



HAL
open science

Identification des bases génétiques des malformations anévrysmales de la veine de Galien

Alexandre Vivanti

► **To cite this version:**

Alexandre Vivanti. Identification des bases génétiques des malformations anévrysmales de la veine de Galien. Génétique humaine. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS568 . tel-01988414

HAL Id: tel-01988414

<https://theses.hal.science/tel-01988414>

Submitted on 21 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Identification des bases génétiques des malformations anévrysmales de la veine de Galien

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à la Faculté de Médecine Paris-Sud

École doctorale n°568 : signalisations et réseaux
intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat: recherche clinique,
innovation technologique, santé publique

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre, le 19 décembre 2018, par

Alexandre Vivanti

Composition du Jury :

Pr. Xavier Jeunemaître, PU-PH Université Paris Descartes, Inserm	Président
Pr. Alain Verloes, PU-PH Département de génétique clinique, CHU Robert Debré	Rapporteur
Pr. Elisabeth Tournier-Lasserre, PU-PH Université Paris Diderot, Inserm	Rapporteur
Dr. Marcel Tawk, CR Université Paris Saclay, Inserm	Examineur
Dr. Augustin Ozanne, PH Service de neuroradiologie interventionnelle, CHU de Bicêtre	Examineur
Pr. Alexandra Benachi, PU-PH Université Paris Saclay, Inserm	Membre invité
Pr. Judith Melki, PU-PH Université Paris Saclay, Inserm	Directrice de thèse

Remerciements

A ma Directrice de Thèse, le Professeur Judith Melki. Vous avez accepté il y a quelques années de diriger mon travail. Vous m'avez transmis la culture et la rigueur de la recherche. Vous m'avez également fait comprendre à quel point la recherche était nécessaire pour améliorer la pratique clinique quotidienne, et réciproquement. Il m'est aujourd'hui impossible de concevoir une vie de médecin sans pratique de la recherche. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Aux Professeurs Xavier Jeunemaître, Alain Verloes et Elisabeth Tournier-Lasserre. Je vous remercie d'avoir aussi promptement accepté de suivre et de juger mon travail.

Au Docteur Marcel Tawk. Merci pour ton aide précieuse, ton expertise, ta bonne humeur et toutes ces heures passées à mes côtés à admirer la vascularisation du *Danio rerio*.

Aux Docteurs Augustin Ozanne et Guillaume Saliou. Votre expertise, votre engouement et votre disponibilité ont été des moteurs essentiels à la bonne conduite de nos recherches et je vous en remercie sincèrement.

Au Professeur Marie-Victoire Senat, aux Docteurs Hélène Maurey et Jelena Martinovic. Je vous remercie pour votre aide au recrutement des patients.

Au Professeur Alexandra Benachi, merci pour votre confiance et votre soutien quotidien.

A mes collègues et amis médecins (Anne-Gaël, Alexandra, Lina, Aurore, Julien, Marie, Sarah, Antoine), sages-femmes, infirmières, auxiliaires et ARC (Adèle !). Je suis très heureux de vous avoir rejoint à Béclère. Je sais que l'on peut systématiquement compter les uns sur les autres et j'apprécie cet esprit d'entraide. Merci de me faire grandir chaque jour un peu plus dans la pratique de l'obstétrique.

A mes collègues de laboratoire, Cynthia, Loïc et Jérôme. Merci de votre aide et de m'avoir transmis vos connaissances techniques et pratiques. Et merci également d'avoir pris sur vous pour écouter toutes mes histoires de gardes !

A mes amis féneloniens : Delphine, Stéphanie, Capucine, JB, Djédjé, Riton, Christophe, Louis et Guillaume. Nous ne nous voyons que trop rarement faute de temps mais je pense souvent à vous.

Je tiens vivement à remercier l'Inserm pour m'avoir accordé un poste d'accueil qui m'a permis de mener ces travaux de recherche, et l'Agence de Biomédecine qui a soutenu ces travaux.

A mes parents et à mes frères. Le « 2^{ème} précieux » est enfin arrivé après trois années d'études et d'efforts. Même si la distance avec Cassis n'est pas toujours évidente, vous avez su m'encourager dans tous les domaines de la vie, tant professionnelle que personnelle. Je suis fier de vous ressembler.

A mon épouse Maud. Il s'est passé tellement de choses depuis notre rencontre. Nous avons mené de très beaux projets ensemble. Je dois une fois de plus te remercier pour le soutien indéfectible dont tu me fais part. Je suis extrêmement fier d'être ton mari tout comme je suis fier du médecin que tu es devenu. Merci également de me donner le temps d'avancer dans mes projets professionnels.

A Hugo et Julia, vous êtes ma plus belle réussite. Je vous aime.

Plan

Figures	P8
Tableaux	P10
Partie I : Malformations vasculaires cérébrales pédiatriques	P11
I. Rappels anatomiques et embryologiques	P12
a. Structure générale des vaisseaux	P12
b. Embryologie vasculaire cérébrale : généralités	P13
i. Développement artériel cérébral	P13
ii. Angioarchitecture veineuse cérébrale	P14
1. Système veineux superficiel	P14
2. Système veineux profond	P15
II. Malformations vasculaires cérébrales de l'enfant	P17
a. Généralités	P17
b. Malformation anevrysmale de la veine de Galien (MAVG)	P18
i. Description anatomique	P18
ii. Circonstances diagnostiques et prise en charge	P20
1. Diagnostic anténatal	P20
2. Prise en charge post-natale	P25
Partie II : Génétique des MAVG	P28
I. Introduction	P29
II. MAVG et syndrome malformations capillaires – malformations artérioveineuses	P29
III. MAVG et maladie de Rendu-Osler-Weber (télangiectasie hémorragique héréditaire)	P32
IV. MAVG récurrentes et formes familiales	P34
Partie III : Patients, matériel et méthodes	P36
I. Recrutement des patients	P37
II. Identification de gènes candidats	P37
a. Recherche de mutations ponctuelles et courtes délétions-insertions : séquençage haut débit de l'exome entier (whole exome sequencing/WES)	P37
i. Préparation des ADN	P38
ii. Préparation des bibliothèques	P38
iii. Séquençage haut débit	P40
iv. Analyse bio-informatique	P40
b. Séquençage Sanger	P41
c. Recherche d'haplo-insuffisance du gène candidat <i>EPHB4</i> par PCR en temps réel	P42
i. Population cible	P42
ii. PCR en temps réel : modalités techniques	P43
III. Validation fonctionnelle	P44
a. Etude de l'impact des mutations d'épissage sur la transcription	P44
i. Obtention des ADN complémentaires par transcription inverse	P44

ii. Amplification et séquençage	P45
b. Etude de l'impact des mutations pertes de fonction du gène <i>EPHB4</i> chez <i>Danio rerio</i>	P46
i. Modèle <i>Danio rerio</i> Tg[fli1:EGFP]y1	P46
ii. « Knockdown » du gène <i>Ephb4a</i> chez <i>Danio rerio</i> : morpholinos antisens	P50
iii. Synthèse des ARNm d' <i>EPHB4</i> et micro-injection	P51
iv. Observation des larves de <i>Danio rerio</i> , acquisition et traitement des images	P53
v. Analyses statistiques	P54
Partie IV : Résultats	P55
I. Cohorte	P56
II. Les mutations hétérozygotes du gène <i>EPHB4</i> sont responsables des MAVG	P56
a. Séquençage de l'exome entier	P56
i. Patient AA5614	P57
ii. Patient AA5615	P60
iii. Patient AA5616	P63
b. Séquençage cible du gène <i>EPHB4</i>	P64
i. Patient AA5717	P64
ii. Patient AA5718	P65
c. Recherche d'insertion/délétion dans le gène <i>EPHB4</i>	P69
d. Rechercher de mutations somatiques dans le gène <i>EPHB4</i>	P69
III. Génération et caractérisation d'un modèle animal de MAVG chez le poisson <i>Danio rerio</i>	P69
a. « Knock-down » du gène orthologue	P69
b. Caractérisation des morphants	P70
c. Réversion du phénotype morphant par micro-injection d'ARN <i>EPHB4</i> sauvage	P71
Partie V : Discussion	P75
Partie VI : Bibliographie	P90
Partie VI : Annexes	P104
- Annexe A : Vivanti A., Ozanne A., Grondin C., Saliou G., Quevarec L., Maurey H., Aubourg P., Benachi A., Gut M., Gut I., Martinovic L., Senat M.V., Tawk M., Melki J. Loss of function mutations in <i>EPHB4</i> are responsible for vein of Galen aneurysmal malformation. <i>Brain</i> . 2018;141:979–988.	P105
- Annexe B : Maluenda J., Manso C., Quevarec L., Vivanti A., Marguet F., Gonzales M., Guimiot F., Petit F., Toutain A., Whalen S., Grigorescu R., Coeslier A.D, Gut M., Gut I., Laquerriere A., Devaux J., Melki J. Mutations in <i>GLDN</i> , encoding gliomedin, a critical component of the nodes of Ranvier, are responsible for lethal arthrogryposis. <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 2016;99:928–933.	P125

Figures

Figure 1 : Vascularisation artérielle cérébrale - le polygone de Willis	P16
Figure 2 : Malformations vasculaires cérébrales de l'enfant – aspects angiographiques	P18
Figure 3 : Angioarchitecture cérébrale veineuse normale et ses modifications dans la malformation anévrysmale de la veine de Galien (MAVG)	P20
Figure 4 : Echographie obstétricale d'un fœtus porteur d'une MAVG	P23
Figure 5 : Imagerie par résonance magnétique cérébrale d'un fœtus porteur d'une MAVG dans une forme sévère	P24
Figure 6 : Embolisation trans-artérielle d'une MAVG	P27
Figure 7 : Angioarchitecture du <i>Danio rerio</i> obtenue par angiographie conventionnelle et par microscopie confocale (<i>Danio rerio</i> Tg[fli1:EGFP]y1) à 72 heures post-fertilisation	P48
Figure 8 : Anatomie vasculaire cérébrale de la larve de <i>Danio rerio</i> 72 heures post-fertilisation (vues dorsales étagées)	P49
Figure 9 : Évaluation des anomalies vasculaires cérébrales observées chez les larves de <i>Danio rerio</i> Tg[fli1:EGFP]y1	P54
Figure 10 : Arbre généalogique de la famille du patient AA5614	P59
Figure 11 : Malformation capillaire - Patient AA5614	P59
Figure 12 : Malformations capillaires - Patient AA5615	P60
Figure 13 : Arbre généalogique de la famille du patient AA5615	P61
Figure 14 : Impact sur l'épissage de la mutation NM_004444:c.2484+1G>T du patient AA5615	P62
Figure 15 : Angiographie cérébrale de la patiente AA5718 en coupe sagittale au temps artériel et veineux à l'âge de 3 mois	P66
Figure 16 : Mutations du gène <i>EPHB4</i> et domaines protéiques impactés	P66
Figure 17 : Mutations du gène <i>EPHB4</i> dans la cohorte de patients atteints d'une MAVG	P67

Figure 18 : Anomalies vasculaires cérébrales induites par l'invalidation de l'expression d'Ephb4a chez les embryons de <i>Danio rerio</i> 72 heures post-fertilisation	P72
Figure 19 : Anomalies vasculaires cérébrales induites par la répression de l'expression du gène <i>Ephb4a</i> et restauration du phénotype sauvage chez <i>Danio rerio</i>	P73
Figure 20 : Morphologie vasculaire cérébrale de la larve de <i>Danio rerio</i> sauvage et après invalidation de l'expression du gène <i>Ephb4a</i> (étage moyen et étage profond) 72 heures post-fertilisation	P74
Figure 21 : Représentation schématique de la structure des récepteurs Eph et des ligands ephrins	P77
Figure 22 : Rôle d' <i>EPHB4</i> et de <i>RASA1</i> dans la genèse des malformations artérioveineuses	P83

Tableaux

Tableau 1 : Prise en charge anténatale et accouchement – Recommandations du centre de référence des maladies neurovasculaires malformatives de l'enfant du CHU de Bicêtre	P25
Tableau 2 : Score néonatal de Bicêtre	P27
Tableau 3 : Caractéristiques des SNP étudiés afin d'établir une cartographie d'homo/hémizygotie vis-à-vis du gène candidat <i>EPHB4</i>	P43
Tableau 4 : Amorces employées pour la recherche d'haplo-insuffisance du gène candidat <i>EPHB4</i> par qPCR	P44
Tableau 5 : Amorces employées pour amplifier les cDNA et étudier l'impact sur l'épissage des mutations de la jonction intron-exon du gène <i>EPHB4</i>	P46
Tableau 6 : Oligonucléotides morpholinos antisens employés pour réprimer l'expression du gène <i>Ephb4a</i> chez <i>Danio rerio</i>	P50
Tableau 7 : Amorces employées pour amplifier la région d'intérêt du cDNA d' <i>EPHB4</i> de la patiente AA5614	P53
Tableau 8 : Haut niveau de conservation protéique de la région impliquée par la mutation d'épissage du patient AA5615	P63
Tableau 9 : Caractéristiques cliniques et génétiques des patients de la cohorte MAVG porteurs d'une mutation du gène <i>EPHB4</i>	P68

Partie I

Malformations vasculaires cérébrales pédiatriques

I. **Rappels anatomiques et embryologiques**

L'appareil cardio-vasculaire est essentiel pour le transport des nutriments et de l'oxygène vers les différents organes, la régulation de la température corporelle ainsi que pour sa participation à la réponse immunitaire. Il assure également le transport et l'élimination des déchets. Il s'agit d'un système clos contenant schématiquement une pompe (le cœur) ainsi qu'un système de canalisations (artères, veines et capillaires). A ce réseau artériel et veineux s'ajoute un réseau parallèle, le système lymphatique, dont la principale fonction est sa participation essentielle à la réponse immunitaire.

a. **Structure générale des vaisseaux**

L'ensemble des artères et des veines du corps sont constituées de composantes histologiques différentes. L'intima correspond à la tunique (paroi) circulaire la plus interne, composée de l'endothélium (épithélium unistratifié de cellules endothéliales). La media est la tunique intermédiaire, composée de tissu conjonctif ainsi que de cellules musculaires lisses (artères de petit et moyen calibre). L'intima et la media sont séparées l'une de l'autre par la limitante élastique interne. L'adventice est la tunique la plus externe, également composée de tissu conjonctif ainsi que de fibres nerveuses (système nerveux sympathique et parasympathique responsable de la vasomotricité). Cette dernière comporte également des *vasa vasorum* (vaisseaux nourriciers). Ceux-ci sont indispensables pour irriguer les artères dont le calibre dépasse le millimètre. Les *vasa vasorum* couvrent les besoins de l'adventice ainsi que des deux tiers externes de la media. L'intima et le tiers interne de la media sont irrigués par le sang circulant à l'intérieur du vaisseau. La media et l'adventice sont séparées par la limitante élastique externe.

b. Embryologie vasculaire cérébrale : généralités

i. Développement artériel cérébral

Le développement du système cardiovasculaire se déroule durant la période embryonnaire, de la 5^{ème} à la 10^{ème} semaine d'aménorrhée (SA) chez l'Homme. Il découle de la succession de deux grands processus : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse correspond au mécanisme qui aboutit à la différenciation d'hémangioblastes (agrégats cellulaires mésodermiques) en angioblastes et qui permet la formation des vaisseaux primitifs. L'angiogenèse permet le développement de néo-vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. La croissance de ces néo-vaisseaux s'effectue par bourgeonnement guidé par différents facteurs de croissance, dont certains sont pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, TNF, FGF) et d'autres anti-angiogéniques (angiostatine, thrombospondine).¹

Le développement de la circulation cérébrale démarre de façon concomitante à la formation des principaux vaisseaux dès la 5^{ème} SA. Six arcs aortiques primitifs proviennent du sac aortique, lui-même situé à la surface ventrale embryonnaire. Leur formation et leur involution s'effectuent de façon séquentielle selon un gradient cranio-caudal à partir de la 6^{ème} SA. Ces arcs assurent la liaison entre les aortes ventrales ou dorsales (paires). Les artères carotides primitives ainsi que la portion proximale des carotides internes dérivent du troisième arc. Leur développement s'effectue en direction du prosencéphale. L'artère carotide interne donnera naissance à l'artère ophtalmique, l'artère cérébrale moyenne (Sylvienne), l'artère communicante postérieure et l'artère choroïdienne antérieure. Ce réseau artériel cérébral antérieur permet d'assurer l'irrigation de près de 80% des structures de la boîte crânienne.

