-57].

- Enfin, nous avons sélectionné dans le groupe 3, certains gènes identifiés dans des études fonctionnelles chez des modèles animaux en rapport avec la pathogénie de la SVAC.

Pour cette étape, nous avons privilégié les gènes intervenant dans la calcification à cause de son caractère crucial dans la SVAC. Il s'agit de: *BMP2*, *CCR5*, *CTGF*, *CTSS*, *LRP5*, *MMP9*, *MSX2*, *RUNX2/CBFA1*, *SMPD1* et *WNT3* [2, 16, 20, 58-62].

1.7.1.2. Informations sommaires des gènes candidats sélectionnés

1.7.1.2.1. Gènes présumés associés à la SVAC dans les études antérieures (groupe 1)

Tableau II: Gènes du groupe 1 nominalement associés à la SVAC

Gènes	Cas		Témoins		P	OR	Référence
	N	FAA	N	FAA			
<i>APOB</i>	62	0,55	62	0,38	0,007	1,55 (1,05-2,30)	[52]
<i>APOE</i>	43	0,21	759	0,13	0,046	1,77 (1,13-2,76)	[44]
<i>APOE</i>	62	0,32	62	0,14	0,034	2,80 (1,50- 5,24)	[52]
<i>ESRI</i>	41	ND	41	ND	0,03	3,38 (1,13-10,09)	[46]
<i>PTH</i>	538	0,43	536	0,37	0,007	1,64 (1,30-2,70)	[43]
<i>VDR</i>	100	0,56	100	0,4	0,001	1,70 (1,29-2,23)	[45]

FAA : fréquence de l'allèle associé; N : nombre; ND : non déterminé

Le gène de l'apolipoprotéine B (*APOB*) se trouve sur le locus 2p24 (voir Tableau IV). Il est fortement exprimé au niveau du foie. Le gène *APOB* code pour deux protéines : ApoB48 et l'Apo100 qui se retrouvent respectivement sur la surface des chylomicrons (ApoB48), des lipoprotéines de faible densité (ApoB100) et les VLDL (ApoB100). L'ApoB100 fonctionne comme un signal de reconnaissance pour la liaison cellulaire et

l'internalisation des particules de LDL par le récepteur de l'ApoB. L'ApoB48 est synthétisée uniquement dans l'intestin grêle et elle est produite lorsqu' il y a introduction d'un codon stop (UUA) au niveau du résidu 2153 de l'ARNm. Certains variants du gène *APOB* sont associés à une augmentation de la concentration plasmatique des LDL et des triglycérides [55]. *Avakian et al.* ont identifié un polymorphisme de l'apolipoprotéine B associé à une augmentation de la prévalence de la SVAC dans une population brésilienne [52].

Le gène de l'apolipoprotéine E (*APOE*) se trouve sur le locus 19q13.2 et code pour une protéine qui permet l'élimination hépatique des LDL par la fixation cellulaire des particules au récepteur de LDL. Ce gène est polymorphique avec trois allèles communs ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) codant pour trois isoformes E2, E3, E4. Les allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$ ont été associés à une augmentation de la prévalence de la SVAC chez l'humain [52]. Les isoformes E2, E3, E4 diffèrent les uns des autres par une substitution d'acide aminé unique ainsi que par leur capacité à lier les récepteurs de l'ApoE [44, 63]. L'*APOE* est exprimée dans plusieurs tissus humains. Cependant, son expression est plus importante dans le foie et les adipocytes. Les études sur l'*APOE* suggèrent une forte prévalence de la maladie coronarienne pour les patients porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ [64, 65]. De plus, la variation dans le gène codant pour l'ApoE peut jouer un rôle dans la calcification des artères coronaires [66].

Le gène *ESR1* ou récepteur 1 des œstrogène se trouve sur le locus 6q25. Il code pour le récepteur nucléaire de l'œstrogène, un facteur de transcription activé par un ligand composé de différents domaines importants pour la liaison de l'hormone, de l'ADN et de l'activation de la transcription. En dehors de ses multiples fonctions sur les organes reproducteurs, le système nerveux et la croissance, le gène *ESR1* est associé au risque d'hyperlipidémie chez la femme ménopausée [67]. Il est également associé à une sclérose de la valve aortique [46]. Les travaux de *Lorentzon et al.* ont montré une association de ce gène avec la densité osseuse durant la puberté [68].

Le gène de l'hormone parathyroïdienne (*PTH*) est localisé sur le chromosome 11p15.3, il code pour une hormone sécrétée par les cellules parathyroïdiennes. Les récepteurs de *PTH* sont largement exprimés sur la surface des ostéoblastes [69]. Ainsi, l'hormone PTH stimule la libération du calcium et du phosphate des os. Par ailleurs, elle stimule également la réabsorption du calcium dans les reins en inhibant la réabsorption de phosphates [25]. Les travaux de *Linhartová et al.* ont mis en évidence une association entre le taux sérique de l'hormone PTH et la prédisposition à la SVAC chez les patients coronariens (OR=1.04; C.I 95% =[1.02-1.05]; p<0.001) [54]. *Schmitz et al.* ont rapporté une association entre le gène *PTH* et la SVAC dans une cohorte plus large tout en précisant la position du polymorphisme en région intronique (p= 0,007) [43].

Le gène du récepteur de la vitamine D (*VDR*) se localise au niveau du locus 12p13.11. Il a une séquence d'environ 103 kbp et est composé de 10 exons. La contribution du polymorphisme du récepteur de la vitamine D au métabolisme osseux a été évaluée au cours des dernières décennies. Ce polymorphisme est constitué de 3 génotypes : BB, Bb et bb. *Ortlepp et al.* [45] ont identifié une association entre la SVAC et les porteurs de l'allèle B. Ce gène code pour le récepteur nucléaire de la vitamine D et semble associé à la minéralisation osseuse. Il est exprimé dans l'intestin, la thyroïde, le rein et a un rôle essentiel dans l'homéostasie du calcium. Un polymorphisme du récepteur de la vitamine D semble associé à la densité osseuse ou à la minéralisation osseuse [25, 70].

1.7.1.2.2. Gènes impliqués dans les maladies inflammatoires et le métabolisme des lipides (groupe 2)

Tableau III: Gènes associés au métabolisme des lipides et aux maladies inflammatoires (groupe 2)

Gènes	Maladie	Cas	Témoins	OR	p	Références
<i>IL10</i>	Colite ulcéreuse	1167	777	1,46 (1,31-1,62)	$1.35 \cdot 10^{-12}$	[57]
<i>LDLR</i>	Maladie coronarienne	12301®		1,29 (1,10-1,52)	$4,2 \cdot 10^{-26}$	[55, 71]
<i>PCSK9</i>	Maladie coronarienne	12284®		1,13 (1,03-1,23)	$3,5 \cdot 10^{-11}$	[55, 71]
<i>TNFAIP3</i>	Lupus érythémateux	717	1362	1,92 (1,53-2,41)	$1.9 \cdot 10^{-8}$	[56]

® : Méta-analyse des études pangénomiques

Le gène *IL10* (*interleukin 10*) code pour l'interleukine-10. Cette dernière est une cytokine anti-inflammatoire produite principalement par les monocytes et à moindre mesure par les lymphocytes B. *IL10* est localisé sur le chromosome 1 en position 1q31-q32 et s'étend sur une région d'environ 5 kb. Il est exprimé principalement dans les cardiomyocytes, le foie, les ganglions cervicaux et les cellules CD34+. Son rôle est de stimuler la prolifération des lymphocytes B, des mastocytes et d'activer les récepteurs CD8 des cellules T. Il joue également un rôle important dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Les mutations codantes des récepteurs d'IL-10 sont associées à la colite ulcéreuse et à l'apparition précoce de la forme monogénique des maladies inflammatoires de l'intestin [57, 72, 73]. En outre, 3 polymorphismes (-1082, -819, -592) sur le promoteur du gène *IL10* ont été significativement associés au degré de calcification mesuré par spectrométrie d'absorption atomique chez 187 patients opérés pour SVAC [74].

Le gène *LDLR* (*low density lipoprotein receptor*) est localisé au niveau du locus 19p13.3. Il code pour une protéine mosaïque qui permet l'endocytose des particules de LDL. Il s'agit d'un récepteur cellulaire de surface qui reconnaît l'ApoB-100 incorporé dans la couche de phospholipides externe des particules de LDL. Ce récepteur peut également reconnaître l'ApoE. Ce gène est plus exprimé au niveau des adipocytes, des cellules épithéliales des bronches et des lymphocytes B. La fonction des récepteurs de LDL est de fixer et d'assurer la captation des LDL vers l'intérieur de la cellule. La diminution des récepteurs de LDL est directement impliquée dans le développement de l'athérosclérose due à l'accumulation des particules de LDL dans le sang et leur rétention dans les parois artérielles. En outre, le niveau de LDL cholestérol influence la progression des calcifications de la valve aortique. Cependant, il existe une interdépendance faible entre les lésions aortiques et les calcifications coronaires. [75].

Le gène *PCSK9* (*Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) est localisé dans la région 1p34-p32, il code pour une proprotéine convertase appartenant à la sous-famille de la protéinase K de la famille des subtilases sécrétoires. Cette protéine joue un rôle important dans l'homéostasie de LDL. *PCSK9* est exprimée dans le foie, l'épithélium intestinal, le rein et les neurones. Il serait impliqué dans la différenciation neurale et la régénération hépatique [76]. Chez l'humain, les mutations par gain de fonction de *PCSK9* sont rares et causent l'hypercholestérolémie et les maladies ischémiques. Une des formes autosomales dominantes de l'hypercholestérolémie familiale est due à ce type de mutation. Par contre, les mutations par perte de fonction comme la R46L sont associées à une diminution des taux plasmatiques de LDL-cholestérol donc protègent contre la maladie coronarienne [77, 78]. La protéine codée par *PCSK9* intervient dans l'homéostasie du cholestérol en causant la dégradation des récepteurs de LDL dans le lysosome.

Le gène *TNFAIP3* (*Tumor necrosis factor alpha induced protein 3*) a été identifié comme un gène dont l'expression est induite rapidement par le facteur de nécrose tumorale (TNF α). Il est localisé en région 6q23 et s'étend sur environ 4 kb (voir tableau 3). Ce gène

code pour une protéine aussi appelée A20 qui inhibe l'activation de NF-kappa B. Il joue un rôle de modulateur dans le risque de maladie coronarienne chez les diabétiques de type 2. Cet effet est médié par des différences dans l'expression d'A20 [79]. TNFAIP3 est exprimé dans la plupart des tissus mais son expression est plus marquée dans les cellules des muscles lisses. Il est associé à plusieurs maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé, le psoriasis et la maladie de Crohn [56, 80]

1.7.1.2.3. Gènes candidats impliqués dans les études fonctionnelles en rapport avec la pathogénie de la SVAC

Le gène *BMP2* (*bone morphogenetic protein 2*) est localisé sur le chromosome 20 en position 20 p12 et s'étend sur une région d'environ 12,6 kb. La protéine codée par ce gène appartient à la famille des facteurs de croissance TGF β . Celle-ci agit comme un homodimère à pont disulfure et induit la formation des os et du cartilage. Il est exprimé dans les cardiomyocytes et les cellules du muscle lisse. Cependant son expression est plus marquée dans les cellules thyroïdiennes. Cette expression est activée par TNF α , les lipides oxydés, l'hyperglycémie dans l'endothélium et les myofibroblastes vasculaires [62]. Une injection de BMP-2 dans l'aorte de souris, augmente l'expression de MSX2, active la voie de signalisation de Wnt et augmente la calcification au niveau de la media [61].

Le gène *CCR5* (*C-C chemokine receptor 5*) est localisé sur le chromosome 3 en position 3p21.31 et s'étend sur environ 6 kb. Il code pour un membre de la famille des récepteurs β des chémokines, un récepteur transmembranaire semblable à celui des récepteurs couplés des protéines G. Cette protéine est exprimée par les cellules du système immunitaire tant acquis qu'inné incluant les monocytes, les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les macrophages. C'est un important corécepteur pour le tropisme macrophagique des virus notamment le VIH. Les mutations dans ce gène ont été associées à la résistance au VIH. C'est également un récepteur pour RANTES, une chémokine pro-

inflammatoire exprimée dans les ostéoblastes [81]. Une délétion de 32 paires de bases dans l'intron ce gène a été associée à une augmentation de la calcification dans la valve aortique [18, 74].

Le gène *CTGF* (*connective tissue growth factor*) est localisé sur le locus 6q23.1 et s'étend sur environ 3 kb. La protéine codée par ce gène est un agent mitogène sécrété par les cellules endothéliales vasculaires. Il favorise la prolifération et la différenciation des chondrocytes ainsi que l'adhésion des cellules dans de nombreux types cellulaires tels que les fibroblastes, myofibroblastes, cellules endothéliales et épithéliales. Il augmente la synthèse de l'ADN induite par le facteur de croissance du fibroblaste (FGF). La mutation (-447G/C) dans ce gène est associée à une augmentation de la calcification dans les valves aortiques [18, 74].

Le gène *CTSS* (*cathepsin S*) est localisé sur le chromosome 1 en position 1q21. Il s'étend sur environ 36 kb et code pour une protéine membre de la famille des peptidases C1, la cathepsine S. Celle-ci est capable de fonctionner comme une élastase. Le gène *CTSS* est exprimé dans la grande majorité des cellules sanguines dont les monocytes et les myélocytes. *Helske et al.* ont observé une augmentation de l'expression de l'activité élastolytique de la cathepsine S dans les feuillets de valves aortiques calcifiées [58]. La cathepsine S accélère la dégradation de la matrice extracellulaire au niveau de la valve favorisant ainsi la progression de la sténose aortique.

Le gène *LRP5* (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 5*) code pour un récepteur transmembranaire des lipoprotéines de faible densité qui lie et internalise les ligands dans un processus d'endocytose dépendante des récepteurs. Il se situe sur le chromosome 11 en position 11q13.4 – 11q13.2 et s'étend sur une région d'environ 136 kb. Son expression se fait principalement dans le foie, le poumon et la thyroïde. Plusieurs études associent des mutations de *LRP5* à une réduction de la densité osseuse [82-84]. Les travaux de *Caira et al.* ont mis en évidence une surexpression du gène *LRP5* dans les

cellules de valves aortiques calcifiées [60]. Le gène *LRP5* se lie au complexe Wnt pour activer la transformation de fibroblastes en ostéoblastes favorisant ainsi la calcification des feuillets de valves aortiques [20] (cf. Fig5).

Le gène *MMP-9* (*matrix metalloproteinase 9*) est localisé sur le chromosome 20 en région 20q13-q11 et s'étend sur environ 8 kb (voir Tableau IV). Exprimé principalement au niveau des amygdales, des tissus lymphatiques, du thymus et de la moelle osseuse, ce gène code pour une métalloprotéinase matricielle capable de dégrader la matrice extracellulaire du tissu conjonctif. *MMP-9* joue un rôle dans la migration des leucocytes, la protéolyse locale de la matrice extracellulaire, la laminine de type V et du collagène de type IV, un constituant majeur de la membrane basale entourant chaque cellule du muscle lisse vasculaire. Il peut également jouer un rôle dans la résorption osseuse des ostéoclastes. Ce gène dégrade la fibronectine et l'élastine. Cette activité élastolytique est impliquée dans la rigidité artérielle et le développement des anévrismes. Ainsi, le gène *MMP9* est associé à la rigidité des grosses artères, l'anévrisme de l'aorte abdominale, l'anévrisme cérébral et la maladie coronarienne [85, 86]. Plusieurs études récemment publiées ont montré une surexpression de la *MMP-9* dans les cellules interstitielles de valves aortiques calcifiées in vitro chez l'humain [2, 20, 59].

Le gène *MSX2* (*muscle segment homeobox 2*) est localisé sur le chromosome 5 en position 5q32, il s'étend sur environ 6 kb. La protéine codée par ce gène est un activateur transcriptionnel dont l'activité normale permet d'établir l'équilibre entre la survie et l'apoptose des cellules. Cette protéine joue également un rôle dans la croissance des cellules. Dans les ostéoblastes, il supprime la transcription conduite par l'ostéocalcine. Le gène est principalement exprimé dans le muscle lisse, les cardiomyocytes et le placenta. *Msx2* augmente la différenciation ostéogénique par des mécanismes qui inhibent *Dkk1*, un antagoniste des récepteurs *Lrp5* et *LRP6* de Wnt (cf. Fig 5). C'est un facteur de transcription des ostéoblastes [62].

Le gène *SMPD1* (*sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal*) est localisé sur le chromosome 11 en position 11p15.4 – p15.1 et s'étend sur environ 4 kb. La protéine codée par ce gène est une sphingomyélinase acide lysosomiale qui convertit la sphingomyéline en céramide, un intermédiaire du catabolisme des sphingolipides. Son expression se fait dans de nombreux tissus dont le foie, le muscle lisse, les cardiomyocytes, la moelle osseuse, le cerveau et les adipocytes. Les mutations dans ce gène sont associées aux formes A et B de la maladie de Niemann-Pick [87]. Cette affection due à un déficit en sphingomyélinase acide lysosomiale, aboutit à une accumulation de sphingomyéline, puis du cholestérol dans les monocytes et les macrophages voire dans le cerveau. Les travaux d'*Ishii et al.* ont montré un gonflement des cellules musculaires lisses déficientes en SMDP1 provoquant ainsi une augmentation de l'épaisseur de l'intima et de la média dans les artères coronaires[88].