Le rhombencéphale et le mésencéphale sont irrigués par le tronc basilaire, qui naît de la réunion des artères vertébrales droite et gauche, elles-mêmes issues des artères sous-clavières. Le tronc basilaire se divisera ensuite en deux artères cérébrales postérieures (droite et gauche). La réunion des réseaux artériels cérébraux dérivés de la carotide interne et du tronc basilaire s'effectue au niveau du polygone de Willis. Ce dernier est constitué par les artères cérébrales antérieures, l'artère communicante antérieure, les artères cérébrales moyennes, les artères cérébrales postérieures et les artères communicantes postérieures (**Figure 1**).

ii. Angioarchitecture veineuse cérébrale

L'angioarchitecture veineuse cérébrale est plus complexe, possédant de très nombreuses variations. Les travaux de Raybaud et collaborateurs ont particulièrement aidé à la compréhension des mécanismes liés au développement des pathologies neurovasculaires.^{2,3} Le système veineux cérébral peut être divisé en deux entités : les voies de drainage superficielles et profondes.

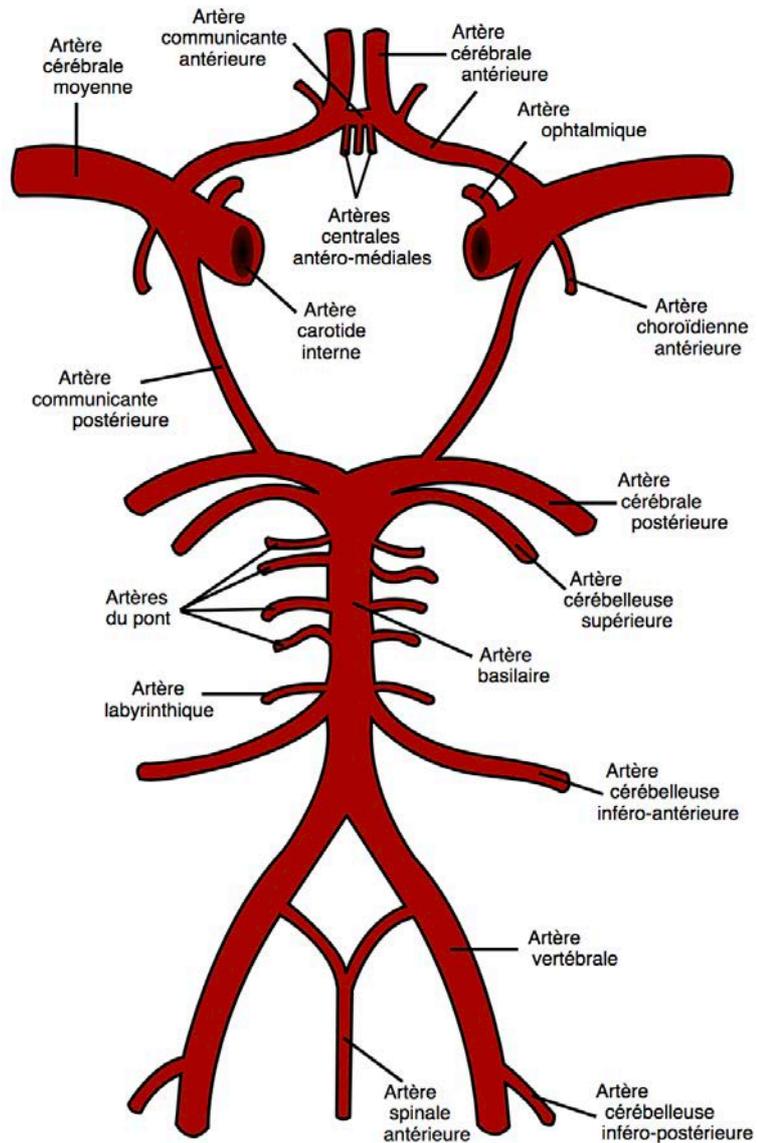
1. Système veineux superficiel

Le cortex cérébral et la couche la plus superficielle de la substance blanche bénéficient d'un drainage veineux par les veines corticales. Des veines piales cheminent le long des sillons corticaux et en profondeur. Elles servent de collecteur pour les veines corticales qui se drainent de façon centrifuge dans les sinus veineux durs (sinus sagittal supérieur).

2. Système veineux profond

A l'inverse du système superficiel, le système veineux profond possède une organisation centripète. Le drainage de la portion centrale de la substance blanche s'effectue par les veines médullaires profondes qui se dirigent vers les veines sous-épendymaires. Ces dernières convergent vers les veines cérébrales internes qui reçoivent également des afférences des veines septales, caudées et thalamostriées. Les veines cérébrales internes, au nombre de deux, convergent vers la ligne médiane et sont rejointes par les veines basales dites de Rosenthal pour former un collecteur médian unique : la grande veine de Galien. Cette dernière se draine dans le sinus droit qui accueille également une afférence représentée par le sinus sagittal inférieur (situé sur la face supérieure du corps calleux). Le sinus sagittal supérieur et le sinus droit convergent tous deux vers le torcular (ou Pressoir d'Hérophile), zone de confluence qui s'ouvre vers les sinus transverses, paires. Ces derniers se drainent dans les sinus sigmoïdes et enfin, dans les veines jugulaires internes.

Figure 1 : Vascolarisation artérielle cérébrale - le polygone de Willis



L'artère (ou tronc) basilaire se divise en deux artères cérébrales postérieures au dessus du pont. Ces artères communiquent avec les artères carotides par le biais d'artères communicantes pour former le polygone de Willis. Les artères cérébrales postérieures, moyennes (Sylviennes) et antérieures sont issues du polygone de Willis.

Schéma libre de droit

II. Malformations vasculaires cérébrales de l'enfant

a. Généralités

Les malformations vasculaires cérébrales de l'enfant sont relativement rares.⁴ Elles constituent des entités nosologiques distinctes des formes de l'adulte. Leur symptomatologie, parfois sévère, peut s'observer dès la période anténatale. On dénombre trois grands types de malformations vasculaires cérébrales pédiatriques (**Figure 2**). Celles-ci sont classées en fonction de leur topographie. On distingue les malformations anévrysmales de la veine de Galien (MAVG), les malformations artérioveineuses piales (MAVP) ainsi que les malformations des sinus duraux (MSD). Seules les MSD et les MAVG peuvent être diagnostiquées durant la vie foetale. Les MAVP apparaissent généralement durant les deux premières années de vie.⁵ Les malformations vasculaires cérébrales avec fistules artérioveineuses sont à l'origine de deux grands types de complications :

- Les conséquences de l'insuffisance cardiaque à haut débit : le vol vasculaire induit par le shunt artério-veineux peut être responsable d'anomalies cérébrales sévères (leucomalacie péri-ventriculaire et atrophie corticale) au pronostic neuro-développemental sombre.
- Les conséquences hydrodynamiques liées à la surcharge veineuse : l'augmentation des pressions hydro-veineuses est la conséquence d'une immaturité du système vasculaire cérébral profond qui ne peut assurer l'équilibre des pressions. Cette surcharge se manifeste par une hydrocéphalie, à l'origine de l'augmentation fréquente et significative du périmètre crânien chez les jeunes enfants présentant une fistule artérioveineuse cérébrale. Cette hydrocéphalie, lorsqu'elle n'est pas

traitée, peut également avoir des conséquences invalidantes sur le développement psychomoteur.

Figure 2 : Malformations vasculaires cérébrales de l'enfant - aspects angiographiques



Angiographies cérébrales en coupe sagittale au temps artériel.

A : Malformation anévrysmale de la veine de Galien : malformation artérioveineuse choroïdienne se drainant dans la veine médiane du prosencéphale, associée à un retour veineux profond anormal.

B : Malformation des sinus duraux s'étendant du sinus latéral gauche jusqu'au torcular et responsable d'un effet de masse.

C : Malformation artérioveineuse piale inter-hémisphérique alimentée par une branche frontale interne issue de l'artère cérébrale antérieure gauche.

Source : Centre de référence des maladies neurovasculaires malformatives de l'enfant et référence ⁴

b. Malformation anévrysmale de la veine de Galien (MAVG)

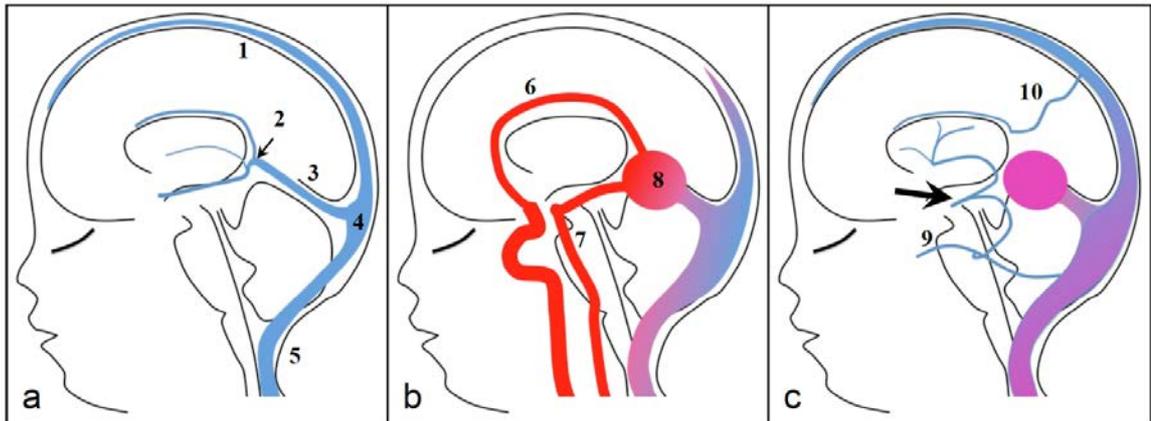
i. Description anatomique

La MAVG est la plus fréquente malformation vasculaire cérébrale diagnostiquée durant la période prénatale et chez le nourrisson.⁶ On estime son incidence à 1/25 000 naissances.^{7,8} Il s'agit d'une malformation artérioveineuse (MAV), située dans l'espace choroïdien ou sous-arachnoïdien, dont les afférences proviennent principalement des artères choroïdiennes (**Figure 3**). Les artères cérébrales antérieures peuvent également

alimenter la fistule. Le drainage de cette fistule s'effectue dans la veine médiane du prosencéphale, également appelée veine de Markowski.² La veine de Markowski, collecteur médian extra-cérébral, est le précurseur embryonnaire de la grande veine de Galien.² La veine de Markowski draine les plexus choroïdes des ventricules latéraux au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse. Elle reste fonctionnelle jusqu'à la formation des veines cérébrales internes puis régresse partiellement et spontanément après la 11^{ème} SA. Elle persiste dans sa portion postérieure et accueille-la les veines cérébrales internes pour devenir la grande veine de Galien. Dans le cadre d'une MAVG, la veine de Markowski, siège de la fistule, est anormalement persistante.

La MAVG se définit également par une variation de l'anatomie veineuse cérébrale. Le drainage conventionnel du système veineux profond ne s'effectue plus via la grande veine de Galien mais par des voies alternatives comme par les veines latéromésencéphaliques, par les veines sub-temporales ou encore par les sinus latéraux. Cette modification de l'angio-architecture veineuse cérébrale s'accompagne de façon régulière par la persistance de sinus durs embryonnaires, normalement prédestinés à involuer en fin de grossesse, comme le sinus falcoriel, occipital médian ou marginal. La veine de Galien malformative qui reçoit le shunt est ainsi exclue de la circulation veineuse profonde et se draine dans le torcular *via* un sinus falcoriel.

Figure 3 : Angioarchitecture cérébrale veineuse normale et ses modifications dans la malformation anévrysmale de la veine de Galien (MAVG)



Angioarchitecture veineuse normale (a) et ses modifications au cours d'une MAVG (b et c). 1: sinus longitudinal supérieur, 2: veine de Galien, 3: sinus droit, 4: torcular, 5: veine jugulaire, 6: artère péricalluse (issue de l'artère cérébrale antérieure), 7: tronc basilaire, 8: malformation de la veine de Galien, 9: sinus pétreux supérieur, 10: sinus falcorien. Le système veineux profond se draine à l'état normal dans la grande veine de Galien puis dans le sinus droit qui se dirige vers le torcular (a). En cas de MAVG (b), le système veineux profond ne se draine plus dans la veine de Galien malformative. Cette dernière ne reçoit plus que des afférences artérielles aberrantes issues de l'artère basilaire et/ou des artères carotides internes. Le drainage veineux profond normal (c) empreinte alors des voies alternatives vers le sinus pétreux supérieur (aspect en « epsilon » caractéristique : flèche) ou vers un sinus falcorien (10) pour rejoindre le sinus longitudinal supérieur.

Source : Centre de référence des maladies neurovasculaires malformatives de l'enfant - CHU BICETRE

ii. Circonstances diagnostiques et prise en charge

1. Diagnostic anténatal

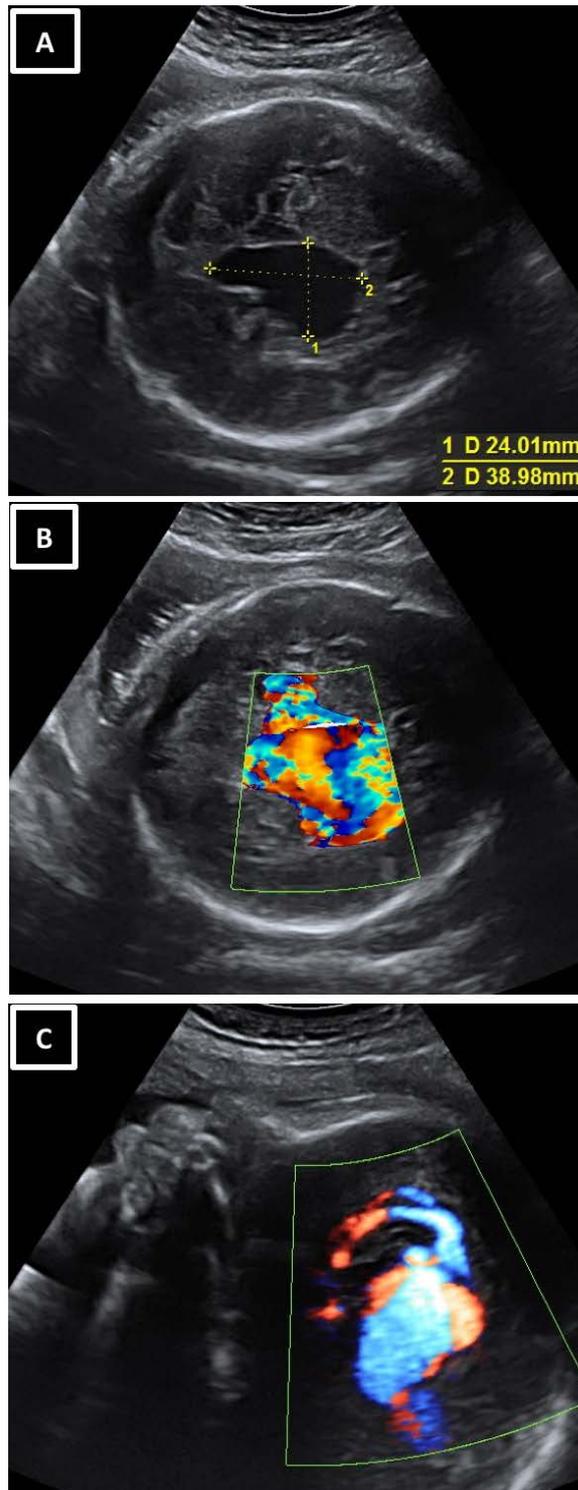
Le développement de la MAVG intervient durant la période embryonnaire, au cours du 1^{er} trimestre de la grossesse. Son diagnostic échographique anténatal peut être accessible à partir du deuxième trimestre. Lorsque le diagnostic est établi de façon précoce, celui-ci s'accompagne le plus souvent de signes de mauvaise tolérance hémodynamique dont l'aggravation progresse avec le terme.⁹ La suspicion diagnostique de MAVG est portée sur la réalisation de la coupe systématique du diamètre bipariétal recommandée par le comité national technique de l'échographie de dépistage prénatal.