Le gène *WNT3* (*wingless-type MMTV integration site family, member 3*) est localisé sur le chromosome 17 en position 17p21-p21.32. Il s'étend sur une région environ 56 kb. *WNT3* appartient à une famille de facteurs de croissance qui assure la médiation des processus biologiques importants comme l'embryogenèse et l'organogenèse[82]. Ce gène code pour une des protéines de la voie de signalisation de Wnt. Cette voie est déterminante pour la différenciation ostéoblastique et l'entretien de la masse osseuse. La mieux caractérisée de ces voies est la voie canonique ou voie Wnt/ β -caténine qui est stimulée par les co-récepteurs LRP-5/6. Wnt/ β -caténine, agit en synergie avec BMP-2 pour promouvoir la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse in vivo [89]. Wnt peut également activer une voie non canonique incluant la protéine G qui sert de médiateur au complexe Wnt/calcium [90]. Il est également impliqué dans la calcification des valves aortiques grâce à la voie Wnt3/Lrp5/ β -caténine [20]. Il active la transformation des fibroblastes en ostéoblastes dans les feuillets de valves aortiques [16]. Wnt peut également réguler l'activité de Runx2. Les médiateurs nucléaires Lef1 et TCfs en aval de la voie canonique de Wnt se lient sur le domaine Runt et inhibent l'activation des facteurs de transcription du

gène *RUNX2*. [89]. Son expression se fait principalement dans les cardiomyocytes, les cellules du muscle lisse et le foie.

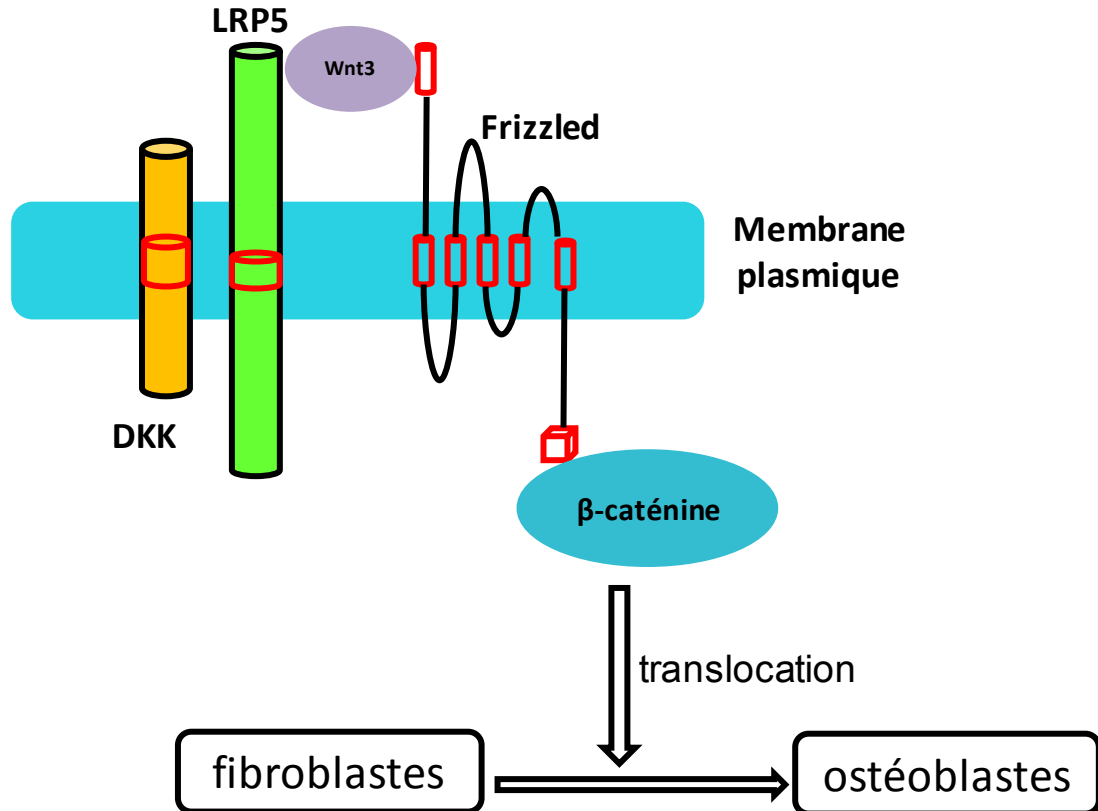


Figure 5: Régulation de l'ostéogenèse par la voie Wnt3/Lrp5/β-caténine

LRP5 se lie à Wnt3 une protéine de la famille de Wnt sécrétée par les ostéoblastes qui active le récepteur transmembranaire Frizzled. Ce complexe conduit à une stabilisation de la β-caténine ce qui permet sa translocation vers le noyau. LRP5 peut être inhibé par DKK (Dickkopf). Le complexe formé par ces molécules active la transformation des fibroblastes en ostéoblastes dans les feuillets de valves.

Tableau IV: Localisation chromosomique, nombre d'exons et longueur des différents gènes étudiés

Gènes	Locus	Exons	Longueur génomique (paires de bases)
<i>APOB</i>	2p24 - p23	29	42 645
<i>APOE</i>	19p13.2	4	3 695
<i>BMP2</i>	20p12	3	12 600
<i>CCR5</i>	3p21-31	2	6 065
<i>CTGF</i>	6q23.1	5	3 203
<i>CTSS</i>	1q21	8	35 883
<i>ESR1</i>	6q25.1	8	472 929
<i>IL10</i>	1q31 – q32	5	4 893
<i>LDLR</i>	19p13.3 – 19p13.2	18	44 450
<i>LRP5</i>	11q13.4 – 11q13.2	23	136 636
<i>MMP9</i>	20q11 – 2q13	13	7 654
<i>MSX2</i>	5q32	2	6 367
<i>PCSK9</i>	1p34 – 1p32	12	25 306
<i>PTH</i>	11p15.3 - p15.1	3	3 967
<i>SMPD1</i>	11p15.4 – p15.1	5	4 572
<i>TNFAIP3</i>	6q23	9	4432
<i>VDR</i>	12q13.11	11	63 495
<i>WNT3</i>	17p21 – 17p21.32	5	56 207

(Source : <http://www.genecards.org/> et <http://uswest.ensembl.org/index.html>)

Chapitre II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. LA COLLECTE DES DONNÉES

2.1.1. RECRUTEMENT DES PATIENTS

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'Institut de Cardiologie de Montréal et les patients ont tous signés un formulaire de consentement. La cohorte utilisée est composée de caucasiens dont 190 cas de SVAC de différentes sévérités et 192 témoins appariés selon l'âge et le sexe. Les patients ont été recrutés à la clinique d'échocardiographie par l'intermédiaire de la cohorte génétique hospitalière de l'Institut de Cardiologie de Montréal d'avril 2008 à octobre 2009. Les cas et les témoins ont été sélectionnés grâce aux données d'échocardiographie-Doppler. Les patients étaient contactés soit par téléphone, soit directement à la clinique d'échocardiographie. Le recrutement des cas et témoins s'est fait selon les critères suivants :

- **Critères d'inclusion des cas.**

Les patients âgés de plus de 18 ans avec un diagnostic de SVAC inscrit sur le rapport d'échocardiographie-Doppler (aire valvulaire aortique $< 2 \text{ cm}^2$, gradient moyen de pression $> 20 \text{ mmHg}$ et vitesse $> 2,5 \text{ m/s}$) ont été considérés comme cas.

- **Critères d'inclusion des témoins**

Les témoins étaient des patients de plus de 18 ans avec une fonction du ventricule gauche normale ou perturbée et/ou maladie coronarienne, sans diagnostic de SVAC inscrit sur le rapport d'échocardiographie-Doppler.

- **Critères d'exclusion des cas et des témoins**

Dans le but de conserver uniquement les patients souffrant de SVAC d'origine dégénérative et donc d'uniformiser le phénotype de notre cohorte, nous avons exclu tous les patients présentant des critères de SVAC à l'échocardiographie-Doppler avec une notion de fièvre rhumatismale ou de bicuspidie inscrit dans le dossier médical.

Nous avons également exclus tous les patients souffrant de :

- Maladie de Paget de l'os

La maladie de Paget de l'os provoque un remodelage osseux important par une augmentation de l'activité des ostéoclastes.

- Hyperparathyroïdie

L'hyperparathyroïdie provoque une augmentation de la calcémie et favorise également le remodelage osseux.

- Lupus érythémateux disséminé

Le lupus érythémateux disséminé est une affection auto-immune caractérisée par une perte du contrôle des lymphocytes B, provoque une augmentation des phénomènes inflammatoires.

- Insuffisance rénale avec taux de créatinine $\geq 200 \mu\text{mol/l}$ au moment du recrutement.

L'insuffisance rénale provoque une altération de la filtration glomérulaire avec des conséquences telles que les troubles du métabolisme phosphocalcique.

2.1.2. *DONNÉES CLINIQUES ET ÉCHOCARDIOGRAPHIQUES*

Les paramètres échocardiographiques suivants ont été recueillis à partir des dossiers médicaux des patients: la surface valvulaire aortique, le gradient moyen de pression, le jet de vélocité, l'épaisseur du septum interventriculaire et de la paroi postérieure, la masse indexée au ventricule gauche et finalement le degré de sévérité de la régurgitation aortique. Les variables biométriques les plus récentes à savoir : la glycémie à jeun, la créatinine sanguine, les triglycérides, le LDL cholestérol, le HDL cholestérol et le cholestérol total ont été également recueillies. Les données cliniques et génétiques étaient stockées dans des bases de données sécurisées et anonymisées accessible exclusivement aux principaux chercheurs de l'étude. Aucune information génétique n'était accessible aux participants de l'étude.

2.1.3. LES ÉCHANTILLONS SANGUINS

Les échantillons recueillis pour la cohorte hospitalière de l'ICM servent à constituer non seulement une banque d'ADN mais aussi de plasma, des cellules leuco-plaquettaires (*Buffy coat*) et d'érythrocytes qui seront congelés et conservés à -80°C pour une utilisation ultérieure. Pour l'isolation de l'ADN génomique, un échantillon de sang a été prélevé sous EDTA comme anticoagulant. Le sang a été centrifugé à 1900 g pendant 15 minutes et la couche leuco-plaquettaire (*Buffy coat*) a été prélevée.

L'ADN est extrait des cellules mononuclées du sang avec le kit Qiagen (QiAamp DNA mini) selon les instructions du manufacturier.

2.2. LE GENOTYPAGE

Pour ce projet, nous avons effectué le génotypage par la plateforme de SEQUENOM qui est une méthode semi-automatisée. Cette technique identifie les allèles à la position du SNP d'intérêt basé sur le principe d'élongation d'amorces d'ADN adjacentes au polymorphisme à la suite d'une amplification de la région ciblée. Pour fonctionner, la plateforme SEQUENOM utilise un format de plaques capable de contenir 384 ADN, et des groupes de test multiplexés pouvant contenir de 1 à 38 oligonucléotides d'élongation spécifique aux marqueurs sélectionnés. Cette plateforme permet d'évaluer facilement des dizaines de SNPs dans un grand nombre d'individus.

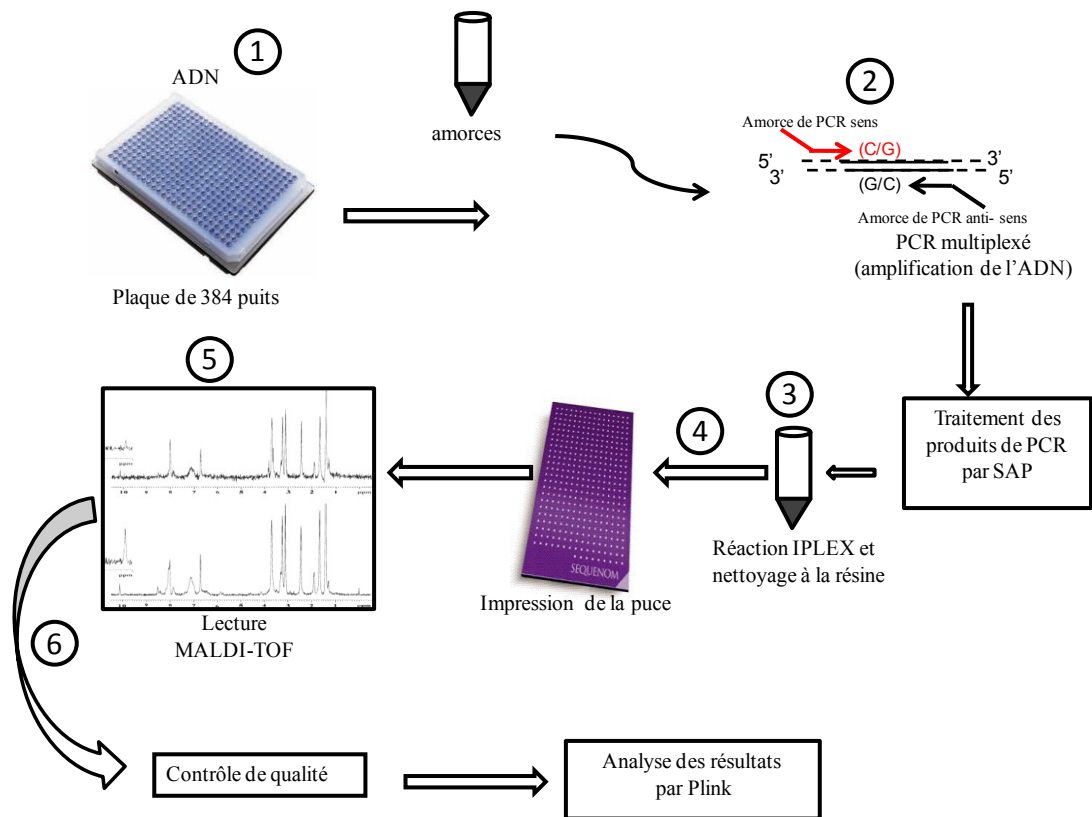


Figure 6: Description sommaire des étapes du génotypage par SEQUENOM

1) Réception, ajustement des amorces et préparation des plaques d'ADN pour la réaction de PCR. 2) Amplification des régions d'intérêt par PCR puis traitement par la SAP pour déphosphoryler et neutraliser les dNTP non incorporés dans la réaction. 3) La réaction d'élongation (IPLEX) suivie d'un nettoyage à la résine pour éliminer les sels contaminants. 4) Transfert de la plaque 384 vers la micropuce à l'aide du Nanodispenseur MassARRAY puis impression. 5) Lecture de la micropuce par MALDI-TOF. 6) Extraction des fichiers de SEQUENOM, contrôle de qualité et enfin analyse par PLINK.

La technique de génotypage par la plateforme SEQUENOM utilise la réaction de polymérisation en chaîne pour amplifier un fragment d'ADN spécifique à chaque marqueur qui sera ensuite hybridé à une amorce d'élongation spécifique au SNP d'intérêt (cf. figure 6). Les produits finaux d'élongation sont déposés sur une micropuce et la lecture des produits d'élongation spécifique à chaque allèle des SNP d'intérêt est réalisée par séparation des produits d'élongation et leurs différentes masses sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight*) après ionisation au laser. Plus spécifiquement, les différentes étapes du protocole de génotypage de ce projet sont décrites en détail ci-dessous.

2.2.1. Sélection des SNP

Les SNP utilisés pour le génotypage ont été choisis de 3 façons :

- Premièrement, nous avons sélectionné tous les SNP associés à la SVAC dans les études cas/témoins publiées précédemment comme présentés dans le Tableau V.

Tableau V: SNP associés à la SVAC dans les études d'association précédentes ainsi que les types de population étudiés.

SNP	Gènes	Type de population	référence
rs693	<i>APOB</i>	Brésilienne	<i>Avakian et al.</i> [52]
rs6254	<i>PTH</i>	Caucasienne	<i>Schmitz et al.</i> [43]
rs7412	<i>APOE</i>	Brésilienne	<i>Avakian et al.</i> [52]
rs429358	<i>APOE</i>	Américaine, donc 85% caucasienne	<i>Navaro et al.</i> [44]
rs1544410	<i>VDR</i>	Allemande	<i>Ortlepp et al.</i> [45]
rs8179176	<i>ESR1</i>	Suédoise (femmes ménopausées)	<i>Nordstrom et al.</i> [46]

- Deuxièmement, nous avons sélectionnés des SNP associés à l'inflammation ou au métabolisme des lipides rapportés par des études d'associations pangénomiques. Il s'agit des marqueurs suivants présentés dans le tableau VI.

Tableau VI: SNP identifiés dans le métabolisme lipidique et dans l'inflammation par les études d'associations pangénomiques

Mécanisme	SNP	Gène	Maladie	Référence
Métabolisme des lipides	rs11591147	<i>PCSK9</i>	Maladie coronarienne	<i>Kathiresan et al.</i> [55]
	rs6711720	<i>LDLR</i>	Maladie coronarienne	<i>Kathiresan et al.</i> [55]
Processus inflammatoire	rs2230926	<i>TNFAIP3</i>	Lupus érythémateux disséminé	<i>Shimane et al.</i> [56]
	rs3024505	<i>IL10</i>	Colite ulcéreuse	<i>Franke et al.</i> [57]

- Enfin, le dernier groupe de SNP a été choisi dans certains gènes identifiés lors des études fonctionnelles sur la SVAC dans des modèles animaux. Pour ce faire, nous avons utilisé des «*tagSNP*» comme décrit plus haut. La méthode de *tagging* direct ou *pairwise* du logiciel Haploview 4.1 a été utilisée dans ce volet [91]. Cette méthode consiste à marquer une région assez large du génome en utilisant un sous-ensemble des SNP dans la région tout en acceptant de perdre de l'information. Chaque SNP est marqué directement par un autre dans la région qui constitue son «*tagSNP*» [33]. Tous les SNP choisis dans ce dernier groupe avaient une fréquence d'allèle mineure minimale de 0,1 et chaque SNP était corrélé à son SNP marqueur à un coefficient de corrélation (r^2) d'au moins 0,7 dans la région ciblée selon la base de données HapMap phase II (novembre 2008) dans Haploview 4.1. Dans ce projet, la région chromosomique ciblée est définie par le locus agrandi de 20 kilobases de part et d'autres du gène afin de capturer toute la variabilité autour du gène.