Elle correspond à une image anéchogène extra-parenchymateuse de la ligne médiane, arrondie et qui refoule le 3^{ème} ventricule cérébral vers l'avant (**Figure 4**). On compare cette image à une raquette car la dilatation observée se draine le plus fréquemment dans le sinus falcorien en arrière.¹⁰ L'étude en Doppler couleur confirme l'existence de flux turbulents à haut débit et écarte ainsi certains diagnostics différentiels plus fréquents comme les kystes arachnoïdiens ou les cavités de porencéphalie.¹¹ La suspicion de MAVG impose la réalisation d'un bilan d'imagerie au sein d'un centre expert (centre de référence ou de compétence en pathologie neurovasculaire malformative congénitale) afin de confirmer le diagnostic et d'apprécier la tolérance et l'éventuel retentissement foetal.

L'échographie obstétricale de 2^{ème} ligne doit comporter une étude de l'hémodynamique foetale.¹² La MAVG est à l'origine d'une augmentation progressive de la précharge cardiaque et la situation d'hyper-débit conduit à l'insuffisance cardiaque. L'évaluation du retentissement de l'hyper-débit vasculaire est fondée sur la recherche d'une cardiomégalie et d'une fuite tricuspide qui sont les premiers éléments chronologiques en faveur d'une adaptation cardiaque.¹³ Dans les cas les plus sévères, la décompensation cardiaque peut être à l'origine d'un tableau d'anasarque foetale puis d'une mort foetale *in utero*. Le vol vasculaire induit par la MAVG peut dans certains cas être responsable d'anomalies cérébrales sévères (lésions d'encéphalomalacie). La réalisation d'une IRM cérébrale foetale est indispensable au bilan initial car elle améliore la sensibilité diagnostique et permet une étude du parenchyme cérébral à la recherche de stigmates d'encéphalomalacie.¹⁴ Plus récemment, la mise en évidence d'une dilatation anormale des artères cérébrales moyennes (aspect de « pseudo-feeders ») a été

impliquée comme un marqueur précoce d'évolution vers l'encéphalomalacie.¹⁵ La normalité de l'IRM réalisée dans le cadre du bilan initial doit être prise avec précaution car d'authentiques encéphalomalacies diffuses peuvent survenir de façon brutale au cours du 3^{ème} trimestre (**Figure 5**). L'existence de telles lésions peut rendre acceptable une demande d'interruption médicale de grossesse effectuée par la patiente. En cas de doute sur une décompensation cardiaque, la fin de la grossesse doit être organisée auprès d'équipes spécialisées disposant d'un plateau technique adéquat (réanimation pédiatrique et service de neuroradiologie interventionnelle pédiatrique) (**Tableau 1**).

Figure 4 : Échographie obstétricale d'un fœtus porteur d'une MAVG



Fœtus de 34 semaines d'aménorrhée porteur d'une MAVG mesurant 39 mm de grand axe sur une coupe cérébrale transversale (A). L'étude en mode Doppler couleur objective la présence d'un flux turbulent au sein de la MAVG en coupe transversale (B) et sagittale (C).

Source : H. Bouchghoul, Service d'Obstétrique, CHU Bicêtre

Figure 5 : Imagerie par résonance magnétique cérébrale d'un fœtus porteur d'une MAVG dans une forme sévère



IRM cérébrale du même fœtus (**figure 4**) à 35 SA en coupe transversale (**A**) et sagittale (**B**) en signal T2. La MAVG (**1**) se draine dans un sinus falcoriel (**2**) qui lui-même se draine dans le torcular (**3**). On note un élargissement des espaces péri-cérébraux. L'étude en signal T2 permet d'observer une dédifférenciation complète entre la substance blanche et la substance grise au niveau des deux hémisphères cérébraux, symptôme d'une ischémie cérébrale diffuse.

Source : C. Adamsbaum, Service de Radiopédiatrie, CHU Bicêtre.

Tableau 1 : Prise en charge anténatale et accouchement – Recommandations du centre de référence des maladies neurovasculaires malformatives de l'enfant du CHU de Bicêtre
<ul style="list-style-type: none"> - IRM cérébrale dès la découverte de la malformation, répétée entre la 32^{ème} et la 34 semaine d'aménorrhée, avec séquences informatives T2 SE (3 plans), T1, Diffusion et si possible séquences T2*, TOF Willis, ARM veineuse - Accouchement en maternité de type III - Accouchement dans un hôpital disposant d'un centre de neuroradiologie interventionnelle pédiatrique en cas de signes de défaillance cardiaque fœtale - Accouchement à terme pour un poids de naissance idéal > 2,5 kg en cas d'embolisation - Voie basse non contre-indiquée
ARM : angiographie par résonance magnétique ; TOF : temps de vol

2. Prise en charge post-natale

A la naissance, les patients bénéficient d'une évaluation immédiate par une équipe rompue à la prise en charge réanimatoire. Une échographie cardiaque est proposée dans les premiers jours de vie chez les patients pauci ou asymptomatiques, ou en urgence chez les patients présentant des signes de décompensation cardiaque néonatale. Cette échographie permet d'évaluer la fonction ventriculaire et l'existence d'une éventuelle hypertension artérielle pulmonaire iso ou suprasystémique.¹⁶ Une IRM cérébrale doit également être réalisée dans les premiers jours de vie. Celle-ci permet une évaluation plus fine du retentissement du vol vasculaire sur le parenchyme cérébral. L'ensemble des investigations réalisées à la naissance est intégré dans un score pronostique, le score néonatal de Bicêtre.¹⁷ Ce score évalue les fonctions cardiaques, cérébrales, respiratoires, hépatiques et rénales et permet une orientation thérapeutique

en fonction de la sévérité de la symptomatologie (**Tableau 2**) :

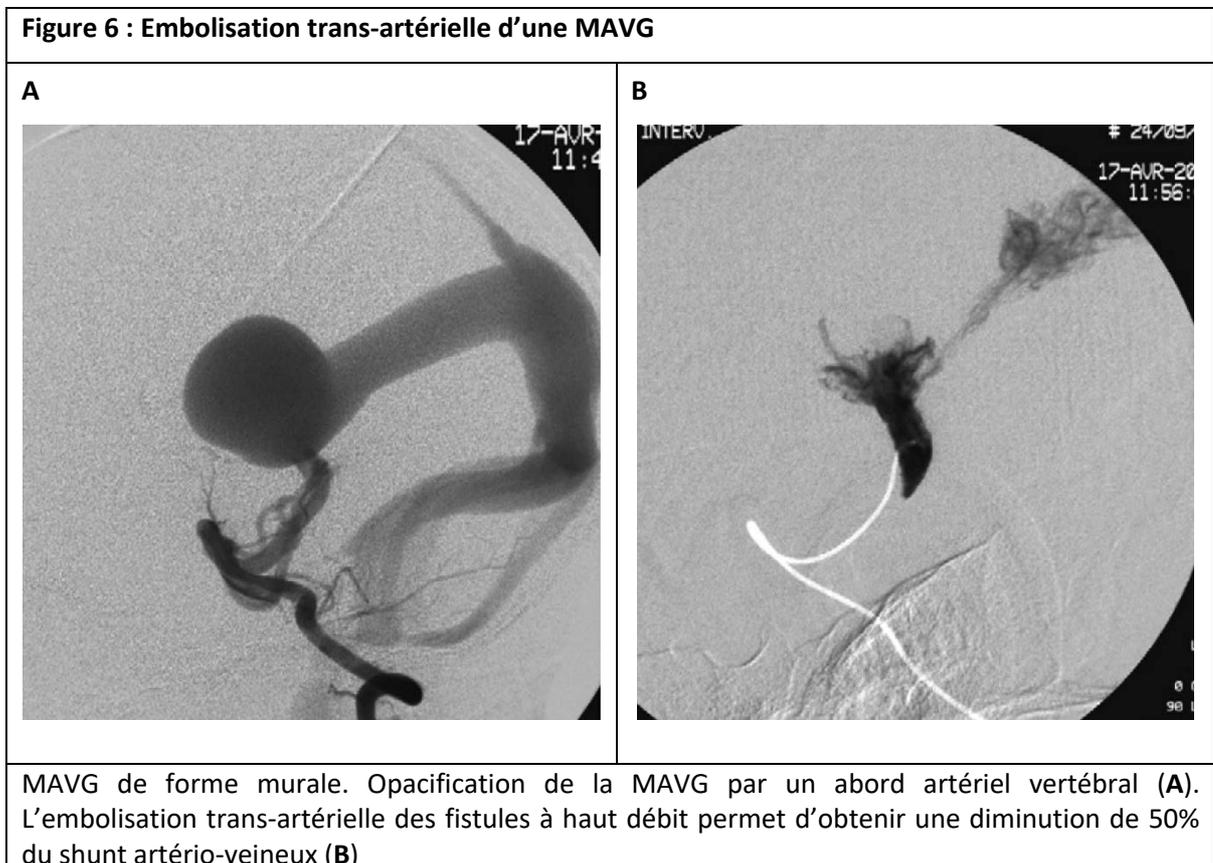
- Un score inférieur à 8 : le pronostic cérébral est sombre malgré une prise en charge intensive. Une abstention thérapeutique et un accompagnement sont préconisés.
- Un score compris entre 8 et 12 : une prise en charge par embolisation doit être réalisée en urgence devant le risque de détérioration cérébrale et systémique rapide.
- Un score supérieur à 12 : la situation clinique est contrôlable par un traitement médical. La réalisation d'un geste endovasculaire sera proposée vers l'âge de cinq mois de vie.

L'embolisation est aujourd'hui le traitement de première intention dans le monde en raison des bénéfices escomptés largement supérieurs aux risques de la procédure.¹⁸ La première embolisation a pour but une oblitération partielle (jusqu'à 50%) du shunt artério-veineux (**Figure 6**). Les conséquences à court terme sont une normalisation rapide de l'hémodynamique permettant une décroissance des médicaments cardiotropes. L'embolisation trans-artérielle permet également l'obtention d'un équilibre des pressions hydro-veineuses et contribue à lutter contre l'hydrocéphalie. Un patient bénéficiera d'une ou plusieurs sessions d'embolisations en fonction du type de MAVG (murale ou choroïdienne), de l'importance du shunt initial et de la réponse à la première embolisation.

Tableau 2 : Score néonatal de Bicêtre					
	Fonction cardiaque	Fonction cérébrale	Fonction respiratoire	Fonction hépatique	Fonction rénale
5	Normale	Normale	Normale	-	-
4	Surcharge mineure, sans traitement	Anomalies EEG infracliniques	Tachypnée, finit les biberons	-	-
3	Insuffisance cardiaque, stable	Signes neurologiques intermittents	Tachypnée, ne finit pas les biberons	Normale	Normale
2	Insuffisance cardiaque, instable	Crise convulsive isolée	Ventilation assistée, Saturation normale sous $FiO_2 < 25\%$	Hépatomégalie, bilan hépatique normal	Anurie transitoire
1	Ventilation nécessaire	Épilepsie	Ventilation assistée, Saturation normale sous $FiO_2 > 25\%$	Insuffisance hépatique modérée ou transitoire	Diurèse instable sous traitement
0	Résistance au traitement médical	Signes neurologiques permanents	Ventilation assistée, désaturation	Troubles de la coagulation, cytolyse sévère	Anurie

Score < 8 : abstention thérapeutique. Score 8 - 12 : embolisation en période néonatale. Score > 12 : embolisation vers l'âge de 5 mois. EEG : électroencéphalogramme.

Source : Lasjaunias PL, Chng SM, Sachet M, Alvarez H, Rodesch G, Garcia-Monaco R. The management of vein of Galen aneurysmal malformations. *Neurosurgery*. nov 2006;59.¹⁷



Partie II

Génétique des MAVG

I. Introduction

Comme décrit précédemment, les MAVG correspondent à une entité nosologique précise : il s'agit d'une malformation artérioveineuse choroïdienne (associant une ou plusieurs fistules) se drainant dans une veine de Galien malformative et ectasique. Il s'y associe de façon systématique une anomalie du retour veineux cérébral profond qui est déconnecté de l'ampoule de Galien et emprunte des voies de drainage alternatives. Les authentiques MAVG doivent être distinguées des fistules piales qui se drainent dans une veine de Galien mature et non malformative, sans anomalie du retour veineux cérébral. Malgré les avancées diagnostiques et thérapeutiques significatives de ces 20 dernières années, notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la genèse des MAVG restait rudimentaire. Certaines maladies mendéliennes ont été rapportées comme associées à des MAVG ou à d'autres fistules à haut débit.

II. MAVG et syndrome malformation capillaire – malformation artérioveineuse

Le syndrome malformation capillaire – malformation artérioveineuse (CM-AVM) se caractérise par l'association de multiples malformations capillaires et d'une ou plusieurs MAV.¹⁹ Les malformations capillaires sont de petite taille, de couleur rosée, le plus souvent multiples et disséminées sur le corps. Les MAV associées peuvent intéresser différents territoires : intra-musculaires, cutanées, sous-cutanées, intra-osseuses ou cérébrales. Le syndrome CM-AVM, décrit pour la première fois en 2003, est dû dans près de 50% des cas à des mutations hétérozygotes perte de fonction du gène *RASA1*.^{20,21} Ce gène, situé en 5q13.3, code pour une protéine (p120-RasGAP) qui est une *GTPase activating protein* augmentant la faible activité GTPase intrinsèque de p21Ras (MIM

#139150). Cette protéine est directement impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Les protéines RAS sont en cycle permanent entre forme active (guanosine-triphosphate) et forme inactive (guanosine-diphosphate). La faible activité GTPase des protéines RAS est renforcée par l'action de protéines GAPs (GTPase-activating proteins) comme *RASA1*. La protéine *RASA1* a été initialement purifiée à partir de tissus placentaires en 1988.²² Sa cartographie sur le bras long du chromosome 5 a été déterminée un an plus tard.²³ Les études sur modèle murin ont permis de déterminer l'implication de *RASA1* dans le développement vasculaire. L'inactivation du gène (« knockout » homozygote) aboutit à un arrêt précoce du développement et à la mort des souris au 10^{ème} jour de gestation.²⁴ L'étude approfondie des souris, dont l'expression de *RASA1* a été réprimée, objective de nombreuses anomalies vasculaires impliquant notamment des réductions du calibre des gros vaisseaux, un bourgeonnement anormal des vaisseaux issus de branches ventrales segmentaires provenant de l'aorte dorsale ainsi que des aberrations vasculaires du sac vitellin. Les souris hétérozygotes mutantes ne présentaient pas de phénotype vasculaire particulier.

Le lien entre le locus de *RASA1* et le syndrome CM-AVM a été suggéré grâce à une étude de liaison génétique au sein d'une famille multiplex.²⁵ La confirmation de l'implication de *RASA1* a été démontrée par la même équipe : 6 familles présentant des malformations capillaires associées à des malformations artérioveineuses ou à des angiodysplasies ostéohypertrophiques (syndrome de Parkes-Weber) étaient porteuses de mutations hétérozygotes perte de fonction de *RASA1*.¹⁹ La variabilité phénotypique a été associée au fait que *RASA1* code pour une protéine impliquée dans la signalisation de plusieurs récepteurs de facteurs de croissance contrôlant la prolifération, la migration et

la survie de plusieurs populations cellulaires dont les cellules endothéliales. Il a été rapporté des familles dans lesquelles co-ségrégent mutations pathogéniques de *RASA1* et malformations capillaires, en l'absence de malformations artérioveineuses.²⁶ Une étude de cohorte rétrospective a permis d'impliquer des mutations pathogéniques de *RASA1* chez plus de deux tiers des patients porteurs d'un authentique syndrome CM-AVM.²¹ Les mutations, majoritairement tronquantes, ne sont pas restreintes à une région particulière du gène. Les MAV associées sont disséminées : cérébrales, osseuses, linguales et rachidiennes. Trois des 12 patients porteurs de MAV intracrâniennes, étaient atteints de MAVG. Une autre publication de la même équipe fait état de deux patients mutés pour *RASA1* et porteurs d'une MAVG, sur 101 patients issus de 44 familles.²⁰ Par la suite, la même équipe a publié une série de 11 patients atteints de MAVG parmi lesquels quatre étaient porteurs de mutations hétérozygotes de *RASA1* (trois mutations faux sens et une mutation non-sens).²⁷ Les trois premiers patients présentaient une MAVG isolée, le quatrième avait des malformations capillaires associées. Il existe cependant une limite relative à ces cohortes : aucune description angiographique précise n'a été fournie permettant d'attester de l'authenticité des MAVG. L'hypothèse d'un diagnostic différentiel, tel qu'une fistule piale se drainant dans une veine de Galien mature, ne peut être écartée.