2.2.2. Conception des «pools»

Le génotypage par SEQUENOM se fait par groupe de SNP multiplexés. Chaque groupe peut contenir au maximum 38 SNP. Étant donné que nous avons sélectionné 89 SNP, il nous a été nécessaire de constituer plusieurs groupes de SNP afin de tenter de génotyper une majorité des SNP identifiés. Les étapes utilisées pour la conception des groupes sont décrites ci-dessous:

- La recherche des séquences autour des SNP

Afin de définir les amorces nécessaires à l'amplification et l'élongation des SNPs d'intérêt, les logiciels de conception requièrent environ 200 paires de bases de séquence d'ADN entourant ceux-ci. La recherche des séquences autour des SNP d'intérêt a été faite à l'aide la base de données dbSNP de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Cette base de données contient la séquence de part et d'autre du SNP d'intérêt dans un format appelé séquence *FASTA*. Les séquences sont ensuite transformées dans le format spécifique nécessaire au logiciel de conception par un algorithme développé dans le laboratoire. Pour chaque SNP, la séquence *FASTA* modifiée commence par le nom du SNP suivi d'une première séquence de 200 paires de bases suivie des allèles du SNP d'intérêt à l'intérieur des crochets et séparés par une barre oblique et finissant par une deuxième séquence de 200 paires de bases comme présentée dans la figure 7.

```
rs6254<tab>ACGT.....AGTCTTC [A/G] ACGT.....AGT
```

Figure 7: Exemple de séquence FASTA modifiée

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6254

Lors de la conception des amorces de PCR, il est important de considérer la formation de dimères d'amorce non spécifiques. Cela est particulièrement important pour les réactions multiplexées. Les logiciels *ProxSNP*, *Prextend*, *Assay design* conçus par SEQUENOM

favorisent une conception optimale d'essais multiplexés en rejetant les dimères d'amorces suivant les étapes décrites ci-dessous.

- *La mise en évidence des SNP proximaux autour du SNP d'intérêt*

Les SNP proximaux près des SNP d'intérêt sont identifiés par un code afin qu'ils soient évités lors de la conception des amorces de PCR et d'élongation. Cette étape se fait par le logiciel *ProxSNP* de SEQUENOM. On retrouve dans le fichier de sortie tous les SNP localisés dans les environs d'un SNP d'intérêt. Le fichier de sortie est ensuite transféré au logiciel *Prextend* pour la suite des étapes de conception.

- *La conception et l'alignement des amorces de PCR*

À la suite de la mise en évidence des SNP proximaux autour du SNP d'intérêt, les fichiers sont alignés avec de la séquence du génome de référence afin de mieux déterminer l'emplacement des amorces de PCR optimales. Le logiciel *Prextend* évalue la formation potentielle de dimères d'amorces de PCR. Ces amorces sont aussi comparées au génome de référence pour valider le fait qu'un seul produit d'amplification spécifique sera conçu où l'amorce d'extension a le potentiel de s'hybrider. Les amorces potentielles d'amplification sont présentées en lettres majuscules dans la séquence de sortie après le formatage par le logiciel. Le fichier de sortie pourra être utilisé pour la conception des tests.

- *L'évaluation de la compatibilité et calcul des poids moléculaires des amorces*

La conception finale de toutes les séquences des amorces de PCR optimales est effectuée par le logiciel *Assay design*. Ce logiciel évalue la compatibilité des amorces "sens" et "antisens" de PCR et celle d'élongation de chaque SNP. Il calcule également les poids moléculaires de telle sorte que toutes les amorces et produits d'élongation peuvent être résolus par le spectromètre de masse. Le fichier ainsi généré sera importé dans la plateforme SEQUENOM afin de définir les paramètres de lecture du spectromètre de masse. Deux fichiers de sortie sont ainsi fournis :

(1) Un fichier Excel contenant l'information des séquences des amorces, les groupes d'essais multiplexés, les séquences des amorces d'élongation, et les poids moléculaires attendus pour ces dernières et leurs produits d'extensions spécifiques au SNP testés.

(2) Un fichier texte comprenant le rapport des échecs de conception des essais et les raisons de ces échecs.

Cette étape aide à standardiser les amorces de telle sorte qu'elles puissent servir plus efficacement dans l'essai multiplexé. La suite de logiciels de SEQUENOM nous a ainsi permis d'obtenir trois groupes de SNP composés respectivement de 35, 34 et 20 SNP.

Après l'analyse finale des SNP, trois amorces ont été commandées pour chaque SNP: les amorces « sens » et « antisens » de PCR et une amorce d'élongation.

2.2.3. Technique de génotypage

La détection des allèles de chaque polymorphisme (SNP) est basée sur la résolution des différents produits d'élongation, générée pour ceux-ci sur le spectromètre de masse (MALDI-TOF) de la plateforme de génotypage de Sequenom. Elle a été effectuée au laboratoire de génétique et médecine génomique en inflammation de l'Institut de cardiologie de Montréal (<http://www.inflammgen.org>). Les étapes de cette technique sont décrites ci-dessous.

2.2.3.1. Ajustement des amorces

Les amorces ont été diluées à une concentration de 1000 μM dans les tampons d'amorces puis les amorces d'élongation de PCR ont été resuspendues à 100 μM . En premier lieu, les amorces d'extension ont été classées en 3 groupes d'après leur masse : petite, moyenne et grande. Puis, elles ont été respectivement diluées dans du 0.1X TE (trishydroxyméthylaminométhane + EDTA) à des concentrations de 7 μM , 10 μM et 17 μM en fonction des groupes.

La concentration des amorces dans les réactions d'extension est ajustée afin de s'assurer que les amorces soient d'intensités équivalentes. Pour ce faire, après un premier test sur le spectromètre de masse, le logiciel d'analyse de MassARRAY crée un rapport qui identifie les amorces dont la concentration doit être ajustée dans le "pool" d'amorce multiplexé en fonction des pics d'intensité sur le spectre de masse. Basé sur ce rapport, il s'ensuit un ajustement des concentrations des amorces d'élongation.

2.2.3.2. Amplification par PCR

La PCR est une méthode permettant la multiplication par cycles séquentiels de dénaturation, hybridation et d'extension d'une courte séquence d'ADN appelée séquence cible, à partir d'une fine quantité d'ADN génomique. Pour ce projet, nous avons utilisé le kit *iPlex Gold Reagent* de SEQUENOM (H₂O, tampon de PCR 10 fois concentré, MgCl₂ 25 mM, dNTP 25 mM, polymérase type HotStar Taq 5 U/μl et de l'ADN à 5 ng/μl) . 3 μL du cocktail a été ajouté à chaque puits d'une plaque de 384 puits contenant de l'ADN génomique à une quantité globale de 2 μL. Le cocktail de PCR est calculé pour avoir un excédent afin de palier aux problèmes de manques qui pourraient survenir lors de l'utilisation des robots. La composition de la réaction de PCR est présentée dans le tableau VII. Cette réaction de PCR a été effectuée en plusieurs cycles. La première étape de la PCR a été effectuée à 94°C pendant 5 min pour la dénaturation initiale. Puis il s'en est suivi une série de 45 cycles de PCR selon la procédure suivante :

- Une phase de dénaturation à 94°C pendant 20 secondes
- Une phase d'hybridation et d'appariement des amorces à 56°C pendant 30 secondes
- Une phase d'élongation à 72°C pendant 1 minute.

Après ces cycles, il s'en est suivi une phase d'élongation finale à 72°C pendant 3 minutes.

Tableau VII: Composition de la réaction de PCR

Réactifs	Volume (μL)/puits	Volume 384 puits (μL)
Eau	0,9	450
Tampon PCR 10 X	0,5	250
MgCl ₂ 25 mM	0,4	200
dNTP mix (25 mM chaque)	0,1	50
Amorce mix (500 nM chaque)	1	500
HotStar Taq polymerase (5 U/ μL)	0,1	50
ADN (5 ng/ μL)	2,0	
Total	5,0	1500

2.2.3.3. Le traitement des amplicons par Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)

Cette réaction a pour but de déphosphoryler et neutraliser les amorces de PCR non-utilisées et les dNTP non incorporés dans la réaction d'amplification pour empêcher qu'ils ne gênent à la réaction d'élongation. La composition de la réaction de déphosphorylation est détaillée dans le tableau VIII. La plaque de 384 puits est ensuite incubée à 37°C pendant 20 minutes puis 85°C pendant 5 minutes.

Tableau VIII: Composition de la réaction de SAP

Réactif	Volume / puits (μl)	Volume 384 puits	Volume 3 plaques
Eau	1,55	811	2433
Tampon SAP 10X	0,17	90	270
Enzyme SAP	0,3	159	477
Total	2,0	1060	3180

2.2.3.4. *La réaction d'élongation des amorces*

Les étapes de la réaction d'élongation ont été effectuées sur les mêmes microplaques de 384 puits. La composition de cette réaction est présentée dans le tableau IX. Elle consiste en une élongation d'une amorce spécifique en ajoutant une base. Cette base dépend des allèles du SNP présents chez chaque individu. L'étape d'élongation fait l'utilisation de bases modifiées bloquant toute élongation additionnelle au-delà des allèles du SNP d'intérêt. L'amorce s'hybride à la séquence nucléotidique adjacente au SNP puis s'allonge en ajoutant un nucléotide supplémentaire. Puisque chaque base ajoutée possède un poids moléculaire qui lui est spécifique, ceci permet au logiciel d'analyse de donner la masse correspondant à chaque allèle d'un SNP.

Les produits ont été ensuite nettoyés à l'aide d'une résine échangeuse d'ions, pour éliminer les sels contaminants, puis transférés de la microplaque de 384 puits vers une micropuce en silicone.

Tableau IX: Composition de la réaction iPLEX

Réactif	Volume (µL)/puits	Volume (µL) / 384 puits
Eau	0,76	445
Tampon iPLEX 10X	0,2	115
iPLEX terminaison mix	0,2	115
Amorce iPLEX (7-17 uM chaque)	0,8	462
Enzyme iPLEX	0,04	23
Total	2,0	1160

2.2.3.5. Spectrophotomètre de masse (MALDI-TOF MS)

La lecture de la micropuce ou *SpectroCHIP* de SEQUENOM contenant les produits d'élongation est effectuée sur le spectrophotomètre de masse (MALDI-TOF/MS). Cette micropuce peut supporter jusqu'à 384 échantillons sur ses 384 points de dépôt. Le spectrophotomètre de masse propose une façon rapide d'obtenir des génotypes des SNP. Cette technologie permet d'analyser les polymorphismes nucléotides simples bi-alléliques. La méthode fait intervenir un laser qui cible chaque point de dépôt et fait feu sur eux, ionisant ainsi les molécules des produits d'extension qui migrent sous vide sur la colonne du spectromètre de masse. Pour être bien résolus sur le spectre de masse, les produits d'extension doivent être bien intercalés et séparés selon leur poids moléculaire. Comme chaque molécule a sa propre masse, chaque allèle d'un SNP peut être déterminé en se basant sur sa vitesse, soit par son temps d'envol. Le logiciel *Typer Analyzer* du groupe des logiciels *MassArray typer* de SEQUENOM version 3.3 permet de prendre plusieurs acquisitions et d'utiliser la meilleure pour déterminer le génotype du SNP. Le fichier de données généré par le spectromètre de masse est ensuite transformé dans un format compatible au logiciel PLINK, un logiciel de manipulation et d'analyse de données génétiques.

2.3. ANALYSES STATISTIQUES

2.3.1. Les variables cliniques et biométriques

L'analyse des paramètres échocardiographiques et biométriques a été effectuée dans le logiciel SPSS, version 17 (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Cette analyse avait pour but d'attester l'appariement des variables dans les deux groupes : cas et témoins. Toutes les variables continues ont été vérifiées par le test de Shapiro-Wilk pour s'assurer de la normalité de leur distribution [92]. Une inspection visuelle de la forme de la distribution a été aussi faite par un graphique quantile-quantile. Pour les variables avec distribution normale, les moyennes ont été comparées par un test *t* de Student pour échantillons

indépendants avec hypothèse de variances égales. Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les médianes des variables avec une distribution déviant de la normale.

Pour les variables dichotomiques telles que le sexe, la présence ou l'absence d'hypertension artérielle, la dyslipidémie et le tabagisme, les proportions ont été comparées par un test du khi-carré de Pearson en tenant compte de l'effectif théorique minimum par cellules. Le niveau de signification est de $p \leq 0,05$.

2.3.2. *Le contrôle de qualité*

Avant de procéder aux analyses d'association, nous avons effectué un contrôle de qualité des données du génotypage. Ce procédé de filtrage est une étape importante dans les études génétiques pour minimiser les faux résultats potentiels et maximiser la puissance. Pour ce faire, le pourcentage de génotypage des SNP et des ADN ainsi que la conformité avec l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été évalués à l'aide du logiciel PLINK version 2 [93]. Tous les SNP et ADN avec un pourcentage de valeurs manquantes de moins de 10% et une valeur $p > 0,03$ au Hardy-Weinberg étaient considérés comme ayant été génotypés avec succès. Les SNP et les ADN ayant répondu à ces critères d'évaluation étaient ensuite retenus pour l'analyse.

Le contrôle de qualité a été effectué selon les étapes suivantes :

Stade 0 : Tous les SNP et les ADN ont été soumis au contrôle de qualité sans critères particuliers. Ceci a été fait pour vérifier que tous les marqueurs avaient été génotypés.

Stade 1 : Tous les SNP avec moins de 50% de génotypage sont enlevés.

Stade 2 : Tous les individus avec moins de 50% de génotypage sont exclus.

Stade 3 : Les SNP et les ADN avec moins de 90% de génotypage sont retirés.

Ces premières étapes sont effectuées pour exclure de l'analyse tous les marqueurs et les ADN qui n'ont pas amplifié.

Stade 5 : Nous avons vérifié le statut du marqueur amplifié (mono ou hétérozygote) avec l'équilibre de Hardy-Weinberg ($p > 0,03$) pour permettre de valider les résultats du génotypage.

2.3.3. *Les tests d'associations*

Les fréquences alléliques aux marqueurs de chaque locus ont été testées pour une différence entre les groupes cas et témoins par un test d'association au khi-carré tel qu'incorporé dans le logiciel PLINK version 2 [93]. Ce logiciel libre est disponible gratuitement sur internet à l'adresse suivante : <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>. Il permet la manipulation et l'analyse des données de génotypage.

Le khi-carré évalue la divergence des fréquences observées par rapport à une hypothèse nulle stipulant que la fréquence allélique est la même entre les cas et les témoins. Le résultat est retourné sous forme d'une valeur de p .

La cohorte étudiée était constituée essentiellement de personnes âgées recrutées à la clinique d'échocardiographie. La plupart de ces personnes avaient un risque potentiel de maladie coronarienne. Il est donc possible que la méthode de recrutement ait induit un biais de sélection en faveur de la maladie coronarienne chez les témoins. De plus, la SVAC est une pathologie à prédominance masculine. Dans le but de maximiser la puissance tout en palliant aux biais de sélection et aux facteurs confondants dans l'étude, nous avons décidé de tenir compte de ces deux paramètres dans nos analyses génétiques. Pour ce faire, nous avons effectué des tests de régression logistique suivant un modèle additif en prenant comme co-variable le sexe et la maladie coronarienne. Cette dernière analyse de régression logistique est celle qui a été finalement retenue.

Puisque nous avons effectué plusieurs analyses statistiques à cause du nombre de SNPs testés, une correction pour tests multiples semblait nécessaire dans notre étude. Le fait d'effectuer une multitude de tests augmente le risque de voir apparaître au moins une fausse association : c'est l'erreur de type 1 ou alpha. Une correction classique fréquemment utilisée pour contrôler cette erreur est celle de Bonferroni. Elle consiste à diviser la valeur du seuil de significativité p par le nombre de tests indépendants effectués, ici le nombre de marqueurs. Cependant, certains SNP choisis dans les loci identifiés pour cette étude étaient corrélés les uns aux autres. La méthode de Bonferroni était donc inappropriée puisqu'elle est trop conservatrice, ne tenant pas compte du déséquilibre de liaison entre les marqueurs.

L'approche la plus rigoureuse et pratique pour confirmer nos résultats est celle des tests de permutation. Cette méthode consiste à effectuer des permutations cas/témoins en gardant fixe le nombre d'individus par groupe. Elle crée une distribution empirique qui tient compte du déséquilibre de liaison, permettant d'obtenir une valeur de p corrigée. Pour notre étude, une série de 1000 permutations a été créée par assignation au hasard des statuts cas/témoins.

Chapitre III : RÉSULTATS

3.1. ANALYSE DES DONNÉES DU RECRUTEMENT

3.1.1. Caractéristiques cliniques des patients

Au total, 190 cas de SVAC de différentes sévérités et 192 témoins ont été enrôlés dans le projet. La cohorte de patients est faite uniquement de caucasiens dont 80% de canadiens de descendance française. Environ 32% des patients souffrant de SVAC ont eu un remplacement valvulaire aortique. Les caractéristiques cliniques des patients sont décrites dans le tableau X. En dehors de la notion de tabagisme, tous les paramètres analysés dans ce tableau ont été recueillis dans les dossiers médicaux des patients. De plus, les patients pour lesquels il était mentionné dans le dossier médical un angor traité, un infarctus du myocarde, une angioplastie ou un pontage coronarien, étaient classés comme souffrant de maladie coronarienne.