Plus récemment, l'hypothèse d'un second évènement s'associant aux mutations germinales a été soulevée. Il a été objectivé l'existence de mutations somatiques tronquantes de *RASA1* au sein de malformations capillaires chez des patients porteurs par ailleurs d'une autre mutation germinale de *RASA1* (également tronquante).^{28,29} La grande variabilité phénotypique ainsi que l'existence de mutations somatiques surajoutées

confortent l'idée qu'un second évènement pourrait être nécessaire pour la genèse d'anomalies vasculaires dans le syndrome CM-AVM. Ce modèle physiopathologique a déjà été démontré dans le cas d'autres anomalies vasculaires tels que les cavernomes cérébraux héréditaires liés à des mutations des gènes *CCM1*, *CCM2* ou *CCM3*.³⁰ La pénétrance de la maladie est incomplète puisque 40% des porteurs de mutations pathogéniques ne développeront aucun symptôme. L'inactivation somatique d'un des gènes *CCM1*, *CCM2* ou *CCM3* au niveau de l'endothélium lésé se surajoute à l'inactivation germinale de l'autre copie du même gène pour générer la survenue d'un ou plusieurs cavernomes cérébraux.

III. MAVG et maladie de Rendu-Osler-Weber (Télangiectasie hémorragique héréditaire)

Le syndrome de télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT ou maladie de Rendu-Osler-Weber) correspond à une maladie vasculaire de transmission autosomique dominante, dont la pénétrance est complète à l'âge adulte. Sa prévalence est estimée entre 1/2 000 et 1/10 000 personnes.³¹ Ce syndrome est caractérisé par la présence de télangiectasies disséminées sur la peau et les muqueuses, et est à l'origine d'épistaxis parfois sévères (responsables d'anémie). Il associe également des malformations vasculaires qui peuvent toucher divers organes tels que le système nerveux central, le foie et les poumons. Les malformations vasculaires du système nerveux central sont inconstantes et hétérogènes : ont été décrites des malformations caverneuses, des fistules durales artérioveineuses ainsi que des MAV. Leur prévalence dans ce syndrome est estimée aux alentours de 5%.³² Selon leur type et leur topographie, elles peuvent être responsables d'hémorragies ou de symptômes compressifs et nécessitent une prise en

charge en milieu spécialisé. Les mutations hétérozygotes des gènes *ENG* et *ACVRL1* sont responsables de la majorité des syndromes HHT (90% des patients). Ces deux gènes codent pour des sous-unités du récepteur membranaire du transforming growth factor-beta (TGF- β). L'activation du récepteur du TGF- β implique la voie de signalisation des protéines SMAD en aval. Des mutations du gène *SMAD4* peuvent également être responsables du syndrome HHT (dans moins de 5% des cas). L'atteinte de *SMAD4* est responsable de formes syndromiques qui associent une polypose juvénile.³³

Certains auteurs ont suggéré l'existence d'un lien entre syndrome HHT et MAVG. Il a été rapporté le cas d'un enfant porteur d'une MAVG et également d'une mutation tronquante du gène *ENG*.³⁴ Cette mutation était héritée de la mère du patient qui présentait un phénotype clinique et une histoire familiale compatibles avec un syndrome HHT. Plus récemment, une mutation faux-sens du gène *ACVRL1* a été identifiée au sein d'une cohorte de 4 patients atteints d'une MAVG. Cette mutation est héritée de la mère du patient et également partagée par sa sœur. Ni l'anamnèse, ni l'examen somatique des patients porteurs de la mutation impliquée ne sont en faveur d'un syndrome HHT. Par ailleurs, la même mutation est référencée dans la base de données dbSNP (*rs199874575* ; *NM_000020.2:c.652C>T*) avec une fréquence allélique qui la rend plus fréquente que l'incidence des MAVG. Néanmoins, une étude fonctionnelle de la mutation impliquée est en faveur d'un effet délétère (diminution de la phosphorylation des protéines SMAD 1, 5 et 8 ; diminution de l'activité transcriptionnelle après activation par la BMP9 humaine pour le variant incriminé). Cette observation ne permet cependant pas de conclure à l'implication de la mutation objectivée d'*ACVRL1* dans la genèse des MAVG puisqu'aucune description angiographique cérébrale n'objective formellement l'existence

d'une MAVG dans la publication en question.

IV. MAVG récurrentes et formes familiales de MAVG

Les formes familiales de MAVG sont très rares. Il a été rapporté l'existence d'une récurrence de MAVG au sein d'une fratrie avec co-ségrégation d'une mutation faux sens de *RASA1* (c.2119C>T).²⁷ Une autre publication fait état d'une suspicion de récurrence de MAVG chez des jumeaux, cependant le diagnostic avait été suspecté sur une échographie transfontanellaire *post mortem* qui objectivait l'existence d'une dilatation anévrysmale d'un vaisseau cérébral sans précision. De plus, aucune information concernant la zygote n'était fournie.³⁵ La cohorte de Bicêtre, actuellement constituée, comporte également une famille multiplex avec récurrence au sein d'une même fratrie (données non publiées). L'équipe de Xu et al. a rapporté le cas d'une patiente qui avait bénéficié d'une IRM cérébrale pour l'exploration de vertiges rotatoires. Cette imagerie avait mis en évidence une MAVG asymptomatique et méconnue. Cette patiente avait par ailleurs un antécédent de mort fœtale *in utero* en rapport avec une MAVG fœtale.³⁶

Ces données suggèrent l'hypothèse d'une transmission dominante. Elles sont néanmoins contrebalancées par la publication de deux « case-reports » de grossesses gémellaires monochoriales avec discordance phénotypique : seul l'un des jumeaux était atteint d'une MAVG.^{37,38} Cette discordance n'écarte cependant pas l'hypothèse d'une cause génétique dans les MAVG (mutation germinale avec pénétrance variable, mosaïque somatique ou hypothèse du « double hit » : mutation germinale et mutation somatique associées).

C'est dans ce contexte que notre équipe a décidé d'investiguer l'hypothèse d'une cause génétique pouvant expliquer la genèse des MAVG.

Partie III

Patients

Matériel et méthodes

I. Recrutement des patients

Cinquante et un patients, sans lien de parenté, ont été inclus du 1^{er} janvier 2015 au 31 décembre 2017 au sein du Centre de référence des pathologies neurovasculaires malformatives de l'enfant de l'hôpital Bicêtre. Le diagnostic positif de MAVG a été porté à partir d'une IRM cérébrale complétée par une angiographie artérielle cérébrale. Il répond aux critères de qualité suivant :

- Individualisation d'un ou plusieurs shunt(s) artérioveineu(x) (vaisseaux nourriciers choroïdiens) impliquant la grande veine de Galien qui est malformative et ectasique.
- Retour veineux profond cérébral anormal : les veines cérébrales internes ne se drainent plus dans la grande veine de Galien mais empruntent des voies alternatives (veines latéro-mésencéphaliques, temporales ou sinus latéraux).
- Persistance de sinus durs embryonnaires (sinus falcoriel, marginal et/ou occipital médian)

Il existe plusieurs diagnostics différentiels dont des MAV dures se drainant dans la grande veine de Galien normalement formée, ou encore des dilatations variqueuses de la grande veine de Galien. L'absence de l'un des trois critères angiographiques cités précédemment constituait un critère de non inclusion.

II. Identification de gènes candidats

- a. **Recherche de mutations ponctuelles et courtes délétions-insertions : séquençage haut débit de l'exome entier (whole exome sequencing/WES)**

i. Préparation des ADN

L'ADN génomique de chaque patient (enfants malades) a été extrait à partir de sang total frais ou congelé (-20°C) à l'aide de kits d'extraction (QIAamp® DNA Blood Midi Kit, Qiagen®, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. En bref, 200 µL de protéase (Qiagen®, Hilden, Allemagne) ont été ajoutés à 2 mL de sang total et à 2,4 mL de tampon de lyse. L'ensemble a subi une incubation de 10 min à 70°C, permettant la lyse des cellules nucléées. Deux mL d'éthanol absolu ont été ajoutés, permettant la précipitation des ADN. Le produit de ces étapes a été transféré sur des colonnes dédiées QIAamp Midi (Qiagen®, Hilden, Deutschland) avant une étape de centrifugation à 1850g pendant 3 min. Les colonnes sont ensuite lavées à 2 reprises à l'aide de tampons dédiés (centrifugation à 4500g pendant 1 min entre le 1^{er} et le 2^{ème} lavage ; centrifugation à 4500g pendant 15 min à l'issue d'un second lavage). Trois-cents µL de tampon d'élution ont été ajoutés sur la colonne afin d'éluer les ADN purifiés (centrifugation finale à 4500g pendant 2 min). Les ADN ainsi obtenus ont bénéficié d'un contrôle de la qualité par migration sur gel d'agarose à 1% ainsi que d'un dosage sur un Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA) à l'aide de Qubit® dsDNA BR Assay kits (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA). Ce contrôle est complété par une mesure de la densité optique (ratio 260/280 optimal compris entre 1,8 et 2,0).

ii. Préparation des librairies

Les librairies correspondent à l'ensemble des ADN que l'on souhaite séquencer. Il existe deux grandes stratégies d'obtention des librairies. Le choix de chaque stratégie est dicté par l'usage que l'on souhaite en faire. Les librairies nécessaires à la réalisation d'un

séquençage d'un génome entier sont réalisées par la stratégie « shotgun » : les ADN subissent une étape de fragmentation, permettant d'obtenir des brins de taille équivalente mais dont les points de cassure sont aléatoires. La fragmentation peut être obtenue par méthode physique (sonication) ou par méthode enzymatique (enzymes de restriction). Si le séquençage intéresse une partie plus restreinte du génome (exome entier ou ciblé par exemple), il faudra adjoindre des étapes permettant de capturer les régions d'intérêt avant de procéder au séquençage. Le séquençage de l'exome entier et ciblé employés dans notre étude comportent les mêmes principales étapes et ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur (SureSelectXT Target Enrichment System® for Illumina Multiplexed Sequencing, Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA). Les principales étapes de la préparation des bibliothèques sont résumées ci-dessous :

1. Fragmentation mécanique de 3 à 5 µg d'ADN génomique par un Covaris S2® (Covaris, Inc, Massachusetts, USA) : méthode de sonication
2. Vérification de la qualité à l'aide d'un Bioanalyzer 2100® (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA)
3. Réparation enzymatique des extrémités
4. Purification des échantillons (AMPure XP beads®, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
5. Adénylation des extrémités 3' des fragments d'ADN
6. Purification des échantillons (AMPure XP beads®)
7. Ligation des adaptateurs
8. Purification des échantillons (AMPure XP beads®)
9. Amplification des bibliothèques
10. Purification des échantillons (AMPure XP beads®)

11. Vérification de la qualité et de la quantité (Bioanalyzer®)
12. Hybridation/Capture
13. Hybridation des échantillons d'ADN aux librairies capturées
14. Préparation des billes magnétiques de streptavidine
15. Capture de l'ADN hybridé à l'aide des billes de streptavidine
16. Indexation et préparation des échantillons pour le séquençage multiplex
17. Amplification des librairies capturées avec les primers d'indexage
18. Purification des librairies capturées et amplifiées (AMPure XP beads®)
19. Vérification de la qualité et de la qualité (Bioanalyzer®)
20. Quantification des librairies (Qubit®)
21. Pool des échantillons en vue du séquençage multiplex
22. Préparation finale des échantillons à séquencer (dénaturation et dilution des librairies)

iii. Séquençage haut débit

Les librairies préalablement préparées ont été séquencées à l'aide des séquenceurs de nouvelle génération Illumina MiSeq® (séquençage de l'exome ciblé) ou du Illumina HiSeq® (séquençage de l'exome entier) en mode 75 bp paired-end (Illumina, Inc, San Diego, USA).

iv. Analyse bio-informatique

Les *reads* issus du séquençage haut débit ont été alignés contre le génome de référence (UCSC hg19, National Center for Biotechnology Information, build 37.3) a

l'aide du logiciel Burrows-Wheeler Aligner.³⁹ Les variants ont été sélectionnés à l'aide du logiciel Samtools et ont été annotés grâce au logiciel Annovar.^{40,41} La profondeur de lecture avait une médiane de 67x. Les *reads* avec un score de qualité de mapping d'au moins 20 ainsi qu'une profondeur de lecture de plus de 2x ont été sélectionnés. Les variants suivants ont été sélectionnés : variants introniques proches des jonctions intron-exon, variants exoniques incluant les variants synonymes proches des jonctions intron-exon, faux-sens, non-sens, ainsi que les courtes délétions ou insertions des régions codantes. Le ratio (reads mutants sur reads totaux) devait être d'au moins 20%. La prédiction de la pathogénicité des mutations faux-sens a été réalisée à l'aide des logiciels PolyPhen et SIFT.^{42,43} Les variations ayant une fréquence allélique (*minor allele frequency*) inférieure ou égale à 0.003 ont été sélectionnées (bases de données dbSNP137, 1000 genomes et ExAc). Les hypothèses autosomique dominante, autosomique récessive, dominante liée à l'X et récessive liée à l'X ont été testées. Les données issues du séquençage de l'exome entier de tous les patients ont été croisées afin de sélectionner des variants dans les mêmes gènes chez au moins deux patients non apparentés. Par ailleurs, une liste préétablie de gènes candidats a été analysée afin de détecter d'éventuels variants (*ALK1, SMAD4, ENG, GDF2, RASA1* et *PTEN*). Cette liste a été établie sur la base de données issues de publications impliquant ces gènes dans des pathologies syndromiques avec une composante vasculaire.

b. Séquençage Sanger

Le séquençage Sanger a été effectué pour la validation des variants identifiés par exome et test de la ségrégation intra-familiale. Il a été aussi effectué pour le criblage d'*EPHB4* chez les patients qui n'avaient pas été inclus dans le séquençage d'exome. Le

choix des amorces de PCR a été effectué à partir de l'ADN génomique des gènes candidats retenus. L'amplification par PCR a été réalisée à partir d'une solution contenant 1.5mM de MgCl₂, 0.6U d'ADN polymérase TAQ, 0.25 μM de chaque amorce et 50 ng d'ADN. Après une étape initiale de dénaturation (94°C pendant 5 minutes), 30 cycles d'amplification ont été réalisés. Chaque cycle contenait une étape de dénaturation (94°C pendant 30 secondes), une étape d'hybridation (60°C pendant 1 minute) et une étape d'élongation (72°C pendant 1 minute). Les 30 cycles ont été poursuivis par une étape finale d'élongation (72°C pendant 7 minutes) sur un thermocycleur Veriti™ 96-Well (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Les produits de PCR sont ensuite purifiés sur colonnes P100 (Bio-Gel P-2 Gel fine, Bio-Rad, Hercules, California, USA) et d'un séquençage à l'aide de couples d'amorces spécifiques et du kit Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Les produits de réaction de séquençage ont été purifiées sur des colonnes G50 (Sephadex G-50 Superfine, GE Healthcare, Little Chalfont, England) puis ont migré sur un séquenceur par électrophorèse capillaire (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

c. Recherche d'haplo-insuffisance du gène candidat *EPHB4* par PCR en temps réel

i. Population cible

Nous avons procédé à la recherche de délétions pour les patients de la cohorte dont aucune mutation probante n'avait été mise en évidence lors du séquençage haut débit (WES ou exome ciblé) ou Sanger du gène candidat *EPHB4*. Afin de sélectionner les patients éligibles à l'étude par PCR en temps réel, nous avons établi une cartographie des

régions d'homozygotie ou d'hémizygotie en étudiant le génotype des SNPs issus du séquençage haut débit et/ou du séquençage Sanger du gène candidat *EPHB4*. Nous avons retenu les régions de patients qui présentaient au moins trois SNPs contigus homo (ou hémizygotés). Les caractéristiques des SNP étudiés sont fournies (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Caractéristiques des SNP étudiés afin d'établir une cartographie d'homo/hémizygotie vis-à-vis du gène candidat <i>EPHB4</i>		
Désignation	Position génomique (GRCh38.p12)	Fréquence de l'allèle mineur
rs314348	7:100803648	T=0.0288
rs2230585	7:100812975	A=0.2756
rs61651680	7:100813034	T=0.0118
rs314358	7:100813035	A=0.4245
rs314359	7:100813656	T=0.4243
rs116240595	7:100813665	G=0.0106
rs3857809	7:100818517	C=0.2424
rs144173	7:100818628	A=0.4363
rs56173078	7:100822533	G=0.0887
rs61130921	7:100822590	T=0.0300
rs200488259	7:100826964	--=0.4750
rs35907339	7:100826965	--=0.3477

ii. PCR en temps réel du gène candidat *EPHB4*

La PCR en temps réel a été réalisée à partir de l'ADN génomique sur un thermocycleur CFX96 Real-Time System C1000 Touch (Bio-Rad, Hercules, California, USA) à l'aide du kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, California, USA). La présence d'une délétion de l'ADN génomique a été définie par l'existence d'un ratio ADN testé / ADN contrôle inférieur ou égal à 0.5. Chaque échantillon a été testé en duplicat. Le détail des amorces employées est fourni (**Tableau 4**). L'albumine a été utilisée en tant que contrôle de validité interne. Après une étape initiale de dénaturation (95°C pendant 10 minutes), 39 cycles d'amplification ont été réalisés. Chaque cycle contenait une étape de dénaturation (95°C pendant 15 secondes) et une étape d'hybridation-

élongation (60°C pendant 1 minute). Une acquisition de la fluorescence émise a été effectuée à la fin de chaque cycle. Les 39 cycles ont été poursuivis par une étape de dénaturation (95°C pendant 30 secondes). Enfin, les courbes de fusion ont été obtenues après augmentation progressive de la température de 60°C à 95°C (vitesse d'incrément = 0.5°C/cycle, 2s/cycle)

Tableau 4 : Amorces employées pour la recherche d'haplo-insuffisance du gène candidat <i>EPHB4</i> par qPCR	
Désignation	Séquence des amorces
EPHB-Ex2-F	5'-GAGAAGGGCTCAGACGACAC -3'
EPHB-Ex2-R	5'-GCAGAAGAGGCCAGAAATCA -3'
EPHB-Ex5-Fq	5'-GGCTGGCAGGACCCTTCT -3'
EPHB-Ex5-Rq	5'-TTTGATGAATGCTTTCTCTCTCTCA -3'
EPHB-Ex9-Fq	5'-CCATCAACTGAGGGCTTCCA -3'
EPHB-Ex9-Rq	5'-CGCAGTTCTCTGCCTCAGGTA -3'
EPHB-Ex10-Fq	5'-AAGCCCCTATTCATCAAATT-3'
EPHB-Ex10-Rq	5'-GGACAAACACGGACAGTATCTCAT-3'
EPHB-Ex11-Fq	5'-CCACCCCGCTTCGTT-3'
EPHB-Ex11-Rq	5'-TACGTCAAGATTGAAGAGGTGATTG-3'
EPHB-Ex12-Fq	5'-GGCACACCTCGCCAAACT-3'
EPHB-Ex12-Rq	5'-CTGGAGCGGGAGAGCTGAT-3'
EPHB-Ex13-Fq	5'-CACGAGCTGGATGACTGTGAA-3'
EPHB-Ex13-Rq	5'-CAAGCCCCACCCTATCTG-3'
EPHB-Ex16-F	5'-GCAGTGCAAGAAGACAGCAT-3'
EPHB-Ex16-R	5'-CAGAAGTGCCGTTTCATTGG-3'

III. Validation fonctionnelle

a. Etude de l'impact des mutations d'épissage sur la transcription

i. Obtention des ADN complémentaires par transcription inverse

Les ARN totaux des patients d'intérêt ont été extraits par la méthode TRI Reagent LS (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) à partir de cellules issues de lignées

lymphoblastoïdes immortalisées (prestation externe, banque d'ADN et de cellules, Genethon). Quatre microgrammes d'ARN ont été utilisés pour synthétiser les ADN complémentaires (cDNA) par transcription inverse à l'aide d'amorces hexamères aléatoires issues du kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). En bref, la réaction de transcription inverse a nécessité 1 µL d'hexamères aléatoires à 50 µM, 1 µL de dNTP à 10 mM et de l'eau RNase Free pour un volume final de 13 µL. Le mix a subi une étape d'hybridation (65°C pendant 5 min). Ont été rajoutés, 4 µL de First Strand Buffer FS (5x), 1 µL de DTT (0.1 M), 1 µL de RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor (40 U/µL) et 1 µL de SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µL) pour un volume final de 20 µL. L'ensemble a été mis à incuber 25°C pendant 5 minutes, 50°C pendant 60 minutes et enfin 70°C pendant 15 minutes. Les cDNA issus de la reverse transcription ont été conservés à -80°C.

ii. Amplification et séquençage

Les cDNA précédemment générés ont été amplifiés par PCR conventionnelle dont la méthode est explicitée dans le paragraphe II) b. à partir d'amorces spécialement générés pour détecter un éventuel impact sur l'épissage (**Tableau 5**). Une amplification conjointe du cDNA de l'actine β humaine a été faite afin de servir de contrôle interne de la réaction de transcription inverse et de la PCR. Les amplicons générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et révélés par du bromure d'éthidium. Les produits d'amplification ont été séquencés à l'aide des mêmes amorces et dont la méthode est également explicitée précédemment.

Tableau 5 : Amorces employées pour amplifier les cDNA et étudier l'impact sur l'épissage des mutations de la jonction intron-exon du gène *EPHB4*.

Désignation	Séquence des amorces
EPHB-Ex12-15-F	5'-TGCCCGTCATGATTCTCAC-3'
EPHB-Ex12-15-R	5'-CATGAGCTGGTGGAGGGAG-3'
β-Actin-F	5'-GCCAGGTCATCACCATTGG-3'
β-Actin-R	5'-AGGACTCCATGCCAGGAA-3'

a. Étude de l'impact des mutations pertes des fonctions du gène *EPHB4* sur

Danio rerio

i. Modèle *Danio rerio* Tg[fli1:EGFP]y1

La vasculogénèse correspond à la formation des ébauches vasculaires à partir d'amas de cellules angioblastiques. L'angiogénèse répond à la définition de la génération de néovaisseaux à partir de vaisseaux déjà présents. De nombreux modèles d'étude *in vivo* des processus de vasculogénèse et d'angiogénèse ont été générés. Ceux-ci ont été créés dans le but de décrire la succession d'évènements permettant la mise en place de l'intégralité du réseau vasculaire. Cependant, la spécificité topographique et mécanistique des MAVG implique l'étude des mécanismes de bourgeonnement des vaisseaux cérébraux à un stade embryonnaire très précoce. *Danio rerio* possède un grand nombre d'avantages pour l'étude des phénomènes de vasculogénèse :

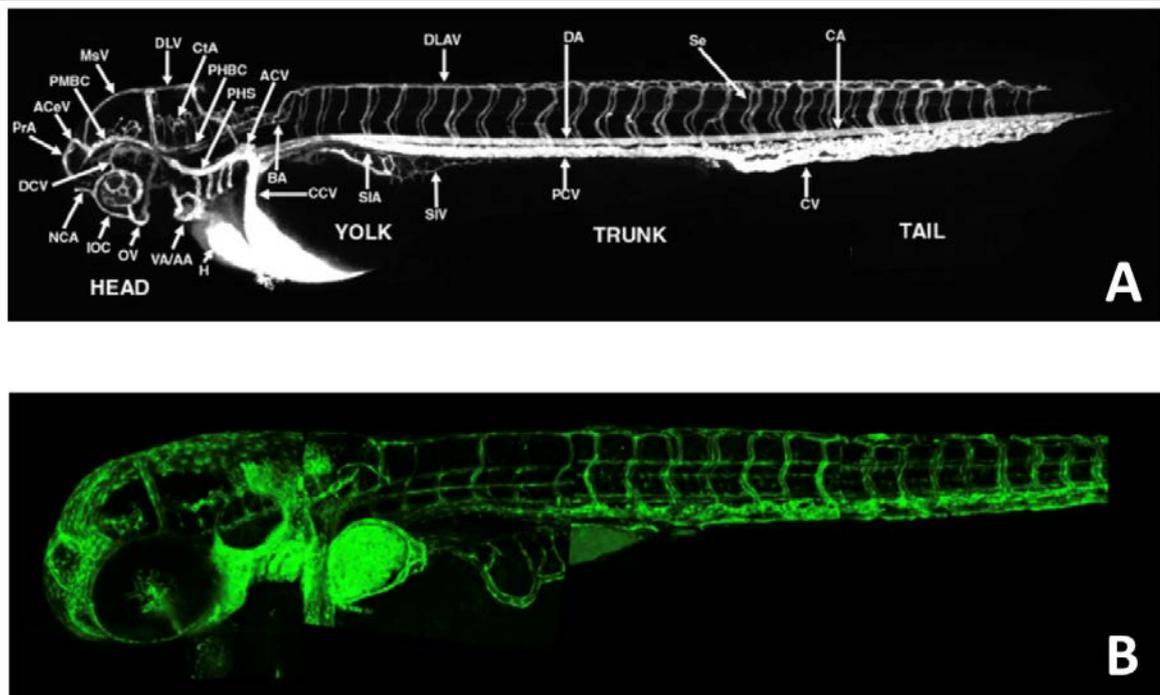
- Mise en place précoce du système neurovasculaire
- Développement larvaire rapide
- Obtention facile de pontes
- Nombreux embryons collectés à chaque ponte (une centaine en moyenne par croisement)

- Transparence des larves permettant une étude *in vivo* facilitée en microscopie confocale

Durant les premiers jours de développement, et à la différence des vertébrés, l'oxygénation des larves de *Danio rerio* s'effectue par diffusion passive et non par perfusion vasculaire. Ce mécanisme permet ainsi d'étudier des pathologies vasculaires parfois sévères et létales de façon beaucoup plus précoce chez les vertébrés.^{44,45} De plus, *Danio rerio* possède une grande conservation des voies de signalisation avec les mammifères rendant son utilisation tout à fait pertinente dans l'étude des pathologies vasculaires humaines.

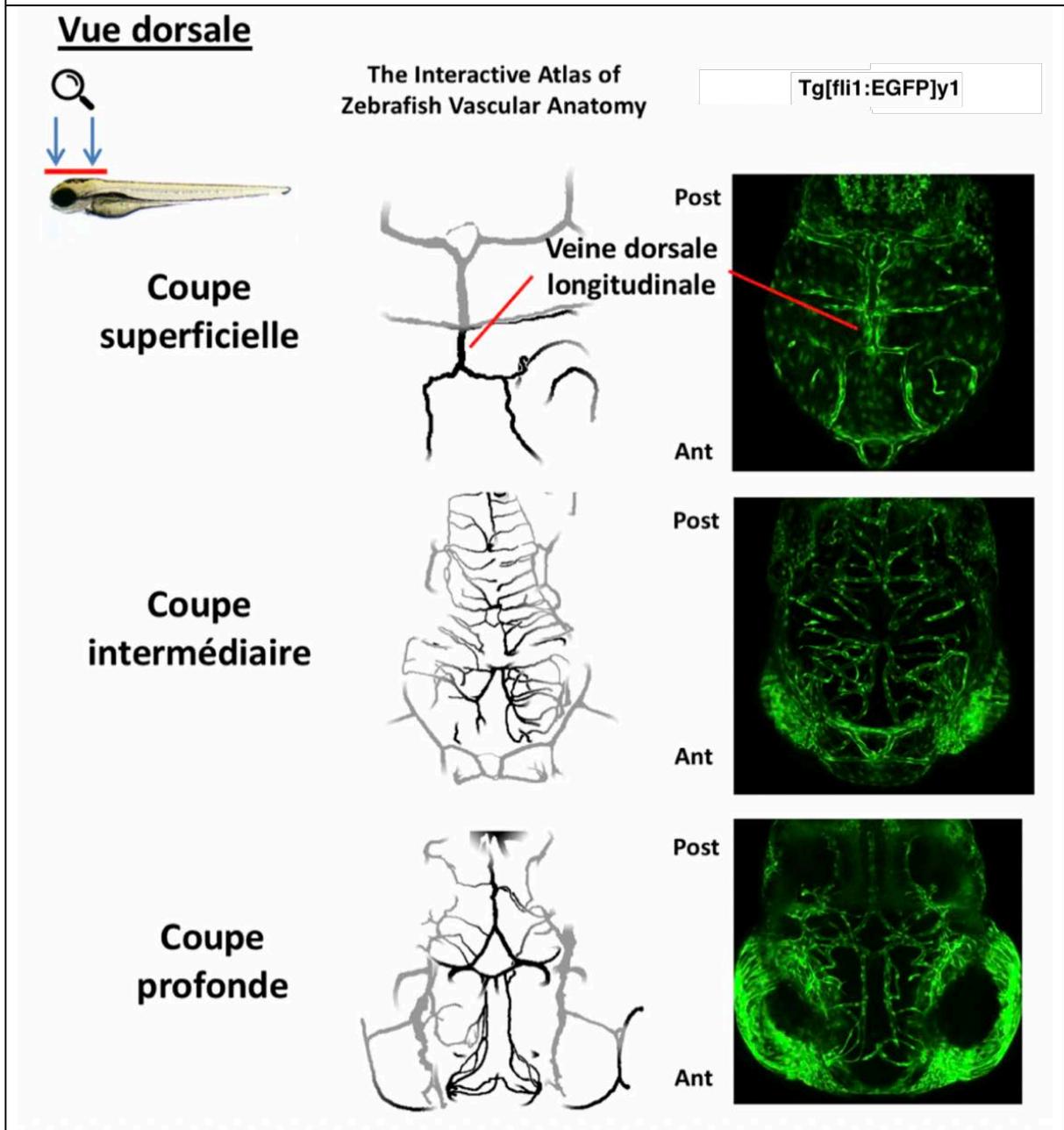
Dans le modèle transgénique *Danio rerio* Tg[fli1:EGFP]y1 employé, l'expression de la EGFP est placée sous contrôle du promoteur Fli1, marqueur de différenciation endothélial exprimé de façon très précoce au cours de l'embryogenèse.⁴⁶ De ce fait, l'expression de la EGFP permet une excellente visualisation de la vascularisation des larves de *Danio rerio* à des stades très précoces du développement. L'emploi de ce modèle est conforté par la grande homologie qui existe dans la mise en place de l'angioarchitecture neurovasculaire entre l'Homme et le *Danio rerio*. Pour rappel, la MAVG est une MAV choroïdienne se drainant dans la veine médiane du prosencéphale (veine de Markowski). Cette veine est le précurseur de la future Grande Veine de Galien. La veine dorsale longitudinale (DLV) du *Danio rerio*, parfaitement identifiable au stade 72 heures post-fertilisation (HPF), est analogue à la veine médiane du prosencéphale de l'embryon humain.⁴⁷ (**Figures 7 et 8**)

Figure 7 : Angioarchitecture du *Danio rerio* obtenue par angiographie conventionnelle et par microscopie confocale (*Danio rerio* Tg[fli1:EGFP]y1) à 72 heures post-fertilisation



A : Angiographie conventionnelle du *Danio rerio* en coupe sagittale (cliché issu de « The Interactive Atlas of Zebrafish Vascular Anatomy » ⁴⁴). **B** : Acquisition d'une coupe sagittale de *Danio rerio* (Tg[fli1:EGFP]y1) au stade 72 heures post fertilisation.