Tableau X: Comparaison des facteurs de risque dans les groupes étudiés

Variables	Cas	Témoins	P
Âge au moment du recrutement (années)	73,2 ± 7,2	68,7 ± 8,0	< 0,001
Sexe	Femmes	55 (28,6%)	0,05
	Hommes	137 (71,4%)	
Antécédents de tabagisme	122 (64,2%)	133 (69,2%)	0.29
Hypertension artérielle	135 (71,0%)	132 (68,7%)	0.62
Diabète	51 (26,8%)	50 (26,0%)	0.95
Dyslipidémie	163 (85,7%)	142 (73,9%)	0.01
Tour de taille (cm)	100,6 ± 13,1	100,0 ± 13,9	0.67
Maladie coronarienne	93(48,9%)	117 (60,9%)	0.02
Utilisation de statines	152 (80,0%)	153 (79,7%)	0,74

L'âge moyen chez les cas est 73,2 ± 7,2 années tandis que celui des témoins est de 68,7 ± 8,0 années (p< 0.001). Environ 86% des patients avec SVAC ont déclaré souffrir de dyslipidémie, contre 74% chez les témoins (p=0,01). Cependant, 49% des patients avec

SVAC souffrent de maladie coronarienne contre 61% pour les patients sans SVAC ($p=0.02$). Par contre, la proportion de patients utilisant les statines est sensiblement la même dans les deux groupes (80%).

3.1.2. Étude des variables échocardiographiques

La comparaison des moyennes des paramètres d'échocardiographies montre une différence significative entre les deux groupes. L'aire valvulaire aortique moyenne des patients avec SVAC est de $1,0 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ tandis que celle des patients sans SVAC est plus grande avec une moyenne de $2,8 \pm 0,6 \text{ cm}^2$ ($p<0.001$). En moyenne, le gradient moyen de pression, le jet de vélocité, la masse du ventricule gauche, le septum inter-ventriculaire et la paroi postérieure du ventricule gauche sont plus élevés chez les cas en comparaison des témoins ($p<0,05$). L'étude des variables échocardiographiques est présentée dans le tableau XI.

Tableau XI: Comparaison des moyennes et médianes des variables échocardiographiques entre les deux groupes

Variables	Cas		Témoins		p
	M \pm ds	m	M \pm ds	m	
Aire valvulaire aortique (cm^2)	1,02 \pm 0,33	0,98	2,8 \pm 0,6	2,75	<0.001*
Gradient moyen de pression (mm Hg)	36,7 \pm 19,1	32,0	5,7 \pm 2,2	6,0	<0.001*
Vélocité (m/s)	3,75 \pm 0,96	3,68	1,31 \pm 0,25	1,30	<0.001*
Masse du ventricule gauche (g/m^2)	112,5 \pm 33,6	107,0	104,6 \pm 34,2	98,0	0.02
Septum inter-ventriculaire (mm)	12,1 \pm 2,5	12,0	11,0 \pm 2,2	11,0	<0.001
Paroi postérieure (mm)	11,4 \pm 2,1	11,0	10,0 \pm 1,7	10,0	<0.001

* : comparaison des cas et témoins par la méthode de Wilcoxon

M : moyenne; m : médiane; ds : déviation standard (écart-type)

3.1.3. Étude des variables biométriques

L'analyse des paramètres biométriques des deux populations montre une différence statistiquement significative des concentrations moyennes lipidiques suivantes : LDL, HDL et cholestérol total. Celles-ci sont plus élevées chez les cas en comparaison des témoins (cf. tableau XII). De plus en comparant les médianes et les moyennes dans les groupes cas et témoins, nous constatons qu'elles sont différentes pour certaines variables comme la glycémie. Cette disparité entre les médianes et les moyennes traduit le caractère asymétrique de la distribution des observations autour des moyennes des différents paramètres biométriques.

Tableau XII: Comparaison des moyennes et médianes des variables biométriques entre les deux groupes

Variables	Cas		Témoins		p
	M± ds	m	M± ds	m	
Glycémie à jeun (mmol/l)	5,86 ± 1,13	5,60	6,02± 1,36	5,60	0,21
Créatinémie (µmol/l)	98,0 ± 28,9	94,0	96,5 ± 31,5	92,0	0,61
triglycérides (mmol./l)	1,47 ± 0,72	1,45	1,44± 0,84	1,36	0,77
LDL cholestérol (mmol/l)	2,49 ± 0,85	2,48	2,21 ± 0,99	2,07	0,004*
HDL cholestérol (mmol/l)	1,23 ± 0,33	1,22	1,15 ± 0,31	1,11	0,01
Cholestérol total (mmol/l)	4,29 ± 0,99	4,28	3,99 ± 0,12	3,83	0,005

* : comparaison par la méthode de Wilcoxon

M : moyenne, m : médiane, ds : déviation standard (écart-type)

3.2. RÉSULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES

3.2.1. Résultats du contrôle de qualité

Le contrôle de qualité avait pour objectif d'exclure de l'analyse tous les SNP et ADN dont les résultats du génotypage n'étaient pas satisfaisants selon les critères définis. Les résultats du contrôle de qualité sont illustrés en détail dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Résultats du contrôle de qualité des variants testés

Stade	Méthode	SNP	ADN	% de génotypage	Retrait	
					SNP	ADN
Stade 0	Résultats brut du génotypage	89	382	-	0	0
Stade 1	Élimine tous les SNP avec moins de 50% de génotypage	85	382	94	4	0
Stade 2	Élimine tous les ADN avec moins de 50% de génotypage	85	382	98,5	0	0
Stade 3	Élimine tous les SNP et les ADN avec moins de 90% de génotypage	81	379	98,6	4	3
Stade 4	Vérification de la conformité avec l'équilibre de Hardy Weinberg	81	379	99,6	0	0

Au final, 81 SNP et 3 ADN (1 cas et 2 témoins) ont été retirés lors du nettoyage des données. Ceci donne un résultat de 379 ADN (189 cas et 190 témoins) et 81 SNP avec un pourcentage de génotypage de 99,6%. Le retrait de ces individus de la cohorte n'a pas affecté les résultats des analyses statistiques dans la section clinique. Les résultats présentés ci-dessous ont été effectués sur les 81 SNP qui ont réussi au contrôle de qualité.

3.2.2. SNP associés à la SVAC après un test du khi-carré

En partant de l'hypothèse selon laquelle les fréquences alléliques des marqueurs étudiés sont les mêmes entre les deux groupes cas et témoins, nous avons comparé de façon empirique ces fréquences à l'aide d'un test de khi-carré. Ce test nous a permis d'observer la distribution aléatoire des fréquences dans les deux groupes (voir tableau en annexe).

Les résultats de cette comparaison présentés dans le tableau XIV ont montré que les SNP rs115947 (OR = 5,16 [1,12 – 23,73]; p = 0,019), rs4930573 (OR = 1,46 [1,05 – 2,02]; p = 0,023) et rs235737 (OR = 1,56 [1,15 – 2,11]; p = 0,004) respectivement dans les locus *PCSK9*, *LRP5* et *BMP2* sont associés à une augmentation du risque de SVAC.

Tableau XIV: SNP associés à la SVAC après un test du khi-carré

SNP	rs11591147	rs4930573	rs235737
Chromosome	1	11	20
Locus	<i>PCSK9</i>	<i>LRP5</i>	<i>BMP2</i>
Position	55278235 exonique	67920032 intronique	6725913 intergénique
Allèle majeur	G	C	G
Allèle mineur	T	G	A
MAF (cas)	0,02	0,3	0,39
MAF (témoins)	0,005	0,23	0,29
OR (IC 95%)	5,16 (1,12 – 23,73)	1,46 (1,05 – 2,02)	1,56 (1,15 – 2,11)
p nominale	0,019	0,023	0,004

3.2.3. SNP associés à la SVAC après ajustement pour le sexe

La SVAC étant une pathologie à prédominance masculine nous avons fait dans une seconde analyse, une régression logistique suivant un modèle additif en ajustant pour cette variable. Les résultats de cette analyse présentés dans le tableau XV montre que l'allèle mineure du SNP rs4930573 (OR = 1,43 [1,04 – 1,96]; p = 0,029) dans le locus LRP5 de même que celui du SNP rs235737 (OR = 1,53 [1,14 – 2,08] ; p = 0,005) du locus BMP2 restent associés à une augmentation du risque de la SVAC comme ceux du tableau XIV.

Tableau XV: SNP associés à la SVAC après ajustement pour le sexe

SNP	rs4930573	rs235737
Chromosome	11	20
Locus	<i>LRP5</i>	<i>BMP2</i>
Position	67920032	6725913
	intronique	intergenique
Allèle majeur	C	G
Allèle mineur	G	A
MAF (cas)	0,3	0,39
MAF (témoins)	0,23	0,29
OR (IC95%)	1,43 (1,04 – 1,96)	1,53 (1,14 – 2,08)
p nominale	0,029	0,005

De même, un ajustement pour l'âge a donné des résultats similaires à ceux présentés dans le tableau XV. Ainsi pour éviter une redondance dans les résultats, nous ne l'avons pas présenté dans ce travail.

3.2.4. SNP associés à la SVAC après ajustement pour la maladie coronarienne

À la suite de l'analyse des données cliniques, nous avons observé que la population d'étude était enrichie chez les témoins de maladie coronarienne. Ceci est probablement attribuable à la méthode employée pour recruter tant les cas que les témoins. Les cas et les témoins ont été recrutés à la clinique d'échocardiographie. L'idéal aurait peut-être été de recruter les témoins du même groupe d'âge dans la population générale. Dans le but de prendre en compte ce biais de sélection, un ajustement pour cette variable nous semblait nécessaire. Pour cette dernière analyse, le test le plus approprié retenu pour l'interprétation de nos résultats a été également la régression logistique selon un modèle additif en prenant comme co-variable la maladie coronarienne.

Tableau XVI: Résultats des SNP associés à la SVAC après ajustement pour la maladie coronarienne

SNP	rs4930573	rs235737
Chromosome	11	20
Locus	<i>LRP5</i>	<i>BMP2</i>
Position	67920032	6725913
	intronique	intergénique
Allèle majeur	C	G
Allèle mineur	G	A
MAF (cas)	0,3	0,39
MAF (témoins)	0,23	0,29
OR (IC 95%)	1,47 (1,06 – 2,03)	1,55 (1,14 – 2,10)
p nominale	0,023	0,004

Les résultats de cette analyse finale présentés dans le tableau XVI montrent que l'allèle mineur du SNP rs4930573 (OR = 1,47 [1,06-2,03]; p = 0,023) dans le locus *LRP5* de même que celui du SNP rs235737 (OR = 1,55 [1,14-2,10]; p = 0,004) dans le locus *BMP2* sont associés à une augmentation du risque de SVAC. Ces résultats concordent avec ceux des deux premières analyses (cf. tableaux XIV et XV). Nous commenterons plus en détail ces résultats dans le volet discussion de notre étude.

Chapitre IV : DISCUSSION

Les dernières décennies ont été marquées par d'importants progrès dans l'étude des composantes physiopathologiques de la SVAC. La captation et la rétention des lipides, le système rénine-angiotensine-aldostérone, l'inflammation, les voies de signalisation et la prédisposition génétique sont différentes composantes de la physiopathologie de la SVAC qui ont été considérées. Dans ce projet, nous avons voulu étudier l'association de certains variants de gènes candidats avec la prédisposition génétique à la SVAC. Pour ce faire, nous avons effectué une collecte de données cliniques, échocardiographiques et biométriques des patients. Les données échocardiographiques ont été recueillies pour mieux identifier et grader les phénotypes. Tandis que les paramètres cliniques et biométriques ont été utiles pour étudier les facteurs de risque associés à progression de la SVAC. Étant donné que cette étude s'est déroulée en plusieurs volets, nous commenterons tout d'abord les résultats obtenus des analyses cliniques et biométriques tout en évoquant les limites de ce travail. Puis nous discuterons en détail les résultats des analyses génétiques et enfin nous évoquerons quelques perspectives.

4.1. ANALYSE DES RÉSULTATS NON GÉNÉTIQUES

L'analyse des données démographiques nous a permis de constater que la cohorte était constituée essentiellement de personnes âgées (cf. tableau X). L'étude de Helsinki a démontré que la calcification de la valve aortique a été trouvée chez plus de 50% des sujets âgés de 75 à 86 ans [8] alors que les travaux de *STEWART et al.*[94] ont montré une augmentation accrue du risque chez les personnes de plus de 65 ans. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle la SVAC est une pathologie liée au vieillissement. La dégénérescence de la valve aortique étant un processus à évolution lente, il est normal de constater que la SVAC soit plus fréquente dans la population vieillissante. Cependant, il n'est pas possible d'affirmer que les lésions valvulaires soient seulement liées à un phénomène de vieillissement tissulaire. L'épaississement de la valve aortique a été associée à d'autres facteurs de risque tels que : le sexe masculin, le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète, le taux élevé des LDL-cholestérol [17, 94, 95] . Ces associations ont

été faites à des degrés divers dans différentes études. Néanmoins, l'analyse actuelle de nos résultats cliniques et biométriques n'a pas pu mettre clairement en évidence l'association de tous ces facteurs de risque à la SVAC. Cependant, le but de ce travail était d'étudier la prédisposition génétique à la SVAC et certains types d'analyse statistique n'ont pas été effectués comme par exemple des études de corrélations entre facteurs de risque et mesures associés à la SVA. Les données cliniques ont été analysées principalement pour vérifier la distribution des différentes variables dans les deux populations (cas/témoins). Toutefois, nous avons observé des concentrations moyennes de LDL, HDL et cholestérol total légèrement plus élevées chez les patients avec SVAC en comparaison aux témoins. En outre, l'association entre les lésions valvulaires et les LDL-cholestérol supporte les observations antérieures indiquant la présence des dépôts de particules de LDL aux sites de lésions endothéliales [16, 96]. Ces lésions pourraient être provoquées soit par un stress de cisaillement ou des facteurs génétiques et environnementaux. Les lésions endothéliales favorisent l'infiltration des cellules inflammatoires et le dépôt des particules de LDL dans les feuillets de valves. Par ailleurs, l'oxydation des LDL dans les feuillets provoque le recrutement des cellules inflammatoires (macrophages, monocytes) et la production des cytokines. Tout cela aboutit à la formation des cellules spumeuses qui sont impliquées dans le processus de remodelage tissulaire et la progression de la maladie. Néanmoins, bien que les dépôts de lipoprotéines soient une composante dans la pathogénie de la SVAC, il s'avère tout de même difficile d'interpréter de façon sans équivoque nos résultats. Les résultats présentés dans le tableau XII peuvent être biaisés d'une certaine façon par le fait qu'environ 80% des patients dans les deux groupes prenaient des hypolipémiants. Nous n'avons pas pu obtenir le bilan lipidique des patients avant le début de leur traitement. Cela aurait probablement contribué à une meilleure analyse du profil lipidique des patients. En outre, les concentrations moyennes plus faibles des différents types de cholestérols chez les témoins en comparaison aux cas peuvent également s'expliquer par le fait que le traitement hypolipémiant a été probablement plus agressif dans la population des témoins car, c'est dans cette population que nous avons observé un nombre plus important de maladie coronarienne (cf. tableau X). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que lors de la collecte des

données cliniques, nous avons constaté que la posologie des hypolipidémifiants n'était pas identique chez tous les patients coronariens. Par ailleurs, tel que mentionné plus haut, plusieurs études soutiennent la présence de LDL oxydés dans les feuillets de valves aortiques calcifiées. Ceci constitue une des similitudes entre la pathogénie valvulaire et vasculaire. Néanmoins les traitements hypolipidémifiants, bien qu'efficaces pour lutter contre l'athérosclérose, restent controversés dans la SVAC. Récemment, les travaux de *Busseuil et al.* ont mis en évidence les effets bénéfiques de l'ApoA-I : une composante structurale des HDL dans la régression de la SVA ainsi que dans la diminution des calcifications chez les lapins [97]. Les HDL jouent un rôle régulateur des propriétés migratoires et inflammatoires des cellules dérivés des monocytes dans les plaques athérosclérotiques [98]. Ceci suggère que les HDL auraient un effet dans la SVAC.

4.2. ANALYSE DES RÉSULTATS DES TESTS D'ASSOCIATION

La mise en évidence de nouveaux facteurs de risque génétiques associés à la SVAC constitue une recherche importante afin d'améliorer la prédiction du risque et également nos connaissances dans la physiopathologie de cette maladie. Dans ce projet, nous avons utilisé l'approche classique par gènes candidats dont le succès réside en grande partie dans le choix des gènes. Ainsi, les gènes testés ont été choisis pour les raisons suivantes : (1) parce qu'ils avaient été associés à la SVAC selon des études antérieures, (2) parce qu'ils sont fortement associés à des processus inflammatoires ou métaboliques, dont les variants génétiques peuvent être partagés avec la SVAC et enfin (3) à cause de leur participation à des mécanismes moléculaires connus de la SVAC. Cependant, nous avons privilégié les gènes qui interviennent au niveau de la calcification à cause du mécanisme complexe de cette composante dans la pathogénie de la SVAC. Au total 81 marqueurs ont été testés dans les différents gènes candidats, dont 2 marqueurs ont montré une association nominale avec la SVAC. Pour la première fois, les loci *LRP5* (rs4930573) et *BMP2* (rs235737) ont montré une association nominale significative à la SVAC après ajustement pour le sexe et la maladie coronarienne. Cependant, nous n'avons pas atteint le seuil de significativité pour

ces deux marqueurs après correction pour les tests multiples. Cette correction nous semblait nécessaire pour corriger pour la possibilité d'existence de fausses associations potentielles, compte tenu du grand nombre de marqueurs utilisés. Pour cette correction, des tests de permutations ont été privilégiés au détriment de la correction de Bonferroni à cause de l'aspect moins conservateur de ce test. Ce manque de significativité après correction peut être dû à la petite taille de l'échantillon. En utilisant le logiciel *genetic power calculator* [99], nous avons calculé que pour atteindre un seuil de significativité pour ces deux marqueurs après correction, il faudrait un nombre de cas respectifs de 721 pour LRP5 et 509 pour BMP2 en utilisant un modèle additif. Les travaux sur la SVAC en rapport avec ces marqueurs dans le futur devront tenir compte de ces paramètres pour espérer trouver des associations significatives après correction.

L'expression de ces deux gènes associés nominalement à la SVAC a été étudiée dans les études fonctionnelles sur la calcification des valves aortiques et donc ces deux loci appartiennent de ce fait au troisième groupe de gènes candidats sélectionnés. Pour ce groupe de gènes une approche par «*tagSNP*» a été utilisée pour sélectionner les marqueurs. De plus, les SNP qui ont fonctionné lors du génotypage de ces deux gènes ne captureraient pas toute la variabilité génétique de ces loci. En vérifiant dans Haplowiev 4.1 le pourcentage de variabilité couverte par ces SNP chez les caucasiens (CEU), nous avons constaté que seulement 43% et 17% de variabilité étaient respectivement couverte pour *BMP2* et *LRP5*. Ces faibles proportions sont dues au fait que certains SNP capturés par *tagging* n'ont pas fonctionnés lors de la conception des pools tandis que d'autres n'ont pas été validés lors du contrôle de qualité. Ceci suggère que beaucoup reste à découvrir concernant l'association de ces gènes à la SVAC. Ainsi, nous pensons que d'autres marqueurs devraient également être explorés dans ces gènes.

Par ailleurs, ce travail étant effectué dans un but exploratoire, tous les gènes connus dans les études fonctionnelles sur la SVA n'ont pas été testés. De même, l'approche par gènes candidats oblige la restriction des gènes uniquement aux voies physiopathologiques déjà connues. Ceci exclut la possibilité d'explorer des nouvelles voies, ce qui constitue une limite pour ce type d'étude.

4.2.1. *Les gènes associés à la SVAC dans les études antérieures*

Lorsque nous avons conçu cette étude, nous avons sélectionné 5 marqueurs associés à la SVAC et identifiés dans des études antérieures dont chacun se trouvait dans l'un des gènes suivants : *APOB*, *APOE*, *ESRI*, *PTH*, *VDR*. Les variants des gènes *APOE* et *ESRI* associés à la SVAC n'ont pas pu être testés, car ils ne satisfaisaient pas aux exigences de compatibilité pour la conception des amorces de PCR. Cependant, parmi les marqueurs qui ont fonctionnés lors du génotypage, aucun n'a été associé à la SVAC. Cette difficulté à confirmer les résultats des autres études peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la taille de l'échantillon étant limitée, nous pourrions déduire que nous avons probablement manqué de puissance. Cependant, parmi ces études antérieures, certaines étaient constituées par des échantillons plus petits que la notre [45, 46, 52]. Cette remarque nous amène à penser que le risque associé à ces marqueurs aurait pu avoir été surestimé. On peut également évoquer ici l'existence probable de faux positifs. Ceci est d'autant plus possible que les fréquences alléliques de certains marqueurs rs429358 et rs7412 (*APOE*) [43, 44] associés à la SVAC dans les études antérieures étaient inférieures à 0,05 et que le nombre de patients était inférieur à 100. Les différences de populations et la conception globale des études peuvent également expliquer cette divergence dans les résultats. C'est possiblement le cas, par exemple, des travaux de *Nordstrom et al.* [46] qui associent le polymorphisme du gène *ESRI* avec la SVAC. Cette étude a été effectuée avec un groupe de 41 femmes caucasiennes ménopausées souffrant de sténose valvulaire aortique appariées avec un groupe de femmes témoins choisies dans la population générale sans tenir compte de l'étiologie. Notre projet a également été effectué sur un seul phénotype : la SVAC d'origine dégénérative ou maladie de Monckeberg et la cohorte bien que plus grande, était constituée d'hommes et de femmes. De plus, le recrutement des patients dans notre étude a été effectué pour la plupart à la clinique d'échocardiographie ce qui pourrait également expliquer cette discordance des résultats sans oublier la possibilité de faux positifs dans les études antérieures. Il n'est donc pas possible dans ces conditions de faire une inférence populationnelle à cause du biais de sélection probable dans la population des témoins. *Avakian et al.* associent le polymorphisme de l'*APOE4* à la SVAC dans une population

brésilienne sans précision du groupe ethnique [52]. Connaissant la diversité ethnique de la population brésilienne, l'absence de stratification de population dans cette étude pourrait être à l'origine de cette divergence dans nos résultats. Notre étude a été conçue dans une population caucasienne constituée essentiellement de Canadiens français et donc relativement homogène alors que le type de population n'est pas précisé dans l'étude d'Avakian et al..

En outre, *Schmitz et al.* associent le polymorphisme (rs6254) du gène *PTH* à la SVAC dans une cohorte faite de 538 cas et 536 témoins caucasiens allemands [43]. Le SNP rs6254 a été associé à la SVAC avec un OR de 1,55 (1,30 – 2,17). Cependant, comme pour notre étude, la population des témoins comportait un grand nombre de patients coronariens. De plus 66% des cas étaient porteurs de l'allèle causal contre 60% de témoins. Ceci nous amène à penser que cet allèle est fréquent dans la population caucasienne. Cependant, l'idéal pour des études cas/témoins sur la SVAC serait de sélectionner des témoins sains dans la population générale afin de permettre une comparaison adéquate avec possibilité de faire une inférence populationnelle.

Aucun des variants testés pour leur association aux maladies inflammatoires et au métabolisme des lipides n'a été associé à la SVAC. C'est le cas du marqueur de *PCSK9* testé dans cette étude et connu pour son association à la maladie coronarienne [55]. Dans notre travail, nous avons trouvé dans un premier temps le gène *PCSK9* nominalelement associé à la SVAC suite au test du khi-carré (voir tableau XIV). Cependant, cette association n'a pu être confirmée lorsque nous avons effectué un ajustement par rapport au sexe ou à la maladie coronarienne dans l'étude. Le rapport de cotes obtenu du test du khi-carré était de 5,16 avec une incertitude assez grande représentée par un IC 95% large s'étalant de 1,12 à 23,73. De plus dans cette première analyse, seulement 2% des cas étaient porteurs de l'allèle causal en comparaison à 0,5% de témoins. *PCSK9* est un gène fortement polygénique et, l'un des changements de l'ADN dans l'exon 1 consiste au remplacement de l'arginine en position 46 par une leucine [100]. Cette mutation est appelée la R46L et elle correspond au polymorphisme du gène *PCSK9* associé à la SVAC dans notre étude. La R46L est une mutation causant une perte de fonction de la protéine qui est associée à une

réduction des taux de LDL [77, 78]. Par conséquent, elle protège contre la maladie coronarienne. Cette pathologie étant associée à un biais de sélection dans notre recrutement il n'est pas très surprenant de trouver ce résultat. Par ailleurs la fréquence de l'allèle mineure est très petite chez les témoins. Cela signifie que cette mutation est rare dans la population caucasienne. Il s'agit donc fort probablement d'une fausse association et la maladie coronarienne semble être un facteur confondant. Bien que nous ayons perdu ce signal, nous ne devons pas oublier que les calcifications aortiques sont fréquemment rencontrées chez les patients souffrant de la forme homozygote d'hypercholestérolémie familiale due aux mutations du gène *LDLR* [101] et donc il serait intéressant de poursuivre l'investigation ultérieurement dans des plus grandes populations en effectuant un séquençage de ce gène qui pourrait prendre en compte d'autres mutations notamment celle par gain de fonction de la protéine qui augmente le taux de LDL.

4.2.2. Association du gène *BMP2* à la SVAC

Cette étude a montré pour la première fois un polymorphisme de *BMP2* nominale associée à la SVAC. Le marqueur associé à la SVAC dans le gène *BMP2* se trouve en région intergénique et plus précisément en position 6725913 pb, soit à 17003 pb en aval du gène *BMP2* (hg18 HapMap). À un seuil de $r^2 \geq 0.7$, il est corrélé avec 2 autres marqueurs (cf: figure 8).

Néanmoins, cette région est marquée par la présence de nombreuses recombinaisons génétiques ce qui influence la transmission de l'information génétique. Ces recombinaisons, en permettant le réassortiment des haplotypes, diminuent le déséquilibre de liaison entre les marqueurs et augmentent la diversité génétique.

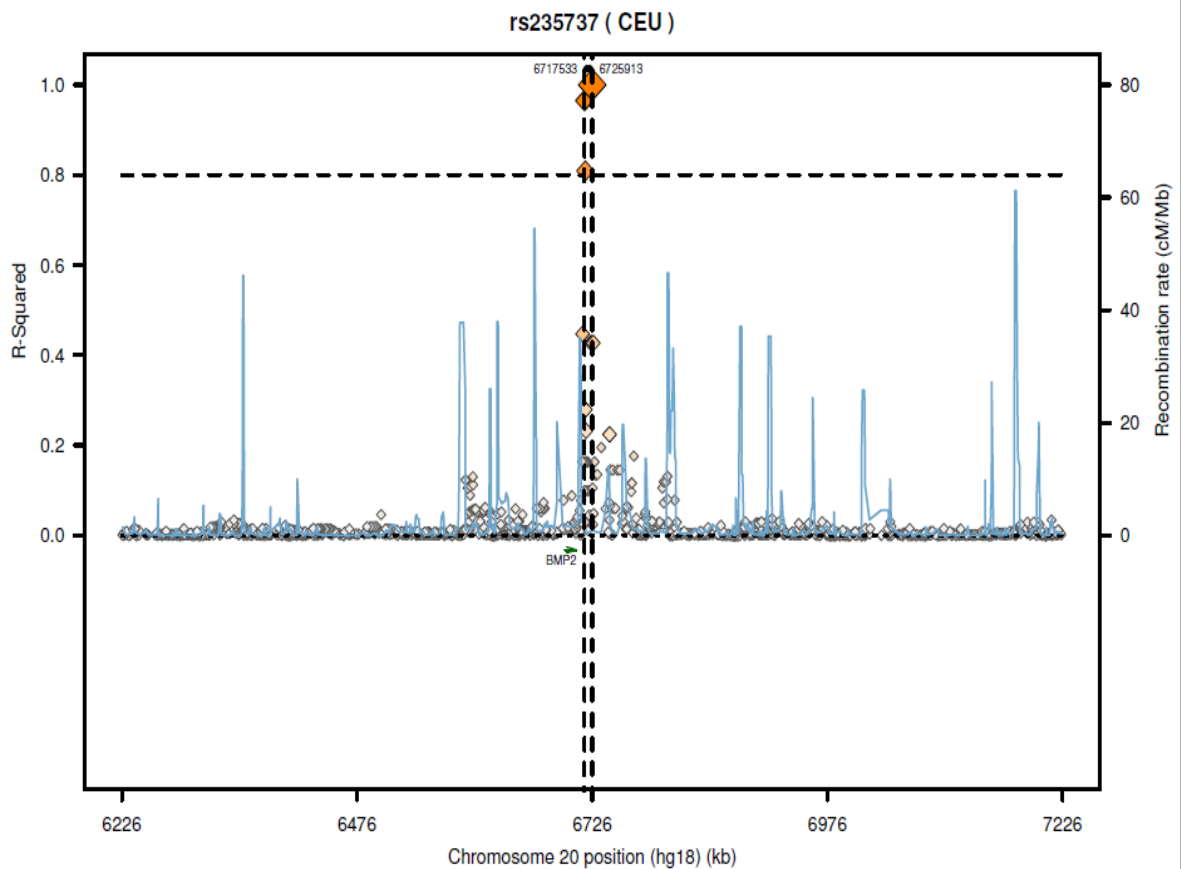


Figure 8: Corrélation des SNP dans la région du SNP rs235737

SNAP: A web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap *Bioinformatics*, 2008 24(24):2938-2939 (version 2.1): <http://www.broadinstitute.org/mpg/snap>

BMP2 appartient à un groupe de facteurs de croissance à l'origine découvert pour leur capacité à induire la formation des os et du cartilage. Les travaux de *Lee et al.* ont identifié un sous-ensemble de cellules musculaires qui expriment plus la phosphatase alcaline en comparaison aux autres cellules musculaires en rapport à une stimulation par la BMP-2 in vitro [102]. Cela suggère que certaines cellules musculaires peuvent se différencier en cellules ostéogéniques lorsqu'elles sont exposées à la BMP-2. La traduction du signal à travers ces récepteurs entraîne la mobilisation des membres de la famille des protéines SMAD : protéines qui modulent l'activité des ligands de TGFβ [89]. Le gène *BMP2* est

surexprimé dans le milieu athérogène. Il stimule les voies de signalisation telles que Runx2/Cbfa1 et Wnt/LRP5/ β -caténine qui sont impliquées dans la différenciation ostéoblastique [16, 18]. De plus, des études moléculaires indiquent maintenant que BMP-2 augmente la prolifération des fibroblastes aortiques par la voie de signalisation de Wnt/Msx2 et induit le renouvellement de la matrice extracellulaire [61]. Ceci suggère que BMP-2 pourrait être impliqué dans la calcification des valves aortiques. Des travaux récents ont mis en évidence une surexpression du gène BMP-2 dans les cellules interstitielles de valve aortique chez les rats âgés de 14 semaines en comparaison aux rats âgés de 9 semaines [103]. Ces résultats dans les modèles expérimentaux pourraient suggérer que la calcification de la valve aortique chez le sujet âgé progresserait en partie grâce à l'activation de la voie de BMP-2. Les études génétiques ultérieures devraient tenir compte de ce paramètre.

4.2.3. Association du gène *LRP5* à la SVAC

Comme pour le gène *BMP2*, le gène *LRP5* a également été nominalelement associé à la SVAC dans notre étude. *LRP5* est un corécepteur de la voie canonique Wnt/ β -caténine bien établi dans la différenciation des ostéoblastes [24]. Il active la voie de signalisation de la β -caténine. Lorsque la β -caténine est activée, elle est transférée vers le noyau pour initier l'ostéogenèse. Ces données soutiennent le rôle du myofibroblaste valvulaire dans la prolifération cellulaire et dans la synthèse de la matrice extracellulaire activée par les corécepteurs de *LRP5*. Plusieurs travaux mettent en évidence une augmentation de l'expression de *LRP5* dans les valves calcifiées tant chez l'animal que chez l'homme [20, 60, 94]. Les inhibiteurs extracellulaires de la voie de signalisation Wnt-LRP5 jouent aussi un rôle dans la régulation de la masse osseuse. Wnt sécrète des protéines qui contrôlent de multiples processus de développement y compris l'induction du mésoderme, le destin des cellules, la modélisation des membres et l'organogenèse [95]. La minéralisation de la valve aortique est la conséquence des mécanismes similaires à ceux qui sont actifs dans la formation osseuse dont la surexpression de *LRP5* et la présence d'ostéoblastes dans les

valves calcifiées. LRP5 joue également un rôle dans le métabolisme du cholestérol et dans le catabolisme de l'ApoE dépendant ou indépendant des lipoprotéines plasmatiques [96]. LRP5 est largement exprimée dans de nombreux tissus, y compris les hépatocytes, les glandes surrénales et le pancréas [95]. LRP5 est également un corécepteur critique de la famille des récepteurs apparentés au récepteur des LDL jouant un rôle important dans la différenciation des cellules ostéoblastiques grâce à sa liaison à Wnt et l'activation de la β -caténine [59]. Chez la souris nourrie avec un régime riche en gras, une déficience en LRP5 conduit à une augmentation des taux plasmatiques de cholestérol [97]. Cette augmentation est due à une diminution de la clairance hépatique des chylomicrons: lipoprotéines formées pendant la digestion contenant de l'ApoE. Récemment, l'équipe du Dr Rajamannan a montré que la calcification des valves aortiques est coordonnée en partie par la voie de signalisation de LRP5/ β -caténine et atténuée par la prise d'hypolipémiants notamment l'atorvastatine [1]. Par ailleurs, les souris dépourvus du gène *LRP5* et de l'*APOE*, lorsqu'exposées à une diète riche en cholestérol, développent une minéralisation dans les valves aortiques avec une augmentation de l'expression de *LRP6* et *RUNX2* [104]. Le variant génétique de LRP5 associé à la SVAC se trouve sur le 7^e intron en position 67920032 bp (hg18 HapMap). À $r^2 \geq 0.2$, ce variant n'est corrélé avec aucun autre marqueur chez les Caucasiens (CEU). Cependant le gène *LRP5* est proche de plusieurs autres gènes qui pourraient influencer son expression (cf. figure 9). Une étude d'expression ciblée autour du gène *LRP5* pourrait être souhaitable pour le futur.