Figure 8 : Anatomie vasculaire cérébrale de la larve de *Danio rerio* 72 heures post-fertilisation (vus dorsales étagées)



La veine dorsale longitudinale de la larve de *Danio rerio* est analogue à la veine médiane du prosencéphale embryonnaire humaine, impliquée dans la MAVG.

Les schémas sont issus de « The Interactive Atlas of Zebrafish Vascular Anatomy »⁴⁴

Les images ont été générées par microscopie confocale (*Danio rerio* Tg[fli1:EGFP]y1) dans le cadre de ce travail de recherche.

ii. « *Knockdown* » du gène *Ephb4a* chez *Danio rerio* : morpholinos antisens

L'élevage des *Danio rerio* a tenu compte des recommandations actuellement en vigueur.⁴⁸ L'ensemble des manipulations effectuées ont été approuvées par les protocoles de l'Inserm.

Les morpholinos (MO) antisens ont été commandés via la plateforme en ligne Gene Tools. L'oligonucléotide Ephb4a-MO a été synthétisé afin de cibler le pré-ARNm d'*Ephb4a* afin d'interférer avec l'épissage de ce dernier (**Tableau 6**). Un oligonucléotide contrôle Ephb4a-MisMO a été synthétisé. Celui-ci comporte une substitution de 5 nucléotides par rapport à la séquence spécifique d'Ephb4a-MO. Les MO ont été dissouts dans de l'eau à une concentration finale de 0.4 mM ; 0.4 pmoles de MO ont été micro-injectés dans des embryons de *Danio rerio* au stade 1 à 4 cellules.⁴⁹ Les embryons ainsi micro-injectés ont été conservés en milieu aqueux à température constante de 26°C.

Tableau 6 : Oligonucléotides morpholinos antisens employés pour réprimer l'expression d'*Ephb4a* chez *Danio rerio*

Désignation	Séquence des oligonucléotides
EphB4a-MO	5'-CTGGAAAACACACACGAGAGATAGA-3'
5mis-EphB4a-MO	5'-CTGCAAAAGAGACACCACAGATAGA-3'

iii. Synthèse des ARNm d'*EPHB4* et micro-injection

Le cDNA (GenBank : BC052804.1) correspondant à l'ARNm pleine longueur du gène *EPHB4* humain (NM_004444.4) a été obtenu via le fournisseur Source BioScience (Nottingham, United Kingdom): cDNA inséré dans un plasmide pOTB7. L'ADN plasmidique correspondant au cDNA pleine longueur a été extrait à l'aide du kit Monarch Plasmid Miniprep KIT (NEB T1010, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) selon les recommandations du fabricant. Cinq microgrammes d'ADN plasmidique ont ensuite été linéarisés à l'aide d'une enzyme de restriction HpaI (NEB, R0105S, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) puis purifiés à l'éthanol absolu. La qualité de la digestion a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les ARNm ont été générés par transcription *in vitro* à l'aide du kit mMESSAGING mMACHINE à partir de l'ADN plasmidique linéarisé précédemment obtenu, et selon les recommandations du fabricant (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA). Les ARNm ont bénéficié d'une purification sur colonnes mini Quick Spin RNA (Roche, Boulogne-Billancourt, France) puis ont été dosés sur un Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA) à l'aide de Qubit® RNA BR Assay kits (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA). Un contrôle de la qualité a été obtenu par migration de 150ng d'ARNm sur gel d'agarose 1%. Les ARNm obtenus ont été conservés à -80°C dans l'attente de leur utilisation.

Une forme tronquée du cDNA pleine longueur d'*EPHB4* a été générée à partir du cDNA BC052804.1 après clonage afin d'exprimer une protéine tronquée, ne comprenant que ces 269 premiers acides aminés afin de mimer la mutation hétérozygote exonique *de novo* objectivée chez une patiente (partie « Résultats »). En bref, l'ADN plasmidique issu du cDNA BC052804.1 cloné dans un plasmide pOTB7 a été extrait à l'aide du kit Monarch

Plasmid Miniprep KIT (NEB T1010, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). Cinq microgrammes de cet ADN plasmidique a été digéré par l'enzyme de restriction SacII (NEB, R0105S, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) permettant la génération de 2 fragments (deux sites de restriction). Le fragment le plus important (5,3 kB) a été purifié sur gel d'agarose puis déphosphorylé (Quick dephosphorylation Kit, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). En parallèle, le cDNA issu d'une lignée lymphoblastoïde immortalisée provenant de la patiente AA5614 (partie « Résultats ») a bénéficié d'une amplification par PCR (amplification de la mutation tronquante d'*EPHB4* d'intérêt) (**Tableau 7**). Le produit de PCR a subi une étape de digestion par l'enzyme de restriction SacII. Le fragment digéré porteur de la mutation d'intérêt a ensuite été purifié sur gel d'agarose. L'ADN plasmidique déphosphorylé et l'insert porteur de la mutation tronquante d'*EPHB4* ont été ligués (T4 DNA ligase, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). Enfin, le plasmide recombiné a été transformé dans des bactéries *E. Coli* compétentes (NEB 10-Beta competent cells High efficiency, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). L'ensemble des étapes nécessaires à la génération des ARNm est similaire au paragraphe précédent.

Soixante picogrammes de chaque ARNm (forme pleine longueur et forme tronquée) ont été successivement co-injectés avec le morpholino EphB4a-MO.

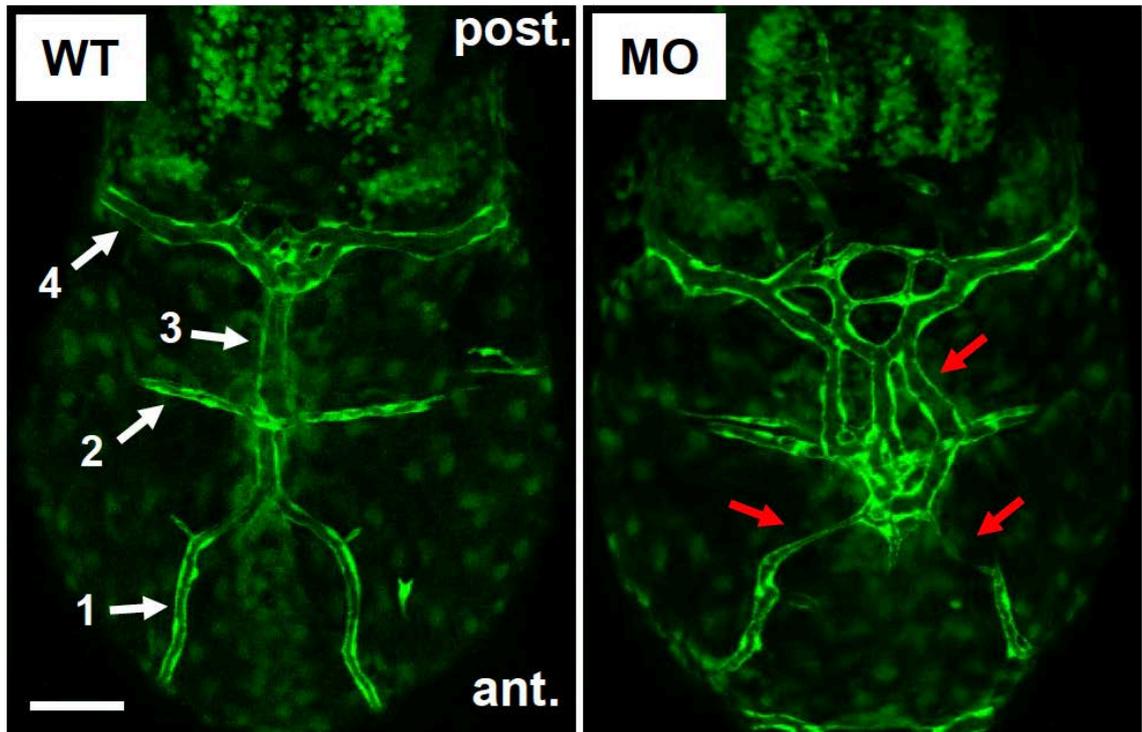
Tableau 7 : Amorces employées pour amplifier la région d'intérêt du cDNA d'<i>EPHB4</i> de la patiente AA5614	
Désignation	Séquence des oligonucléotides
EPHB570-cd_F	5'-ACTATGAGAGCGATGCGGAC-3'
EPHB570-cd_R	5'-ACTCCATTCCAGGTGCAGG-3'

iv. Observation des larves de *Danio rerio*, acquisition et traitement des images

Au 3^{ème} jour (stade 72 HPF), les larves de *Danio rerio* ont été extraites de leur milieu aquatique, ont été montées par voie dorsale et fixées avec de l'agarose *low melting* 1% sur des lentilles dédiées. Les larves ont fait l'objet d'une observation à l'aide du microscope confocal Leica TCS SP8 MP (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Les images acquises ont été traitées à l'aide du logiciel open source Image J (National Institutes of Health).

L'observation des larves de *Danio rerio* injectées par le EphB4a-MO a permis de constater l'existence d'anomalies vasculaires restreintes à un compartiment spécifique situé dans la région de la veine dorsale longitudinale (rubrique « Résultats »). Afin de quantifier les anomalies observées, deux types d'analyses ont été réalisées en lien avec la veine dorsale longitudinale (DLV) et les veines mésencéphaliques (MSV). Chaque image générée a fait l'objet d'une analyse en aveugle par deux examinateurs permettant de qualifier en phénotype normal ou anormal (**Figure 9**). La DLV pouvait être unique (phénotype normal) ou dupliquée/tripliquée (phénotype anormal). Les MSV pouvaient être deux et de calibre normal (phénotype normal) ou agénésiques/sténotiques (phénotype anormal).

Figure 9 : Évaluation des anomalies vasculaires observées chez les larves de *Danio rerio* Tg[fli1:EGFP]y1



Images générées par microscopie confocale d'embryons de *Danio rerio* au stade 72 heures post-fertilisation issues d'une lignée transgénique Tg[fli1:EGFP]y1 (coupes transversales cérébrales dorsales superficielles). Échelle (barre blanche) : 60 μ m.

- WT : embryons sauvages
- MO : embryons injectés avec le morpholino Ephb4a-MO

1) veine mésencéphalique (MSV), 2) veine cérébrale moyenne, 3) veine dorsale longitudinale (DLV), 4) veine cérébrale postérieure.

Sur la coupe MO, on peut observer une triplication de la DLV, une atrésie de la MSV droite et une agénésie de la MSV gauche. Pour l'image MO, il est conclu à un phénotype anormal pour la DLV et à un phénotype anormal pour la MSV.

iv. Analyses statistiques

Le test bilatéral t de Student a été employé afin de comparer les effectifs dans chaque groupe expérimental. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Partie IV

Résultats

I. Cohorte

Un total de 51 patients a été inclus dans la cohorte depuis le 1^{er} octobre 2014 (29 individus de sexe masculin, 25 individus de sexe féminin). La médiane d'âge à l'inclusion était de sept mois (min naissance, max 41 ans). Tous les patients de la cohorte ont bénéficié d'une expertise permettant d'attester de l'authenticité de la MAVG : par IRM anténatale et examen neuropathologique pour quatre fœtus issus d'interruptions de grossesse pour forme anténatale sévère ou par angiographie cérébrale post-natale (n=47). Tous les patients ont bénéficié d'une ou plusieurs consultations spécialisées avec un neuropédiatre et un neuroradiologue interventionnel. Une consultation de génétique dédiée a été proposée à chaque famille au cours de la période d'étude. Les parents ont donné leur consentement signé autorisant cette activité de recherche génétique.

II. Les mutations hétérozygotes du gène EPHB4 sont responsables des MAVG

a. Séquençage de l'exome entier

Un séquençage de l'exome entier a été réalisé pour les 19 premiers patients recrutés de la cohorte. Aucune mutation n'a été détectée dans les gènes *ALK1*, *SMAD4*, *ENG*, *GDF2*, *RASA1* et *PTEN*. Les variants prédits pour être pathogéniques dans des gènes partagés par au moins deux patients ont été considérés comme candidats. Sous l'hypothèse autosomique récessive, aucun gène candidat n'a été retenu. Sous l'hypothèse autosomique dominante, des variations intragéniques ont été retrouvées dans 12 gènes chez au moins trois patients. L'étude de la ségrégation intrafamiliale a montré que l'ensemble des variants testés étaient hérités d'un des deux parents pour huit gènes. Pour trois gènes, l'analyse de la ségrégation intrafamiliale est en cours. Des variants

hétérozygotes dans le gène *EPHB4* ont été identifiés chez trois patients non apparentés. Pour l'une des familles, une mutation hétérozygote non-sens dans le gène *EPHB4* a été identifiée et survenue *de novo*. Ce gène a été retenu comme étant le meilleur candidat.

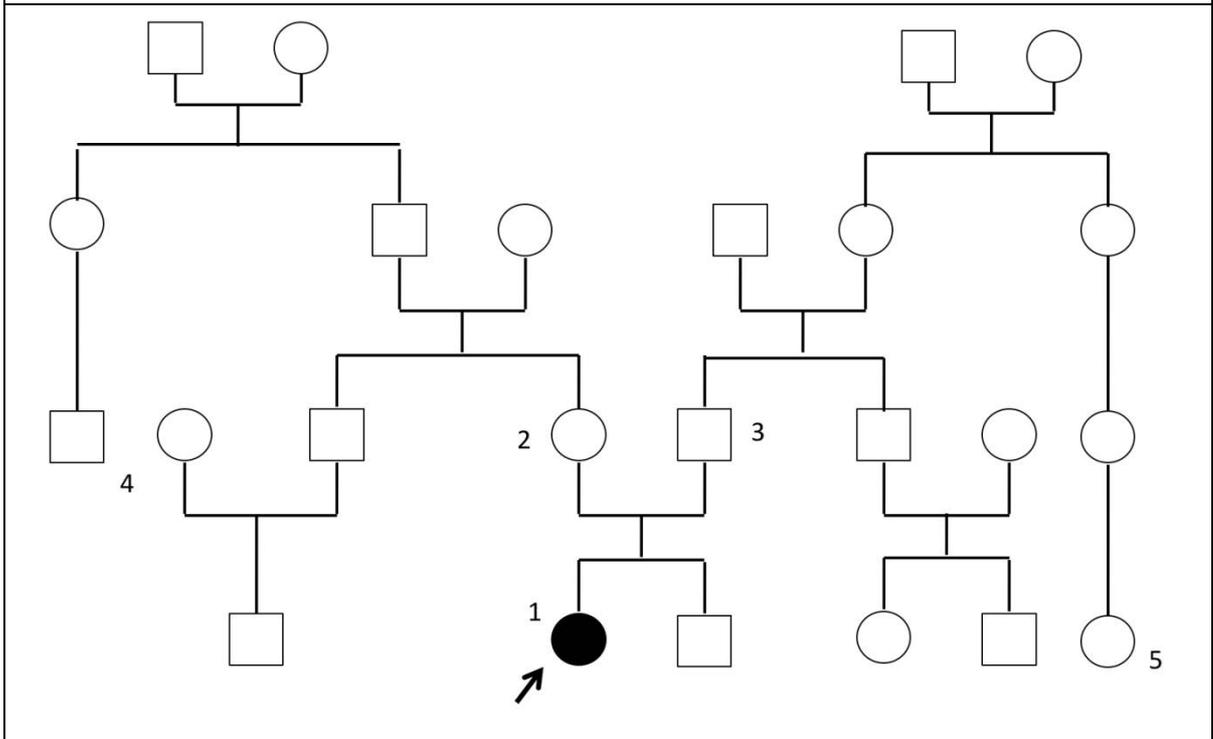
i. Patient AA5614

La première mutation objectivée concerne une enfant dont le diagnostic de MAVG a été posé durant la période anténatale par une échographie au 3^{ème} trimestre de la grossesse (**Figure 10**). La naissance a été programmée à 37 semaines d'aménorrhée (SA) par césarienne. La patiente avait bénéficié d'une IRM post natale dans les premiers jours de vie n'objectivant pas de lésion parenchymateuse compliquant la MAVG. A la date de l'inclusion dans la cohorte, trois séances d'artério-embolisation avaient été effectuées. L'examen de la patiente a permis de mettre en évidence une macrocéphalie à +2DS (fréquente chez les enfants atteintes de MAVG) et l'existence d'une malformation capillaire hémifaciale frontale droite (**Figure 11**). L'enquête familiale élargie ne retrouve pas d'antécédent vasculaire et/ou cérébral relevant. Les parents de la patiente avaient récemment bénéficié d'une IRM cérébrale récente sans particularité.