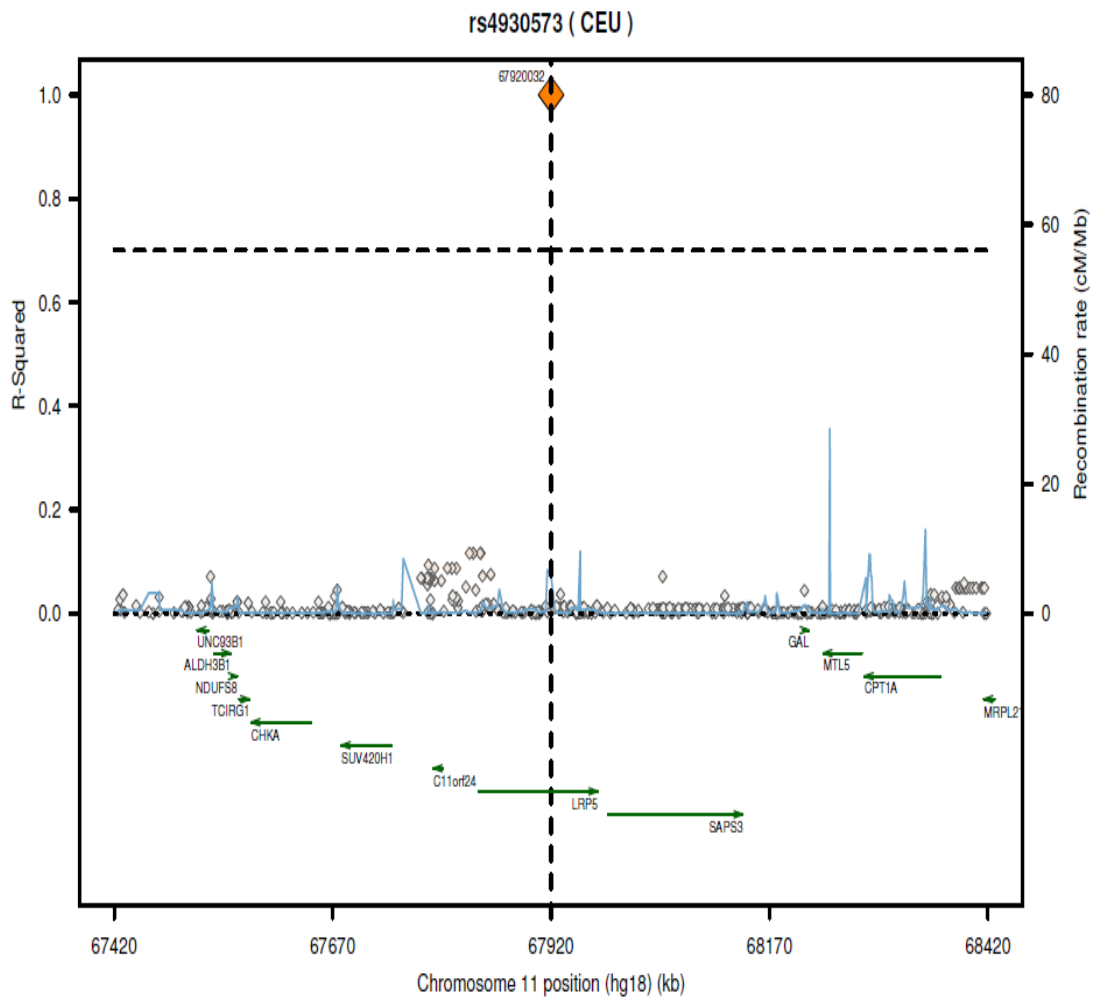


Figure 9: Corrélation des SNP dans la région du SNP rs4930573

SNAP: A web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap *Bioinformatics*, 2008 24(24):2938-2939 (version 2.1): <http://www.broadinstitute.org/mpg/snap>

Le marqueur du gène *LRP5* associé à la SVAC dans notre étude se trouve en région intronique, il est possible que ce marqueur soit fortement associé à un autre marqueur qui lui aurait un effet fonctionnel sur l'expression du même gène ou d'un autre gène ou dans la fonction d'une autre protéine. Par ailleurs, il pourrait également influencer l'épissage de *LRP5*. L'épissage est une étape nécessaire pour rendre l'ARNm viable à la traduction. Cette étape consiste en une déletion des introns ou, dans le cas de l'épissage alternatif, de certains exons qui ne seront pas indispensables au codage de la protéine. Elle nécessite donc la

reconnaissance des exons, l'excision des introns puis l'union des exons pour former un transcrit mature. Les altérations de ces sites d'épissage et leurs conséquences sont maintenant bien mises en évidence. L'épissage alternatif permet à un gène de coder plusieurs ARNm différents. C'est un processus important dans la régulation de l'expression des gènes qui peut entraîner un décalage du cadre de lecture de la séquence nucléotidique. Ceci peut causer l'apparition d'un codon STOP aboutissant ainsi à une mutation non-sens. En outre, le changement de la séquence d'ARNm lors de l'épissage se répercute également sur la protéine et donc sur ses capacités physico-chimiques entraînant ainsi des conséquences sur sa fonction. Il semblerait donc utile d'effectuer des études d'expression des gènes *BMP2* et *LRP5* pour connaître les différentes variantes de l'ARNm.

Conclusion

Malgré de nombreux progrès réalisés ces dernières années sur la pathogénie de la SVAC, l'origine génétique de la SVAC reste très peu connue. L'avènement des modèles expérimentaux et des études génétiques ont permis de montrer que la valve aortique a une biologie cellulaire active qui intègre trois aspects principaux dans le développement de la sténose valvulaire calcifiée : la génétique, les facteurs classiques de risques cardiovasculaires et les voies de signalisation cellulaire. La gestion thérapeutique future de cette pathologie nécessitera une bonne compréhension de ces différents mécanismes. Plusieurs études d'association génétique ont été effectuées récemment sur la SVAC. Cependant, aucune de ces études n'a été effectuée avec les gènes *BMP2* et *LRP5*. Cette étude est la première à démontrer une association nominale des gènes *BMP2* et *LRP5* avec la SVAC. Elle apporte quelques éléments de réponse dans la compréhension des facteurs génétiques impliqués dans la progression de la sténose valvulaire depuis la lésion inflammatoire, la transformation des myofibroblastes valvulaires jusqu'à la calcification sévère des valves. Cependant, il est encore trop tôt pour proposer une analyse génétique systématique à tous les patients atteints de SVAC car beaucoup reste encore à découvrir sur la génétique de cette pathologie. En revanche, il serait souhaitable d'effectuer dès maintenant un génotypage dans une cohorte plus large pour augmenter la puissance de l'étude tout en introduisant d'autres gènes. Des études pangénomiques sur un grand nombre de polymorphismes pourraient permettre d'identifier des voies physiopathologiques non encore explorées dans la progression de la SVAC. La validation des gènes impliqués dans la SVAC reste un objectif majeur pour les études génétiques sur la sténose aortique. Celle-ci est nécessaire pour mieux élucider la génétique de la SVAC afin d'identifier précocement les patients potentiellement à risque de développer cette maladie. Ainsi, dans un avenir proche, lorsque les différents gènes seront identifiés, on pourrait proposer des analyses moléculaires pour identifier les principales voies de signalisation potentielles. Dès lors, la découverte d'un traitement médical efficace pour la SVAC nécessitera des approches innovatrices et une ingéniosité pour mieux en connaître le mécanisme. De plus,

connaissant le processus biologique et génétique de la SVAC, on pourrait être amené à penser que cette affection peut être prévenue et son évolution ralentie par des interventions pharmacologiques ciblées afin d'éviter l'approche chirurgicale invasive actuelle.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cote, C., et al., *Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis*. *Heart*, 2008. **94**(9): p. 1175-80.
2. Akat, K., M. Borggrefe, and J.J. Kaden, *Aortic valve calcification: basic science to clinical practice*. *Heart*, 2009. **95**(8): p. 616-23.
3. Cowell, S.J., et al., *Calcific aortic stenosis: same old story?* *Age Ageing*, 2004. **33**(6): p. 538-44.
4. Mönckeberg, J.G., *Der normale histogische Bau und die Sklerose der Aortenklappen*. *virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.*, 1904. **176**: p. 472-514.
5. O'Brien, K.D., *Epidemiology and genetics of calcific aortic valve disease*. *J Investig Med*, 2007. **55**(6): p. 284-91.
6. Freeman, R.V. and C.M. Otto, *Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies*. *Circulation*, 2005. **111**(24): p. 3316-26.
7. Otto, C.M., et al., *Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(3): p. 142-7.
8. Lindroos, M., et al., *Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample*. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **21**(5): p. 1220-5.
9. Iung, B. and A. Vahanian, *Epidemiology of valvular heart disease in the adult*. *Nat Rev Cardiol*. **8**(3): p. 162-72.
10. Carabello, B.A. and W.J. Paulus, *Aortic stenosis*. *Lancet*, 2009. **373**(9667): p. 956-66.
11. Yener, N., et al., *Bicuspid aortic valve*. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2002. **8**(5): p. 264-7.
12. Acar, j.e.S., A, *Rétrécissement aortique orificiel de l'adulte.*, in *Encycl.Méd.Chir.(Édition scientifiques et Médicales Elsevier SAS, tous droits réservés), cardiologie*. 2002: Paris-France. p. 19p.
13. Yetkin, E. and J. Waltenberger, *Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis*. *Int J Cardiol*, 2009. **135**(1): p. 4-13.
14. Helske, S., et al., *Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process*. *Curr Opin Lipidol*, 2007. **18**(5): p. 483-91.
15. Yeghiazaryan, K., et al., *Could activated tissue remodeling be considered as early marker for progressive valve degeneration? Comparative analysis of checkpoint and ECM remodeling gene expression in native degenerating aortic valves and after bioprosthetic replacement*. *Amino Acids*, 2007. **32**(1): p. 109-14.
16. Otto, C.M., *Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(13): p. 1395-8.
17. Aksoy, Y., et al., *Aortic valve calcification: association with bone mineral density and cardiovascular risk factors*. *Coron Artery Dis*, 2005. **16**(6): p. 379-83.
18. Bosse, Y., P. Mathieu, and P. Pibarot, *Genomics: the next step to elucidate the etiology of calcific aortic valve stenosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(14): p. 1327-36.

19. Rajamannan, N.M., *Low-density lipoprotein and aortic stenosis*. Heart, 2008. **94**(9): p. 1111-2.
20. Hakuno, D., et al., *Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease*. J Mol Med, 2009. **87**(1): p. 17-24.
21. Clark-Greuel, J.N., et al., *Transforming growth factor-beta1 mechanisms in aortic valve calcification: increased alkaline phosphatase and related events*. Ann Thorac Surg, 2007. **83**(3): p. 946-53.
22. Soini, Y., et al., *Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart*. J Pathol, 2001. **194**(2): p. 225-31.
23. Rajamannan, N.M., B. Gersh, and R.O. Bonow, *Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside--emerging clinical and cellular concepts*. Heart, 2003. **89**(7): p. 801-5.
24. Garg, V., *Molecular genetics of aortic valve disease*. Curr Opin Cardiol, 2006. **21**(3): p. 180-4.
25. Doherty, T.M., et al., *Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 629-72.
26. Baumgartner, H., et al., *Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice*. J Am Soc Echocardiogr, 2009. **22**(1): p. 1-23; quiz 101-2.
27. Maganti, K., et al., *Valvular heart disease: diagnosis and management*. Mayo Clin Proc, 2010. **85**(5): p. 483-500.
28. Ross, J., Jr. and E. Braunwald, *Aortic stenosis*. Circulation, 1968. **38**(1 Suppl): p. 61-7.
29. Nistri, S., et al., *Practical echocardiography in aortic valve stenosis*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2008. **9**(7): p. 653-65.
30. Sheil, M.L., O. Jenkins, and G.F. Sholler, *Echocardiographic assessment of aortic root dimensions in normal children based on measurement of a new ratio of aortic size independent of growth*. Am J Cardiol, 1995. **75**(10): p. 711-5.
31. Bermejo, J., F. Alfonso, and X. Bosch, *[Summary of the clinical studies reported in the 52nd annual Scientific Sessions of the American College of Cardiology (Chicago USA, March 30-April 2, 2003)]*. Rev Esp Cardiol, 2003. **56**(6): p. 601-6.
32. Stein, L.D., *Human genome: end of the beginning*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 915-6.
33. Plenge, R. and J.D. Rioux, *Identifying susceptibility genes for immunological disorders: patterns, power, and proof*. Immunol Rev, 2006. **210**: p. 40-51.
34. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. Bioinformatics, 2005. **21**(2): p. 263-5.
35. *The International HapMap Project*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 789-96.
36. Cheung, V.G. and R.S. Spielman, *Genetics of human gene expression: mapping DNA variants that influence gene expression*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(9): p. 595-604.
37. Slatkin, M., *Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(6): p. 477-85.

38. Cordell, H.J. and D.G. Clayton, *Genetic association studies*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1121-31.
39. Hardy, J. and A. Singleton, *Genomewide association studies and human disease*. N Engl J Med, 2009. **360**(17): p. 1759-68.
40. Wayne, M.L. and L.M. McIntyre, *Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14903-6.
41. Pettersson, F.H., et al., *Marker selection for genetic case-control association studies*. Nat Protoc, 2009. **4**(5): p. 743-52.
42. Attia, J., et al., *How to use an article about genetic association: A: Background concepts*. JAMA, 2009. **301**(1): p. 74-81.
43. Schmitz, F., et al., *Parathyroid hormone gene variant and calcific aortic stenosis*. J Heart Valve Dis, 2009. **18**(3): p. 262-7.
44. Novaro, G.M., et al., *Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease*. Circulation, 2003. **108**(15): p. 1804-8.
45. Ortlepp, J.R., et al., *The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis*. Heart, 2001. **85**(6): p. 635-8.
46. Nordstrom, P., et al., *Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women*. J Intern Med, 2003. **254**(2): p. 140-6.
47. 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.
48. Garg, V., et al., *Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 270-4.
49. Clementi, M., et al., *Familial congenital bicuspid aortic valve: a disorder of uncertain inheritance*. Am J Med Genet, 1996. **62**(4): p. 336-8.
50. 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.
51. Horne, B.D., et al., *Evidence for a heritable component in death resulting from aortic and mitral valve diseases*. Circulation, 2004. **110**(19): p. 3143-8.
52. Avakian, S.D., et al., *Apolipoproteins AI, B, and E polymorphisms in severe aortic valve stenosis*. Clin Genet, 2001. **60**(5): p. 381-4.
53. Awan, Z., et al., *Vascular calcifications in homozygote familial hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 777-85.
54. Linhartova, K., et al., *Parathyroid hormone and vitamin D levels are independently associated with calcific aortic stenosis*. Circ J, 2008. **72**(2): p. 245-50.
55. Kathiresan, S., et al., *Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans*. Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 189-97.

56. Shimane, K., et al., *The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population.* Arthritis Rheum, 2010. **62**(2): p. 574-9.
57. Franke, A., et al., *Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility.* Nat Genet, 2008. **40**(11): p. 1319-23.
58. Helske, S., et al., *Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1791-8.
59. Bosse, Y., et al., *Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves.* Circ Cardiovasc Genet, 2009. **2**(5): p. 489-98.
60. Caira, F.C., et al., *Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation.* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(8): p. 1707-12.
61. Shao, J.S., et al., *Vascular Bmp Msx2 Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1117**: p. 40-50.
62. Shao, J.S., et al., *Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals.* J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1210-20.
63. Siest, G., et al., *Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine.* Clin Chem, 1995. **41**(8 Pt 1): p. 1068-86.
64. Wang, C.H., et al., *[Genetic association of apoE and apoCI gene polymorphisms with coronary heart disease.].* Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2004. **25**(11): p. 982-5.
65. Singh, P.P., et al., *Apolipoprotein E polymorphism and its relation to plasma lipids in coronary heart disease.* Indian J Med Sci, 2008. **62**(3): p. 105-12.
66. Kardina, S.L., et al., *The relationship between risk factor levels and presence of coronary artery calcification is dependent on apolipoprotein E genotype.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(2): p. 427-35.
67. Zhao, T., et al., *Association between ESR1 and ESR2 gene polymorphisms and hyperlipidemia in Chinese Han postmenopausal women.* J Hum Genet, 2010. **55**(1): p. 50-4.
68. Lorentzon Mattias, L.R., Bckstrom Torbjorn and Nordstrom Peter *Estrogen receptor Gene Polymorphism, But Not Estradiol Levels, Is Related to Bone Density in Healthy Adolescent Boys: A Cross-Sectional and Longitudinal Study.* The Journal Of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1999. **84**(12).
69. Lemaire, V., et al., *Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling.* J Theor Biol, 2004. **229**(3): p. 293-309.
70. Ferrari, S., et al., *Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density: interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms.* J Bone Miner Res, 1998. **13**(6): p. 925-30.
71. Willer, C.J., et al., *Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease.* Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 161-9.

72. Amre, D.K., et al., *Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009. **29**(9): p. 1025-31.
73. Glocker, E.O., et al., *Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(21): p. 2033-45.
74. Ortlepp, J.R., et al., *The amount of calcium-deficient hexagonal hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis*. *Eur Heart J*, 2004. **25**(6): p. 514-22.
75. Mazzone, A., L. Venneri, and S. Berti, *Aortic valve stenosis and coronary artery disease: pathophysiological and clinical links*. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2007. **8**(12): p. 983-9.
76. Abifadel, M., et al., *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. *Nat Genet*, 2003. **34**(2): p. 154-6.
77. Cohen, J.C., et al., *Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(12): p. 1264-72.
78. Benn, M., et al., *PCSK9 R46L, low-density lipoprotein cholesterol levels, and risk of ischemic heart disease: 3 independent studies and meta-analyses*. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **55**(25): p. 2833-42.
79. Boonyasrisawat, W., et al., *Tag polymorphisms at the A20 (TNFAIP3) locus are associated with lower gene expression and increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2007. **56**(2): p. 499-505.
80. Musone, S.L., et al., *Sequencing of TNFAIP3 and association of variants with multiple autoimmune diseases*. *Genes Immun*. **12**(3): p. 176-82.
81. Yano, S., et al., *Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts*. *Endocrinology*, 2005. **146**(5): p. 2324-35.
82. Bodine, P.V., *Wnt signaling control of bone cell apoptosis*. *Cell Res*, 2008. **18**(2): p. 248-53.
83. Stathopoulou, M.G., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms are associated with bone mineral density in Greek postmenopausal women: an interaction with calcium intake*. *J Am Diet Assoc*, 2010. **110**(7): p. 1078-83.
84. Ferrari, S.L., S. Deutsch, and S.E. Antonarakis, *Pathogenic mutations and polymorphisms in the lipoprotein receptor-related protein 5 reveal a new biological pathway for the control of bone mass*. *Curr Opin Lipidol*, 2005. **16**(2): p. 207-14.
85. Ye, S., *Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(3): p. 636-45.
86. Blankenberg, S., et al., *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease*. *Circulation*, 2003. **107**(12): p. 1579-85.
87. Desnick, J.P., et al., *Identification and characterization of eight novel SMPD1 mutations causing types A and B Niemann-Pick disease*. *Mol Med*, 2010. **16**(7-8): p. 316-21.

88. Ishii, H., et al., *Acid sphingomyelinase deficiency: cardiac dysfunction and characteristic findings of the coronary arteries*. J Inher Metab Dis, 2006. **29**(1): p. 232-4.
89. Schroeder, T.M., E.D. Jensen, and J.J. Westendorf, *Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005. **75**(3): p. 213-25.
90. Bodine, P.V. and B.S. Komm, *Wnt signaling and osteoblastogenesis*. Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(1-2): p. 33-9.
91. Goode, E.L., et al., *Comparison of tagging single-nucleotide polymorphism methods in association analyses*. BMC Proc, 2007. **1 Suppl 1**: p. S6.
92. Surucu, B. and E. Koc, *Assessing the validity of a statistical distribution: some illustrative examples from dermatological research*. Clin Exp Dermatol, 2008. **33**(3): p. 239-42.
93. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(3): p. 559-75.
94. Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(3): p. 630-4.
95. Otto, C.M., et al., *Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies*. Circulation, 1994. **90**(2): p. 844-53.
96. Rajamannan, N.M., et al., *Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway*. Circulation, 2005. **112**(9 Suppl): p. I229-34.
97. Busseuil, D., et al., *Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(4): p. 765-73.
98. Feig, J.E., et al., *HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(17): p. 7166-71.
99. Purcell, S., S.S. Cherny, and P.C. Sham, *Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits*. Bioinformatics, 2003. **19**(1): p. 149-50.
100. Scartezini, M., et al., *The PCSK9 gene R46L variant is associated with lower plasma lipid levels and cardiovascular risk in healthy U.K. men*. Clin Sci (Lond), 2007. **113**(11): p. 435-41.
101. Alrasadi, K., et al., *Aortic calcifications in familial hypercholesterolemia: potential role of the low-density lipoprotein receptor gene*. Am Heart J, 2009. **157**(1): p. 170-6.
102. Lee, J.Y., et al., *Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice*. J Bone Joint Surg Am, 2001. **83-A**(7): p. 1032-9.
103. Seya, K., et al., *Contribution of bone morphogenetic protein-2 to aortic valve calcification in aged rat*. J Pharmacol Sci. **115**(1): p. 8-14.

104. Rajamannan, N.M., *The role of Lrp5/6 in cardiac valve disease: Experimental hypercholesterolemia in the ApoE(-/-) /Lrp5(-/-) mice.* J Cell Biochem.

ANNEXE

Tests de normalité des paramètres cliniques et biométriques

Paramètre	Valeur de P pour le test de KS à 1 échantillon		Distribution		Test utilisé pour comparaison des moyennes
	cas	témoins	cas	témoins	
SVA	0,002	0,830	bimodale	N petit	test de Wilcoxon
GMP	0,016	0,810	asymétrie à Gauche	N petit	test de Wilcoxon
Vélocité	0.12	0,43	bimodale	bimodale	test de Wilcoxon
MVG	0.001	0,0001	cloche avec légère asymétrie	cloche avec légère asymétrie	Student T
Septum IV	0.007	0.001	cloche avec légère asymétrie	asymétrie à Gauche	Student T
Paroi II	0.001	0.001	cloche avec ailes surélevées	cloche avec ailes surélevées	Student T
Glycémie	0.0001	0.001	asymétrie à Gauche	asymétrie à Gauche	Student T
Créatinémie	0.001	0.001	asymétrie à Gauche	asymétrie à Gauche	Student T
Triglycérides	0.001	0.001	asymétrie à Gauche	asymétrie à Gauche	Student T
LDLc	0.001	0.024	bimodale	cloche avec ailes surélevées	test de Wilcoxon
HDLc	0.001	0.0001	cloche avec ailes surélevées	cloche avec ailes surélevées	Student T
Chol T	0.001	0.001	bimodale	asymétrie à Gauche	Student T

Résultats des différents SNP testés après un test du khi-carré

SNP associés à la SVAC dans d'autres études d'association

SNP	Gène	CHR	Allèle Maj/ min	Freq AMC	Freq AMT	p	OR et 95%IC
rs7412	APOE	19	C/T	0.063	0.060	0.862	1.05(0.58 - 1.93)
rs6254	PTH	11	G/A	0.329	0.372	0.212	0.83(0.61 - 1.12)
rs693	APOB	2	C/T	0.481	0.497	0.662	0.94(0.70 - 1.25)
rs34599882	ESR1	6	G/C	0.032	0.053	0.153	0.59(0.28 - 1.22)
rs1544410	VDR	12	G/A	0.401	0.378	0.522	1.10(0.82 - 1.47)

SNP associés à des maladies inflammatoires et le métabolisme lipidique

SNP	Gène	CHR	Allèle Maj/min	freq AMC	Freq AMT	P	OR et 95%IC
rs1800896	IL10	1	A/G	0.418	0.397	0.563	1.09(0.81 - 1.45)
rs1800872	IL10	1	C/A	0.243	0.282	0.232	0.82(0.59 - 1.35)
rs1800871	IL10	1	C/T	0.243	0.282	0.232	0.82(0.59 - 1.13)
rs2222202	IL10	1	C/T	0.407	0.392	0.667	1.06(0.80 - 1.42)
rs11591147	PCSK9	1	G/T	0.027	0.005	0.019	5.16(1.12- 23.73)
rs11206510	PCSK9	1	T/C	0.175	0.184	0.730	0.94(0.65 - 1.36)
rs1122608	LDLR	19	G/T	0.264	0.279	0.639	0.92(0.67 - 1.28)

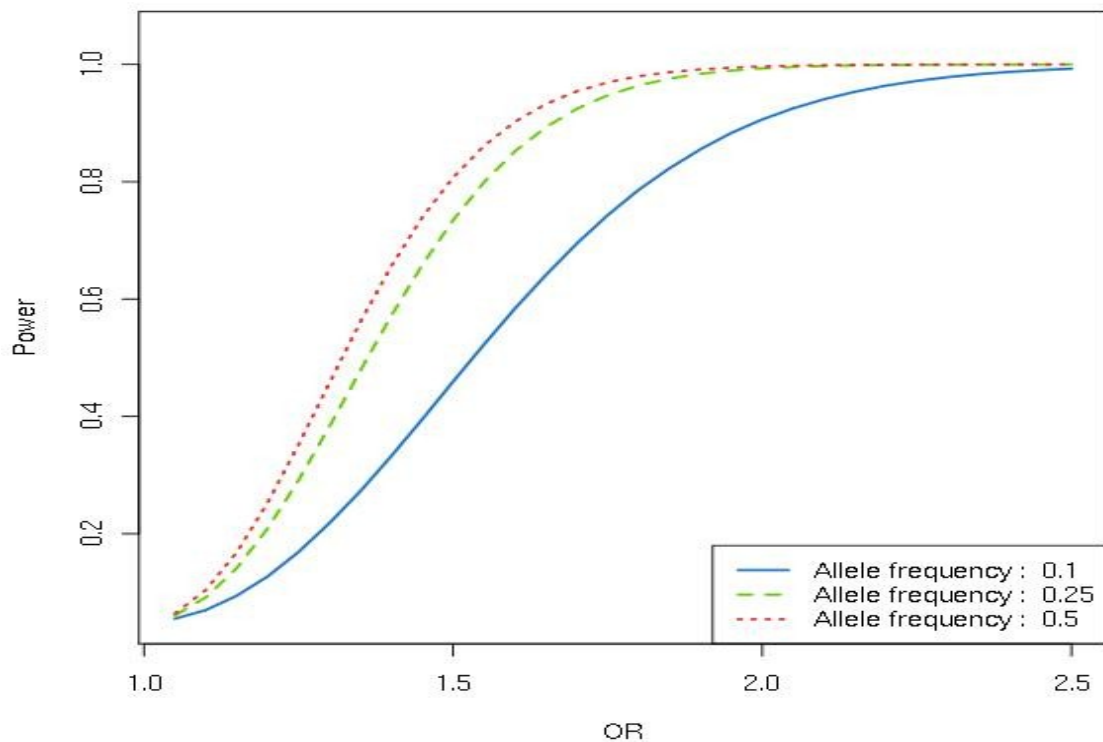
«tagSNP» choisis à partir des Gènes connus dans la pathogénie de la SVAC

SNP	Gène	CHR	Allèle Maj/ min	freq AMC	Freq AMT	P	OR
rs37460	CTSS	1	C/G	0.466	0.503	0.308	0.86 (0.65 - 1.45)
rs37457	CTSS	1	T/C	0.091	0.095	0.856	0.95 (0.58 - 1.56)
rs37453	CTSS	1	T/C	0.426	0.410	0.667	1.06 (0.80 - 1.42)
rs2906466	CTSS	1	C/T	0.278	0.226	0.103	1.31 (0.95 - 1.83)

rs3791085	CTSS	1	T/C	0.127	0.110	0.486	1.18 (0.74 - 1.85)
rs6694531	CTSS	1	C/A	0.476	0.466	0.783	1.04 (0.78 - 1.39)
rs11576175	CTSS	1	G/A	0.103	0.105	0.925	0.98 (0.61 - 1.59)
rs6556154	MSX2	5	T/C	0.384	0.384	0.986	1.00 (0.74 - 1.34)
rs11134868	MSX2	5	G/A	0.407	0.424	0.649	0.93 (0.70 - 1.25)
rs7703976	MSX2	5	G/C	0.290	0.324	0.304	0.85 (0.62 - 1.16)
rs1567202	MSX2	5	C/T	0.390	0.389	0.987	1.00 (0.74 - 1.34)
rs2381939	MSX2	5	G/A	0.156	0.126	0.239	1.28 (0.85 - 1.93)
rs11740641	MSX2	5	C/A	0.114	0.107	0.797	1.06 (0.67 - 1.67)
rs17063892	MSX2	5	T/C	0.093	0.095	0.919	0.97 (0.60 - 1.59)
rs17063894	MSX2	5	C/T	0.283	0.236	0.146	1.27 (0.92 - 1.76)
rs1050239	LRP5	11	G/A	0.206	0.216	0.750	0.95 (0.67 - 1.34)
rs64388	LRP5	11	G/C	0.306	0.260	0.167	1.25 (0.91 - 1.72)
rs2508836	LRP5	11	C/T	0.259	0.295	0.275	0.84 (0.61 - 1.52)
rs312023	LRP5	11	A/G	0.466	0.492	0.465	0.90 (0.68 - 1.20)
rs314756	LRP5	11	A/G	0.058	0.082	0.193	0.69 (0.39 - 1.21)
rs312792	LRP5	11	G/T	0.426	0.400	0.468	1.11 (0.83 - 1.49)
rs624947	LRP5	11	A/G	0.314	0.290	0.484	1.12 (0.82 - 1.53)
rs638051	LRP5	11	A/G	0.412	0.371	0.246	1.19 (0.89 - 1.59)
rs11826287	LRP5	11	T/C	0.198	0.187	0.686	1.08 (0.75 - 1.55)
rs4930573	LRP5	11	C/G	0.299	0.226	0.023	1.46 (1.05 - 2.02)
rs554734	LRP5	11	T/G	0.338	0.317	0.552	1.10 (0.81 - 1.49)
rs3736228	LRP5	11	C/T	0.149	0.150	0.959	0.99 (0.66 - 1.48)
rs2472429	LRP5	11	T/C	0.115	0.104	0.640	1.12 (0.70 - 1.77)
rs199501	WNT3	17	G/A	0.291	0.279	0.713	1.06 (0.77 - 1.45)
rs2074404	WNT3	17	T/G	0.296	0.282	0.655	1.07 (0.78 - 1.47)
rs2074405	WNT3	17	C/A	0.262	0.242	0.530	1.11 (0.80 - 1.54)
rs199496	WNT3	17	G/A	0.100	0.089	0.604	1.14 (0.70 - 1.85)
rs11658976	WNT3	17	A/G	0.349	0.389	0.251	0.84(0.67 - 1.13)
rs11655598	WNT3	17	C/G	0.265	0.258	0.835	1.03 (0.75 - 1.43)
rs12452064	WNT3	17	G/A	0.421	0.426	0.874	0.98 (0.73 - 1.30)
rs199495	WNT3	17	G/A	0.426	0.437	0.761	0.96 (0.72 - 1.27)
rs199494	WNT3	17	A/G	0.436	0.421	0.667	1.06 (0.80 - 1.42)
rs10432043	WNT3	17	C/T	0.309	0.332	0.515	0.90 (0.67 - 1.23)

rs12938683	WNT3	17	G/A	0.095	0.095	0.981	1.01 (0.62 - 1.63)
rs11079737	WNT3	17	G/A	0.305	0.278	0.414	1.14 (0.83 - 1.56)
rs3933653	WNT3	17	C/T	0.227	0.260	0.290	0.84 (0.60 - 1.16)
rs3916033	WNT3	17	T/C	0.378	0.423	0.201	0.83 (0.62 - 1.11)
rs3851781	WNT3	17	C/T	0.471	0.482	0.765	0.96 (0.72 - 1.27)
rs8069437	WNT3	17	C/T	0.201	0.226	0.396	0.86 (0.61 - 1.22)
rs9894638	WNT3	17	T/C	0.193	0.209	0.586	0.90 (0.63 - 1.29)
rs1373089	WNT3	17	T/C	0.497	0.484	0.718	1.05 (0.79 - 1.40)
rs6140076	BMP2	20	G/A	0.368	0.359	0.803	1.04 (0.77 - 1.40)
rs235706	BMP2	20	A/G	0.481	0.455	0.469	1.11 (0.83 - 1.48)
rs2206916	BMP2	20	C/T	0.404	0.403	0.952	1.01 (0.75 - 1.35)
rs2206917	BMP2	20	A/G	0.407	0.384	0.514	1.10 (0.82 - 1.47)
rs235730	BMP2	20	G/A	0.396	0.379	0.613	1.08 (0.80 - 1.44)
rs1980499	BMP2	20	T/C	0.492	0.492	0.999	1.00 (0.75 - 1.33)
rs1979855	BMP2	20	T/C	0.190	0.184	0.825	1.04 (0.72 - 1.50)
rs7270163	BMP2	20	A/G	0.122	0.095	0.222	1.33 (0.84 - 2.11)
rs235767	BMP2	20	T/G	0.426	0.395	0.382	1.14 (0.85 - 1.52)
rs1005464	BMP2	20	G/A	0.194	0.210	0.575	0.90 (0.63 - 1.29)
rs3178250	BMP2	20	T/C	0.230	0.226	0.900	1.02 (0.73 - 1.43)
rs170986	BMP2	20	C/A	0.191	0.139	0.054	1.46 (0.99 - 2.15)
rs235772	BMP2	20	T/C	0.367	0.389	0.524	0.91 (0.68 - 1.22)
rs6117432	BMP2	20	C/T	0.204	0.237	0.271	0.82 (0.58 - 1.16)
rs173107	BMP2	20	G/T	0.349	0.358	0.802	0.96 (0.71 - 1.30)
rs235757	BMP2	20	A/G	0.344	0.352	0.820	0.97 (0.71 - 1.30)
rs235756	BMP2	20	T/C	0.386	0.382	0.895	1.02 (0.76 - 1.36)
rs6085681	BMP2	20	G/A	0.360	0.397	0.286	0.85 (0.63 - 1.43)
rs6054516	BMP2	20	C/T	0.116	0.147	0.208	0.76 (0.50 - 1.16)
rs6085684	BMP2	20	A/T	0.434	0.476	0.241	0.84 (0.63 - 1.22)
rs235737	BMP2	20	G/A	0.391	0.292	0.004	1.56 (1.15- 2.11)
rs235740	BMP2	20	T/G	0.130	0.155	0.313	0.81 (0.54 - 1.22)
rs235742	BMP2	20	A/T	0.148	0.147	0.976	1.01 (0.67 - 1.50)

CHR : chromosome; allèle min : allèle mineure; Freq AMC : fréquence de l'allèle mineure chez les cas; Freq AMT : fréquence de l'allèle mineure chez les témoins; allèle maj : allèle majeure ; SE; déviation standard; L95 : limite inférieure de l'IC; U95 : limite supérieure de l'IC.

Graphique de puissance pour détecter une association au seuil 0,05

Ce graphique illustre la puissance des études en fonction du risque représenté sous forme d'OR. Chacune des courbes représente une fréquence allélique. Au seuil de significativité $p=0,05$; pour un $OR=1,5$ et une fréquence allélique de 0,1, on obtient pour l'étude une puissance de 40%. Tandis qu'avec les mêmes valeurs du seuil de significativité et OR en choisissant une fréquence allélique de 0,25 ou 0,5, on obtient des études avec des puissances plus élevées respectives d'environ 75 et 80%.