Le séquençage de l'exome entier a révélé l'existence d'une mutation hétérozygote correspondant à l'insertion d'un nucléotide en 5' du gène *EPHB4* (NM_004444: c.570dupG:p.L190fs). Cette insertion, située au niveau de l'exon 4, est à l'origine d'un décalage du cadre de lecture et de l'apparition d'un codon stop prématuré entraînant la synthèse d'une protéine tronquée. Cette mutation n'est pas rapportée dans les principales bases de données ExAc et 1000 génomes. L'étude de la ségrégation

intrafamiliale par séquençage Sanger a révélé le caractère *de novo* de la mutation.

Figure 10 : Arbre généalogique de la famille du patient AA5614



- 1 : Diagnostic de MAVG sur l'échographie obstétricale du 3^{ème} trimestre. Évolution du périmètre crânien à +2DS. Angiome facial étendu frontal droit. Quatre embolisations à l'âge de 2 ans
- 2 : Exploration de vertiges : IRM cérébrale normale en 2015
- 3 : Exploration de migraines ophtalmiques : IRM cérébrale normale en 2015
- 4 : Pied varus unilatéral et asymétrie des mains
- 5 : Cardiopathie congénitale sans précision

Figure 11 : Malformation capillaire - Patient AA5614



Malformation capillaire hémifaciale droite et macrocéphalie (+2 DS)

ii. Patient AA5615

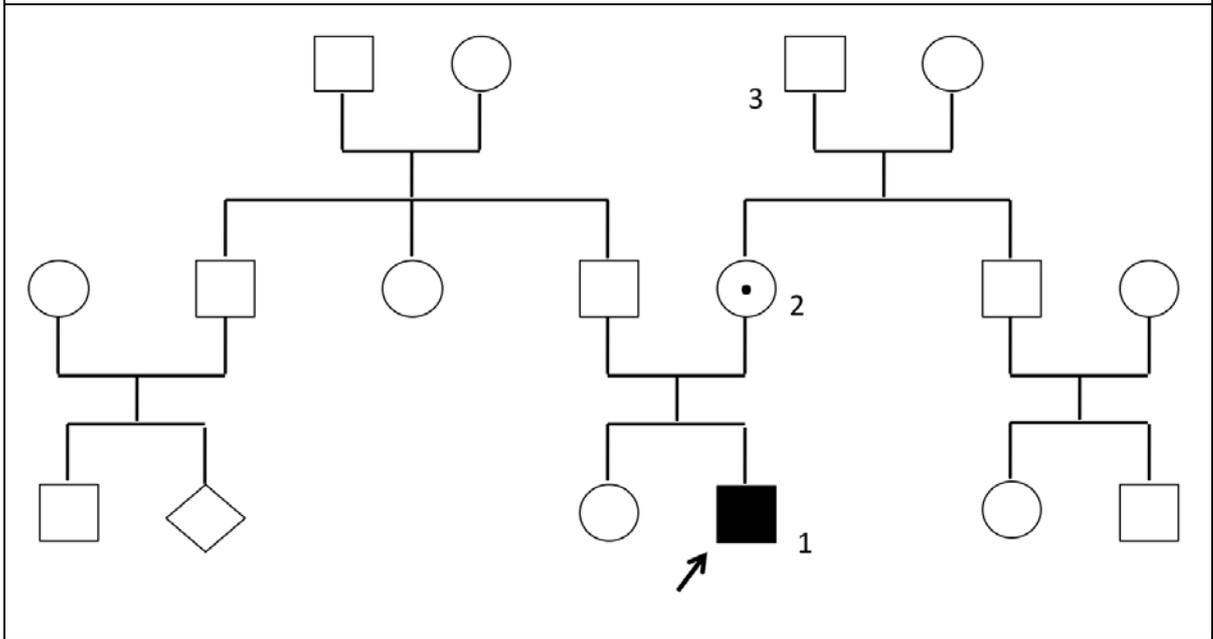
La seconde mutation identifiée dans le gène *EPHB4* par séquençage de l'exome entier concerne un garçon de sept ans dont le diagnostic de MAVG avait été porté à l'issue de l'échographie du 3^{ème} trimestre de la grossesse (**Figure 12**). L'angiographie cérébrale post-natale avait confirmé la MAVG dans une forme murale. Trois séances d'artério-embolisation avaient été nécessaires afin d'oblitérer le shunt. L'évolution clinique était favorable : développement psychomoteur normal à l'âge de huit ans. L'examen clinique a permis de mettre en évidence l'existence de multiples malformations capillaires supra-centimétriques cutanées. Ces mêmes malformations capillaires ont été observées chez la mère de la patiente, elle-même indemne de toute pathologie vasculaire antérieure (**Figure 13**).

Figure 12 : Malformations capillaires - Patient AA5615



Malformations capillaires multiples supracentimétriques disséminées sur le tronc et les membres.

Figure 13 : Arbre généalogique de la famille du patient AA5615



1 : Diagnostic de MAVG sur l'échographie du 3^{ème} trimestre. Développement psychomoteur normal à l'âge de 8 ans. Évolution du périmètre crânien à +2,5DS. Malformations capillaires multiples supra-centimétriques disséminées.
2 : Migraines à bascule. Malformations capillaires.
3 : Décès accidentel à l'âge de 35 ans. Notion d'infarctus du myocarde.

Le séquençage de l'exome entier a révélé l'existence d'une mutation intronique hétérozygote à type de substitution nucléotidique située à un nucléotide de la jonction intron-exon 14 (NM_004444:c.2484+1G>T). L'étude de la ségrégation intrafamiliale par séquençage Sanger a confirmé la mutation chez l'enfant atteint ainsi que chez sa mère. Cette mutation co-ségrège avec le phénotype de malformations capillaires. Cette mutation n'est pas rapportée dans les bases de données ExAc et 1000 Génomes. L'analyse de cette mutation par les logiciels de prédiction de pathogénicité *in silico* (NetGene2⁵⁰ ; Human Splicing Finder⁵¹) suggère une altération du site donneur d'épissage. Une lignée immortalisée lymphoblastoïde a été produite pour le patient AA5615 et pour sa mère. L'étude de l'épissage, à partir des ARNs extraits à partir de ces dernières lignées et d'une lignée issue d'un contrôle, a confirmé l'impact délétère de la mutation

NM_004444:c.2484+1G>T (deux transcrits de taille différente) à l'origine d'un nouveau site d'épissage et d'un transcrit de taille réduite (**Figure 14**). Le séquençage des transcrits sauvages et mutants a confirmé l'existence d'un épissage alternatif induit par la mutation : le transcrit mutant, de plus petite taille, est réduit de 48 nucléotides par rapport au transcrit sauvage, aux dépens de l'exon 14. Ce nouvel épissage se traduit par une protéine tronquée de 16 acides aminés (p.Met814_Val829del). Ces acides aminés non retenus se situent au sein du site catalytique tyrosine kinase du récepteur EphB4, région à très haut niveau de conservation inter-espèces (**Tableau 8**).

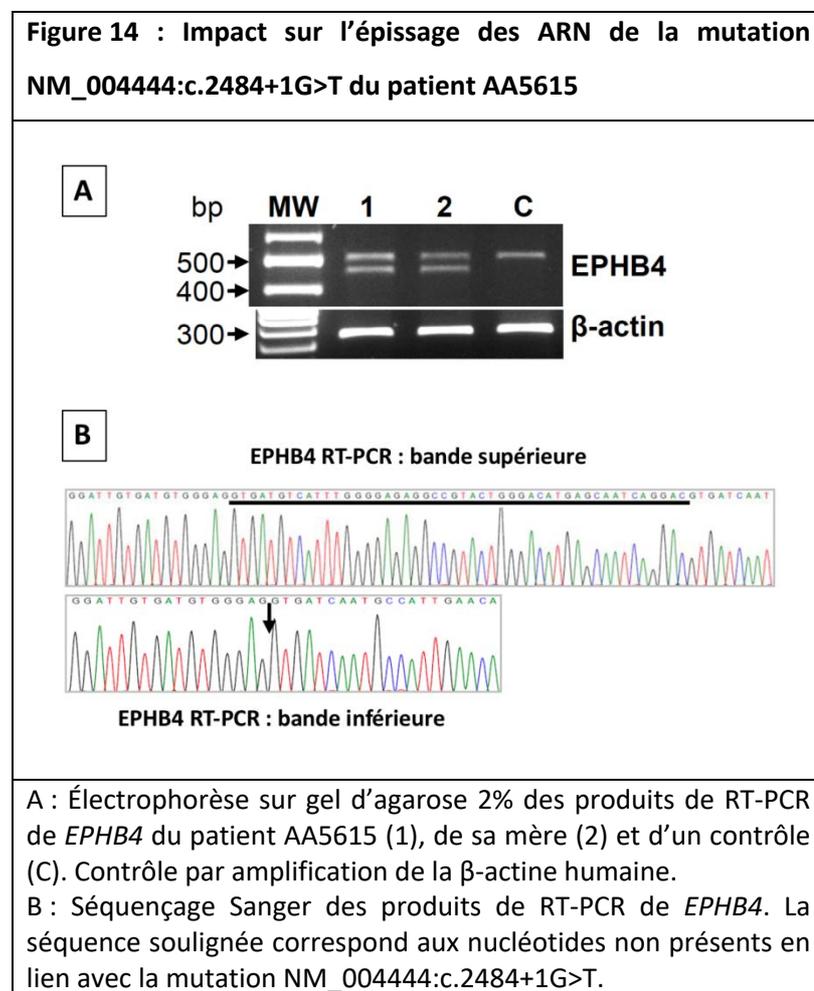


Tableau 8 : Haut niveau de conservation protéique de la région impliquée par la mutation d'épissage du patient AA5615 (surlignée en vert)

Query	PEAIAFRKFTSASDAWSYGIVMWE VMSFGERPYPWMSNQD VINAIEQDYRLPPPPDCPT
NP_001153043
NP_001193197
NP_004435
NP_571489C...V.....S.
NP_571492V.....E...
XP_002803271
XP_003751205
XP_519269
XP_546948

NP_001153043	ephrin type-B receptor 4 isoform a precursor [<i>Mus musculus</i>]
NP_001193197	ephrin type-B receptor 4 precursor [<i>Bos taurus</i>]
NP_004435	ephrin type-B receptor 4 precursor [<i>Homo sapiens</i>]
NP_571489	eph receptor B4a precursor [<i>Danio rerio</i>]
NP_571492	eph receptor B4b precursor [<i>Danio rerio</i>]
XP_002803271	PREDICTED: ephrin type-B receptor 4-like [<i>Macaca mulatta</i>]
XP_003751205	PREDICTED: ephrin type-B receptor 4 isoform X1 [<i>Rattus norvegicus</i>]
XP_519269	PREDICTED: ephrin type-B receptor 4 isoform X2 [<i>Pan troglodytes</i>]
XP_546948	PREDICTED: ephrin type-B receptor 4 [<i>Canis lupus familiaris</i>]

iii. Patient AA5616

Le diagnostic de MAVG a été porté au 4^{ème} jour après la naissance en raison d'une insuffisance cardiaque à haut débit qui a pu être contrôlée à l'aide d'un traitement médical. L'examen dermatologique de ce patient n'a trouvé aucun stigmate de malformation capillaire. Il n'existe par ailleurs pas d'antécédent familial notable. Ce patient a également bénéficié d'une prise en charge neurovasculaire par artériomembolisations répétées. Son développement psychomoteur était normal à la date d'inclusion (âge de 10 ans).

L'analyse par séquençage de l'exome entier a mis en évidence une mutation hétérozygote d'*EPHB4* correspondant à une insertion nucléotidique à deux nucléotides de la même jonction intron-exon que le patient AA5615 (NM_004444:c.2484+2insT). Cette mutation n'est également pas rapportée dans les bases de données ExAc ni 1000

Génomés. L'analyse de cette mutation par les logiciels de prédiction de pathogénicité *in silico*⁵⁰⁻⁵² suggère une altération du site donneur d'épissage. L'étude de la ségrégation intra-familiale par séquençage Sanger a montré que cette mutation était héritée du père du patient, lui-même indemne de toute pathologie neurovasculaire. L'étude de l'épissage n'a pu être réalisé en raison de l'impossibilité de nouvelle collection de matière biologique chez le patient et son père à la date de rédaction du présent manuscrit.

b. Séquençage ciblé du gène *EPHB4*

i. Patient AA5717

Le diagnostic de MAVG a été porté durant la période anténatale par échographie au 3^{ème} trimestre. L'évolution clinique a été rapidement défavorable en raison de la survenue d'une atteinte cérébrale sévère *in utero* associant une dilatation tri-ventriculaire à des lésions de leucomalacie péri-ventriculaire sévère (dédiérenciation complète de la substance blanche et grise à l'IRM cérébrale fœtale). Le couple a été demandeur d'une interruption médicale de grossesse qui a été pratiquée au terme de 40 semaines d'aménorrhée. L'examen fœtopathologique a confirmé l'existence de la MAVG associée à un œdème cérébral, à une congestion des vaisseaux arachnoïdiens et parenchymateux, et à une altération neuronale du ruban cortical.

Une mutation hétérozygote faux-sens du gène *EPHB4* (NM_004444:c.2609T>A:p.(Val870Glu)) a été identifiée par séquençage ciblé. Cette mutation est prédite *in silico* pour être pathogénique par les logiciels PolyPhen-2 (1.0) et SIFT (0.0). Cette mutation est située dans l'exon 15, qui code également pour le site catalytique du récepteur tyrosine kinase EphB4. Elle n'est pas répertoriée dans les bases

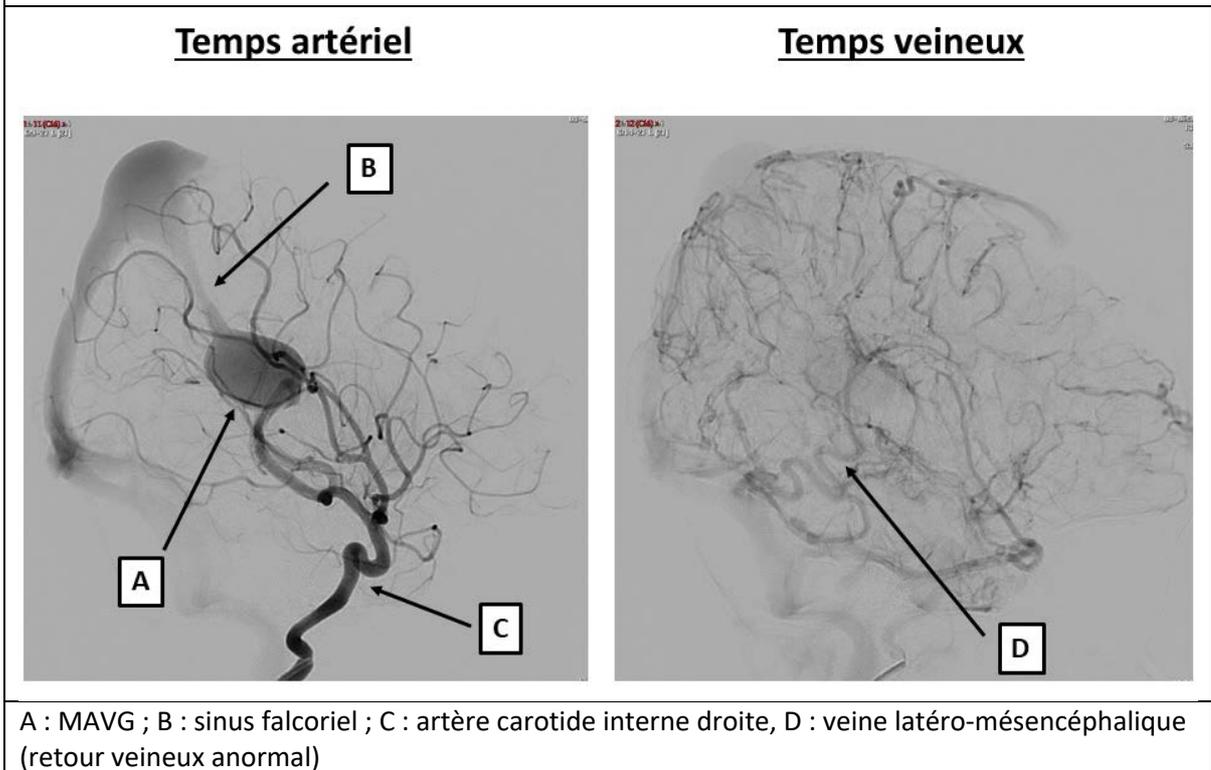
de données ExAc et 1000 Génomes. Cette mutation est héritée de la mère qui est elle-même indemne de toute pathologie neurovasculaire symptomatique ou de malformation capillaire.

ii. Patient AA5718

La dernière patiente a bénéficié d'un dépistage anténatal de la MAVG lors de l'échographie du 3^{ème} trimestre. Le post-partum initial était sans complication (notamment pas de décompensation cardiaque). L'artériographie réalisée à l'âge de 3 mois a confirmé la MAVG dans une forme murale (**Figure 15**). L'examen cutané de la patiente n'a pas objectivé de malformations capillaires associées. Aucune notion d'angiomatose familiale ni d'antécédent vasculaire n'a été rapportée au sein de la famille de la patiente.