DIFFÉRENTS POOLS DE SNP ET AMORCES POUR GENOTYPAGE**1er Pool de Génotypage**

SNP	Sens	Anti-sens	Élongation	Allèle le1	Allèle le2
rs3736228	ACGTTGGATGTCTTGGCAGA GCCTTGACG	ACGTTGGATGAGACTGTCAGG ACCGCTCA	TCACCGTCACAGTCC	T	C
rs554734	ACGTTGGATGTGAAGGACGG GTGTGGGGAT	ACGTTGGATGTTTCCACAGCCC AGCTGGGT	ATGGCGTCTCCTCGG	G	T
rs64388	ACGTTGGATGAGGGAGTGA GGATGAATGAG	ACGTTGGATGTGGACGATGAC TGTCAGAAG	TGAATGAGCCAGGCA	G	C
rs3916033	ACGTTGGATGTCCCACACAT ACCTCCAC	ACGTTGGATGAAGCTTGCTC CTGGCAGAA	gACCTCCACCCCCTA	C	T
rs2074405	ACGTTGGATGACTACCATC AATGGAGTCG	ACGTTGGATGCCAGCTTTATA CATCCGTC	GGAGTCGGTGGACAAT	C	A
rs638051	ACGTTGGATGGACATAGCTC TGAGAGCCAC	ACGTTGGATGTTTGGGCAGTG GGCTTAGCG	ccCCACCGGCCAGGGCA	G	A
rs6694531	ACGTTGGATGGCTTACTTTAT ATTAGGCTC	ACGTTGGATGACCTCATGAAG GTTGGGATG	TAGGCTCTGTTCTTTGG	C	A
rs627174	ACGTTGGATGTGCAGGCTCG TTCAGGAAAC	ACGTTGGATGAGCCACTGTCC CCGCCATT	cccAACACCCGCTGAGTA	C	T
rs11206510	ACGTTGGATGAGGAAGAGG AGCCAAAGACG	ACGTTGGATGTGCTTCCCAA GGATATAGG	ACGGCCACCACAGACATC	T	C
rs199501	ACGTTGGATGAAAGGCTCAG AGTTAAGCCG	ACGTTGGATGAAGCCAGCTCT TCCCTGTTG	ccaAGGCAACGTGAGGGA	G	A
rs17063894	ACGTTGGATGAGTATCTCTA GGGGTTGAGG	ACGTTGGATGGGGTCCTGTGA CCTACATAT	gtGGTTGAGGGAACACA	C	T
rs235730	ACGTTGGATGACCAGGAGAT GTCTGAATTG	ACGTTGGATGGCTTCTATCTA AAAGTGC	GATGTCTGAATTGCATTCC	G	A
rs3851781	ACGTTGGATGCTCGCTGTCT GCCTCAGTTT	ACGTTGGATGACACTCTGGCA TCTGGATAC	tcccCCACCTTTGTCACTGA	C	T
rs11591147	ACGTTGGATGACTACGAGGA GCTGGTGCTA	ACGTTGGATGTGGCTGTGGTT CCGTGCTC	ttatCTGGTGCTAGCCTTGC	G	T
rs6140076	ACGTTGGATGCATCAACATA ATTTCTCTAGC	ACGTTGGATGCCAAGGCCACC AGATGATTA	TAATTTCTCTAGCTACCACA C	A	G
AMG_mid100	ACGTTGGATGGGCTTGAGGC CAACCATCAG	ACGTTGGATGCCCTCATCCTGG GCACCTGG	aatgGGGACCACTTGAGAA AC	G	T
rs1800896	ACGTTGGATGGACAACACTA CTAAGGCTTC	ACGTTGGATGTGGATAGGAGG TCCCTTACT	ggggCTAAGGCTTCTTTGGG A	A	G
rs11079737	ACGTTGGATGGAGTTAGGGC ACCTGAGAC	ACGTTGGATGTGAGACTCAGA ACAGTTCAG	ccGCCACCATCTTGATATTA GG	G	A
rs6117432	ACGTTGGATGCTCTGAGGTG CTTAAGCAGT	ACGTTGGATGAGGACATGGG GCAAACGCAA	aaaAAGACACTGACTTTAA CAC	C	T
rs235757	ACGTTGGATGGAACCCTGC CTGGAAATGA	ACGTTGGATGTCTGCTGTGCT GGAATTAAG	gggtAACCAGGAAAGTAGC TGA	A	G
rs235742	ACGTTGGATGCTATGTCCTG AAACTTAAGTG	ACGTTGGATGGTGTGAGTCTT TAATCAAGAG	attcAACTTAAGTGTCAAGG TGC	A	T
rs13157633	ACGTTGGATGCTTAGGTTCTC CTTTCTCCC	ACGTTGGATGTTACACGTTACC TCCCAGAG	tccaACAGCTCTGACGCTTC CTTT	G	C
rs199496	ACGTTGGATGTGGAGCCTGG GTGTCTGTAT	ACGTTGGATGGGTCAGGGATG CAGGCTATA	tttggACCACCCCAAGTGAT CTGC	G	A
rs235756	ACGTTGGATGCTTCTCAGCTG AAAGAGAAC	ACGTTGGATGCAGAAAGATTT TCCTTTGGGC	GACTAAGAATTCTAGAATC CTCTC	T	C
rs1800872	ACGTTGGATGAAGCAGCCCT TCCATTTTAC	ACGTTGGATGCCTGGAACACA TCCTGTGAC	gggaaAGAGACTGGCTTCTC ACAG	C	A
rs235767	ACGTTGGATGGGCTGCAAAA	ACGTTGGATGATTAGGACTTC	cAAATAAGACAACAATGAT	G	T

	ATGTGGGAAA	ACTTTTGG	ATCTGA		
rs951281	ACGTTGGATGAATGCATATTT GTGTCTCGG	ACGTTGGATGAGCCTGGGTAA CAGTGAGAC	ACAAACATTCATTTTCTTTC TTTTTG	C	A
rs6254	ACGTTGGATGCTGTTTTGCCT TGGAATTGG	ACGTTGGATGAGAGGGCCACT TCCCATTAG	cTTTTAATGTTGACTTTAT CATTTC	A	G
rs910141	ACGTTGGATGTGCCATTGGA CGAAGGTTCT	ACGTTGGATGTGGAAAATTCA AGGAGTGGC	ggggtAAGGTTCTTATTTTCA CATCA	G	T
rs11576175	ACGTTGGATGAGGTAGAGCT CTTTAAATGC	ACGTTGGATGACTAGAAAAGTA ACACGTGGG	gttgGCTACAGAATTTGACA GTGAAT	G	A
rs2381939	ACGTTGGATGGACTTCTGCTT ATGAAAAAC	ACGTTGGATGCACTTTGAATA ATCTCTCC	cgagGAAAAACAAAGAAAC AGACACA	A	G
rs170986	ACGTTGGATGGAACAGACA TTGCTGATCT	ACGTTGGATGCTATGGATCCT GCTTTATTC	acTTGCTGATCTATTATAGA AACTCTC	C	A
rs1005464	ACGTTGGATGAGGAGAAAA AATAGACGAGC	ACGTTGGATGGATTCAGTGG GTGCAGTGG	aagAATAGACGAGCAAATA ATAATAGG	G	A
rs6085684	ACGTTGGATGGTTATTCCAGT TCTTTTGC	ACGTTGGATGGGTATTTTGTG GATACAGG	gggTATTCCAGTTCTTTTGC TTTTCCAT	A	T
rs2472429	ACGTTGGATGCAAGGCGTAT GTGATTATCC	ACGTTGGATGGGTAACCTTGC TGTGGAGTC	ACTATGTTGAAAAAATGAT TCTATATAA	T	C

2^e pool de génotypage

SNP	Sens	Anti-sens	Élongation	allèle 1	allèle 2
rs314756	ACGTTGGATGAGGAGATGGT CACAGCTAAG	ACGTTGGATGTCGTTATCTGTT TGGACCTG	ATCTCATCCCCTGCC	G	A
rs6556154	ACGTTGGATGCATTGAACGT CGTCTGTTCC	ACGTTGGATGTTTCTCCCTCCT TCTTTGAC	GTTCCAGCAGGGCCA	C	T
rs10432043	ACGTTGGATGATGTCAGTGC ACATTAGCCC	ACGTTGGATGCCATGGTGATT TGAGCCTTC	TTCCCCAGGAATCAC	C	T
rs2206917	ACGTTGGATGCTCAGAAAAAC AGTGTGGAGC	ACGTTGGATGTGAGTGTGCTT TAATGAAC	gGTGGAGCACAGCAAG	A	G
rs2074404	ACGTTGGATGGGGACTTCTT TGCCTTCTC	ACGTTGGATGAGTGTGAGAAG TCCCCTTG	ggCCTTCCCCTCAGCAC	G	T
rs235740	ACGTTGGATGCCATTAGTTTG AGTTCTTCC	ACGTTGGATGATCCAACTGT CCAGGTTTC	GAGTTCTTCTGTTTCT	G	T
rs199497	ACGTTGGATGCTCCCTGCCTC ACACCTGA	ACGTTGGATGTAAGAGAGTGG ATGGGACAG	CCTCACCTGATAGCAC	C	T
rs3933653	ACGTTGGATGCCATACCCTC ATGTCAAAC	ACGTTGGATGGCGGAAGTGAT TGTAGCTG	caaAGTCACCCCAATGCC	T	C
rs1544410	ACGTTGGATGAGCCCAGTTC ACGCAAGAG	ACGTTGGATGTAGATAAGCAG GGTTCCTGG	GCCTGAGTATTGGGAATG	G	A
rs624947	ACGTTGGATGAACGCTGCTC CCTGTCCCTT	ACGTTGGATGTAGGGAGTCAG GTGCCTTC	aaaaTGTCCTTGGGGTCC	G	A
rs6054516	ACGTTGGATGAGGAGCCACT AAATCCAGTC	ACGTTGGATGGACAGTCTCTTC AAAAGGTG	cAGTGGGAAGGGGTATTG A	C	T
rs8069437	ACGTTGGATGTCTGTGTGG CATGGCTGGT	ACGTTGGATGTGTCTAGGAGC CATTCTCAG	ggttTGCCCTCCATCCCCG	T	C
rs2508836	ACGTTGGATGGAGTAGGTGA CTGAGTGATA	ACGTTGGATGCATAACCTGGG AGGGTGACA	CGTTCTCAAGAATTTGAAC A	C	T
rs7412	ACGTTGGATGGCCCCGGCCT GGTACACTG	ACGTTGGATGTAAGCGGCTCC TCCGCGAT	ccgaCTGGTACTACTGCCAG GC	T	C
rs659605	ACGTTGGATGGGGTGAATCT GTAGGTGTT	ACGTTGGATGAAAAACCTCAG AGGCCTTGC	tAATCTGTAGGTGTTTACTG A	G	A
rs7703976	ACGTTGGATGATCCTTCTGGC TGTTTCCCG	ACGTTGGATGCCAGATTTAGC ACAACCCAG	TCTTCCCTTCTTCTTAAGT AT	G	C

rs7270163	ACGTTGGATGTTAACTCACTG CTTGTGTGG	ACGTTGGATGTGCAAGCCAGG AAGAGGGTG	cccaAGCCAGGGATTCCCCT TT	A	G
rs12452064	ACGTTGGATGGTGAGCGTGT GTTTTGGAAC	ACGTTGGATGGTCCACCTTGG CAGAAATCA	tatcAAACGCGAGCGCAGT AGC	G	A
rs11655598	ACGTTGGATGTTCTTCTTCAT GGCTGCTGG	ACGTTGGATGTTGGCCTCTCA GCAAATCTC	ccccCAGGGAAGTTTTGCT TCT	G	C
rs2222202	ACGTTGGATGAAATGTGCAG GAAACCTGCC	ACGTTGGATGAGCGCCAGCAG GATCTTATA	GCCTTATAAAGTAAATGCG TTCT	C	T
rs6085681	ACGTTGGATGCAAGCTTTTAT CAACTCACG	ACGTTGGATGTGAGGTAGTAG TGCCACCCA	ttcCACGTATTTTCGAAGGG TTA	A	G
rs1122608	ACGTTGGATGCACAGTGCTC TCATTTCTGTC	ACGTTGGATGTGTCTCACGTG CCTGTGCTG	ggggTTCGTCGTGTAAGG GCCA	G	T
rs2206916	ACGTTGGATGAATCTTGACA TTTGTATGG	ACGTTGGATGTGCTCCCAGCT GTGTTCTTT	gaTTGACATTTGTATGGAA CAACA	T	C
rs17063892	ACGTTGGATGTTCCCTCAACC CCTAGAGAT	ACGTTGGATGGTGTCCATCCAT ACTAGCCTG	ccccCAACCCCTAGAGATA CTAAG	T	C
rs1979855	ACGTTGGATGCACATGTAC GTAAAGCAGG	ACGTTGGATGATATGCAACCG AAGGGCCAC	TCCATGTCACATACATAGA CATATT	T	C
rs9894638	ACGTTGGATGGAGGGTGGA CCTAAGAGATT	ACGTTGGATGAGCCCAGTCTC CCTTATTCT	ccaaCTAAGAGATTAAGTCA TGGTC	T	C
rs312792	ACGTTGGATGGGCTGTATAT TGTGATTCCG	ACGTTGGATGGGCAAACACTT TTGATGGAC	tggGATTCCGTTTATATGAG ATGTT	G	T
rs12938683	ACGTTGGATGTGTGTGCCGG GAAATGTTTG	ACGTTGGATGACATGTGGCTA CCTCTAACC	gattGACACCTGTGGTTGCT TTTAAC	G	A
rs693	ACGTTGGATGCACATGAAGG CCAAATTCCG	ACGTTGGATGGAAGTTCCTGC TGAATGTCC	ggggTGAAGGCCAAATTCC GAGAGAC	C	T
rs1800871	ACGTTGGATGGACCCTACC GTCTCTATTT	ACGTTGGATGGGTGTACCCTT GTACAGGTG	taggGAGCAAAGTGGAGCA CAGAGAT	T	C
rs1050239	ACGTTGGATGCAGGTTACCG TGTGTACCAA	ACGTTGGATGAGGATGTAGGT CTCATGGTC	cctcACCAAATAGATGGAAA CTACTCC	A	G
rs173107	ACGTTGGATGCGGTAAGATG TTTCAGGAGC	ACGTTGGATGTGAACTTGTGA ACACATGTC	TGTTATAAATACACAATCTT TATAGAT	G	T
rs37460	ACGTTGGATGCTACTATATGC CCAGTGGTG	ACGTTGGATGCCGGATTAGAT TATCTAAGC	tactcTATGCCAGTGGTGC ACTAGGTA	G	C
rs37453	ACGTTGGATGGTAAGATATA TTTGGGAAGC	ACGTTGGATGACAAAACCCCA GATACTGC	cctcTTGGGAAGCAAATA ATAGAGAG	C	T

3e pool de génotypage

SNP_ID	Sens	Anti-sens	Élongation	allèle 1	allèle 2
rs11740641	ACGTTGGATGTCAGAGTCAG AACTCTCTCC	ACGTTGGATGTTTACAGTATG GTCCAGTAG	CCCTTGCATCCCTCT	C	A
rs312009	ACGTTGGATGTCTTGGACTC AAGTGGATGG	ACGTTGGATGTCCTCTATGACA GGCCATCC	CCTGCTCAGGGCTCC	T	C
rs4930573	ACGTTGGATGTGTTTCCTGAA CGAGCCTGC	ACGTTGGATGTGGATGCGCCA GTGTTCTC	CCCTCATGTGAGATGG	G	C
rs11658976	ACGTTGGATGTCTGGTGGAG GCTTTTAATG	ACGTTGGATGAACACCAGCGT GGCAGGAT	AGTTTCTGGACTCCTC	G	A
rs1980499	ACGTTGGATGAGAAGTACCC ATTTTCCCTC	ACGTTGGATGGTCTTGACAGTT TAGAACTTC	TGACAAGGTTTCCACTTA	C	T
rs11826287	ACGTTGGATGCGACATCATT CACTCTTCTC	ACGTTGGATGCCTAAACGAGG GCATTCAAG	ggCTTCTCCAGAGTGTGC	C	T
rs1567202	ACGTTGGATGCTGGCAAAC CTAAGCAATG	ACGTTGGATGTGAAAGGAGA GGCCACTTGC	ATGCATTCTCTACCTAAC	C	T
rs199495	ACGTTGGATGGTGAGCATCC	ACGTTGGATGCTTCTTAGCTG	TTTGCAGACAGAACTTCCA	G	A

	TGTACCTTTG	TGCAGTGG	C		
rs312023	ACGTTGGATGTCCGAAGTCA CTGTTCCCTC	ACGTTGGATGCTCCTTGTCATC CCAGACCT	GTCTTCATCCATTAATGG G	G	A
rs34599882	ACGTTGGATGTAGCCTCTAA AACGCAAATC	ACGTTGGATGGCAAACAGCAG GAATTCCTA	aGCAAATCATTGCTAAGGG TT	C	G
rs199494	ACGTTGGATGCTACACAACG TGTGTTTCCC	ACGTTGGATGTCTGTCTGCATT CTACTTAC	ccGAAGAAATGCCTTCCTA CTT	G	A
rs3178250	ACGTTGGATGGTGAACCTAA CAGTAGCACT	ACGTTGGATGTGAAAAGTCTA CATGGAAGG	ttacCGTGCTAAGCACTTTG CC	T	C
rs235706	ACGTTGGATGAGCTTCCTCTT ATCCATGTG	ACGTTGGATGACCACTTAAAA CAGTGCCTG	ggcgAGTGTTTTGAAGACC AC	G	A
rs1373089	ACGTTGGATGCATCACGGCC ATATTTGCAG	ACGTTGGATGATTTAGAAAGA GGTCCCTCC	tgttATTGTTTTCTGACAGTT GG	T	C
rs2906466	ACGTTGGATGTATTTTCAGTA GGTACCTGC	ACGTTGGATGATAGAGCACTC TGCTCTTCC	gagggGTTGAAATCCTTGGG TAC	T	C
rs3791085	ACGTTGGATGTAATCCACAT CTTGTCTG	ACGTTGGATGCATTATAGGGA ACTGGCAGG	cctaCACATCTTGTCTGAGC TTAC	C	T
rs11134868	ACGTTGGATGGTAGTGGCAT ATTATAATGCG	ACGTTGGATGTGGTAGCAGTA ACAATTTGG	cTAATGCGTTTAACCATTTT CTAA	G	A
rs235737	ACGTTGGATGGAAAATCTTTT GCCATTTCA	ACGTTGGATGTCAGAGTCCCA GAAGGAAAG	gagaTTTTGCCATTTTCATTTT TGAT	A	G
rs235772	ACGTTGGATGCTACATTACCT AAGCAATCC	ACGTTGGATGGCCCTTTGAATT GTGCACAT	TCCATATTTTTCCCTCAAT TTATTA	C	T

AMG_mid100 représente le SNP qui permet de valider le sexe des individus.