L'analyse par séquençage ciblé a montré l'existence d'une mutation hétérozygote faux-sens du gène *EPHB4* (NM_004444.4:c.319T>C:p.(Cys107Arg)). Cette mutation est prédite pour être pathogénique par les logiciels de prédiction *in silico* PolyPhen-2 (1.0) et SIFT (0.0). Cette mutation, non répertoriée, est héritée de la mère de la patiente, elle-même indemne de toute pathologie neurovasculaire.

Figure 15 : Angiographie cérébrale de la patiente AA5718 en coupe sagittale au temps artériel et veineux à l'âge de 3 mois



Les mutations d'*EPHB4* objectivées au sein de la cohorte de patients atteints d'une MAVG sont rapportées sur le **Tableau 9**. Elles concernent soit le domaine de liaison au ligand, soit le domaine catalytique du récepteur tyrosine kinase (**Figure 16**). Une synthèse des caractéristiques cliniques des cinq patients impliqués par ces mutations est fournie dans la **Figure 17**.

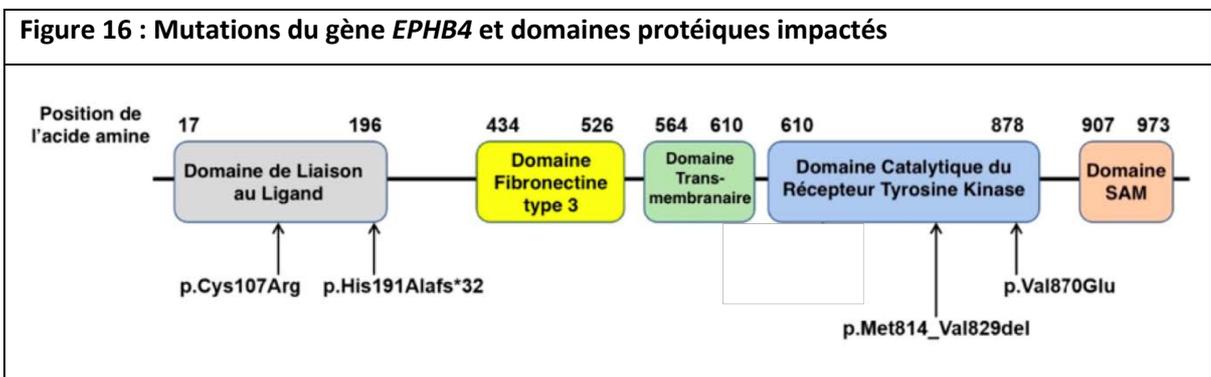


Figure 17 : Mutations du gène *EPHB4* dans la cohorte de patients atteints d'une MAVG et ségrégation intra-familiale

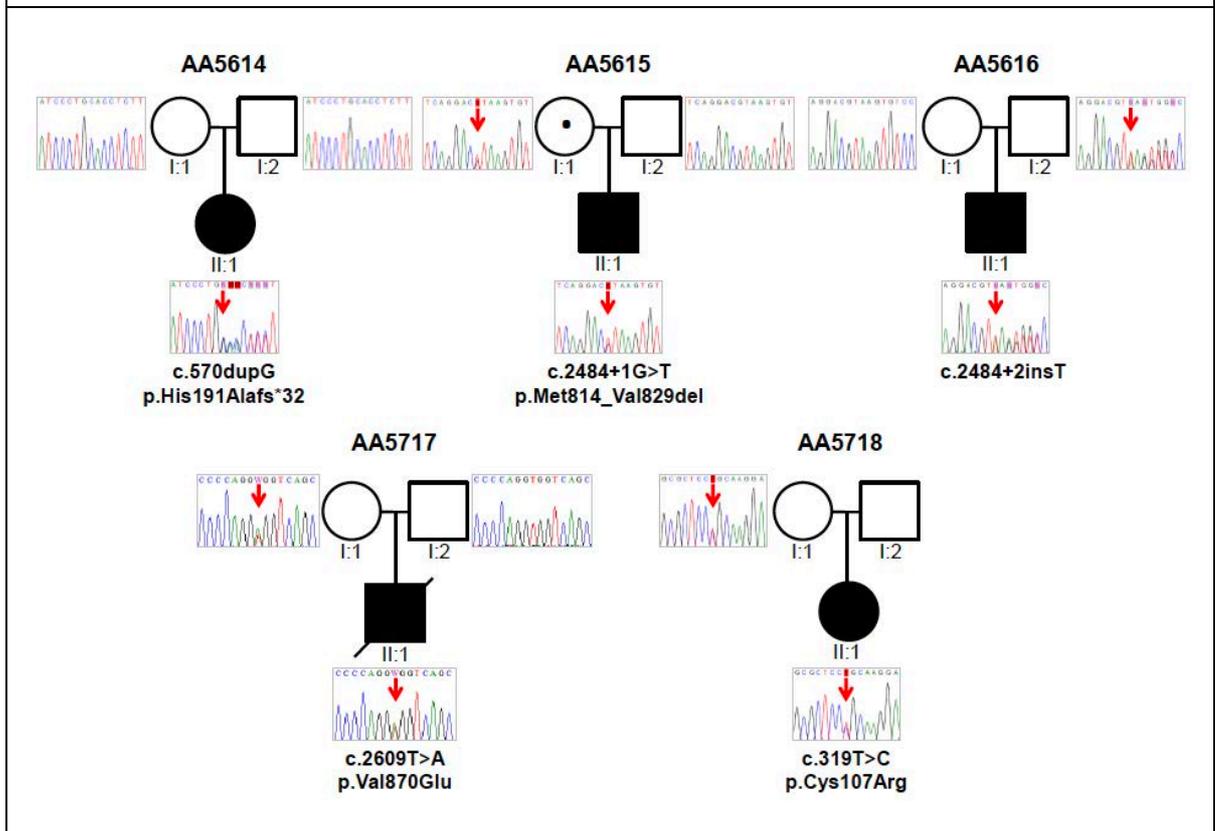


Tableau 9 : Caractéristiques cliniques et génétiques des patients de la cohorte MAVG porteurs d'une mutation du gène *EPHB4*

Patients	AA5614	AA5615	AA5616	AA5717	AA5718
Caractéristiques cliniques					
Âge au diagnostic	Prénatal : échographie du 3 ^{ème} trimestre	Prénatal : échographie du 3 ^{ème} trimestre	Postnatal : 4 jours de vie (décompensation cardiaque)	Prénatal : échographie du 3 ^{ème} trimestre	Prénatal : échographie du 3 ^{ème} trimestre
Signes associés (IRM)	Aucun	Aucun	N/A	Hydrocéphalie et leucomalacie*	Inconnu
Périmètre crânien à la naissance (cm, percentile)	35, 90	38, 97	37, 90	37.5, 97	32, 20
Insuffisance cardiaque néonatale	Non	Non	Oui : contrôlée sous traitement médical	N/A	Non
Âge à la 1 ^{ère} embolisation (mois)	2	6	4	N/A	3.5
Malformations capillaires associées	Oui, hémifaciale	Oui, disséminées	Non	Inconnu	Non
Développement psychomoteur (âge à l'évaluation)	Normal (3 ans)	Normal (8 ans)	Normal (10 ans)	N/A	Normal (2 ans)
Mutations d'<i>EPHB4</i>					
cDNA	c.570dupG	c.2484+1G>T	c.2484+2insT	c.2609T>A	c.319T>C
Transmission	<i>de novo</i>	Mère	Père	Mère	Mère
Modification protéique	p.His191Alafs*32	p.Met814_Val829del	Inconnu	p.Val870Glu	p.Cys107Arg
Domaine protéique	Protéine tronquée	Domaine catalytique PTK	Domaine catalytique PTK	Domaine catalytique PTK	Domaine de liaison au ligand
Polyphen-2	N/A	N/A	N/A	Probablement pathogène (1)	Probablement pathogène (1)
SIFT	N/A	N/A	N/A	Délétère (0.0)	Délétère (0.0)
1000 Genomes MAF	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
ExAc Browser MAF	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
N/A: non-applicable; MAF: minor allele frequency; * interruption médicale de grossesse; PTK: Protéine Tyrosine Kinase					

c. Recherche d'insertion/délétion dans le gène *EPHB4*

L'étude de la cartographie d'homozygotie à partir des données de séquençage haut débit du gène *EPHB4* a permis d'identifier 14 patients présentant au moins 3 SNP consécutifs homozygotes. L'amplification par PCR en temps réel d'*EPHB4* a été réalisée en utilisant des couples d'amorces situées au niveau des exons 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13 et 16 (le gène *EPHB4* comporte 17 exons). Aucune délétion hétérozygote n'a été mise en évidence. L'existence d'une potentielle duplication de ces exons a également été écartée pour ces 14 patients.

d. Recherche de mutations somatiques dans le gène *EPHB4*

Quatre fœtus issus d'interruptions médicales de grossesses ont été inclus dans la cohorte. Pour chaque fœtus était disponible une biopsie de tissu anévrysmale ainsi qu'une biopsie pulmonaire. Un séquençage de l'exome ciblé a été réalisé sur de l'ADN extrait de chacun de ces tissus et pour chaque fœtus. Aucune mutation somatique du gène *EPHB4* n'a été mise en évidence en dehors de la mutation germinale déjà identifiée pour le patient AA5717 (NM_004444:c.2609T>A:p.(Val870Glu)).

III. Génération et caractérisation d'un modèle animal de MAVG chez le poisson

Danio rerio

a. « Knockdown » du gène orthologue

Le but de cette analyse était de déterminer l'impact des mutations d'*EPHB4* sur le phénotype neurovasculaire cérébral. Les oligonucléotides morpholinos anti-sens (*Ephb4a*-MO) et leur contrôle 5-mismatch morpholinos (5mis-*Ephb4a*-MO) ont été générés afin

d'effectuer un « knockdown » spécifique du gène orthologue *ephb4a* chez *Danio rerio* transgénique Tg[fli1:EGFP]y1. Les embryons ont été analysés au stade de 72 HPF après acquisition en microscopie confocale.

b. Caractérisation des morphants

L'angioarchitecture des larves transgéniques injectées avec le contrôle 5-mismatch morpholinos (5mis-Ephb4a-MO) était parfaitement identique à celle des larves contrôles sans injection (n=29) (**Figures 18 et 19**).

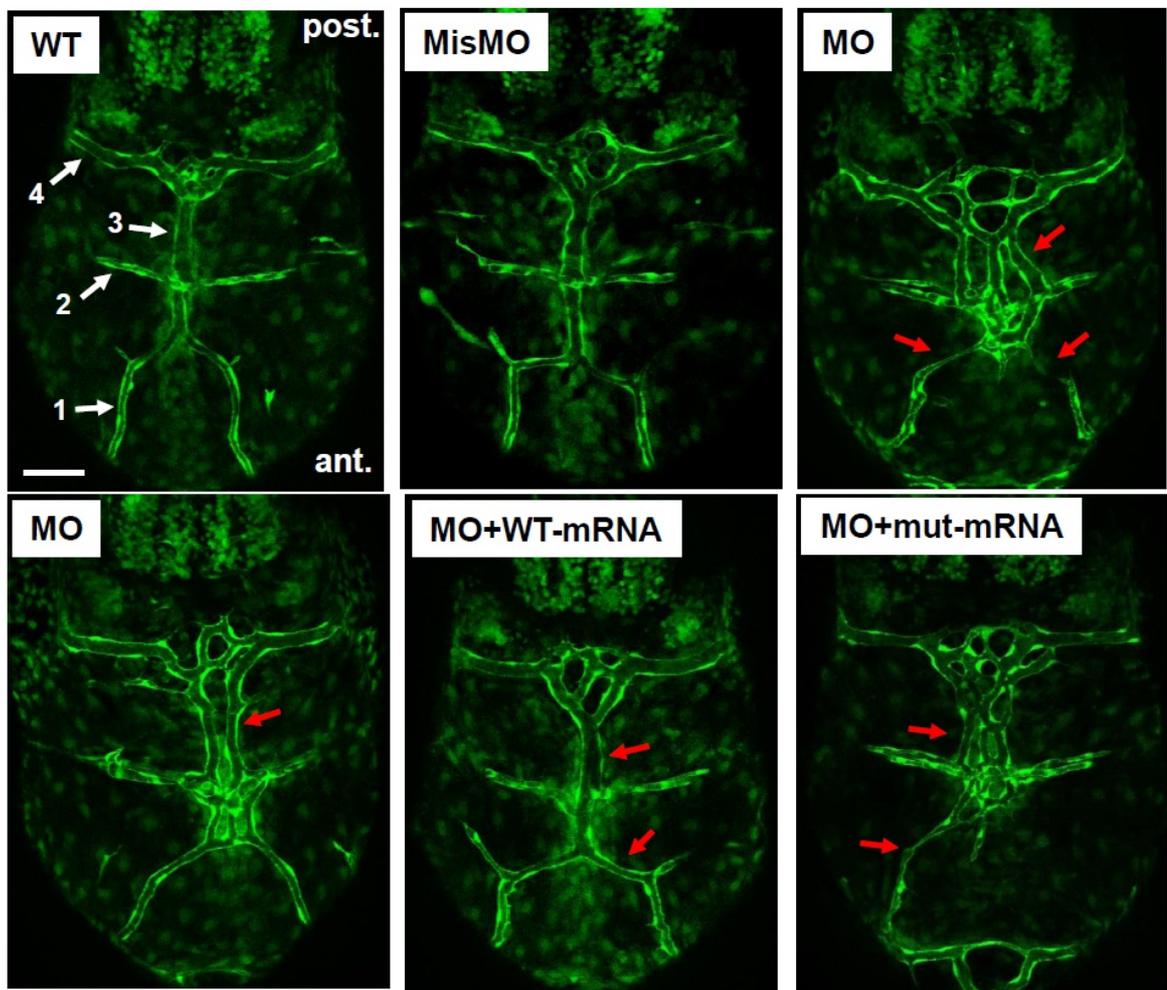
L'analyse systématisée du compartiment vasculaire cérébral à différents étages a permis de mettre en évidence une altération du phénotype vasculaire chez les embryons de *Danio rerio* ayant été injectés avec le morpholino anti-sens (Ephb4a-MO). Ces anomalies étaient circonscrites à l'étage dorsal superficiel et impliquaient exclusivement la veine dorsale longitudinale et les veines mésencéphaliques. Ces anomalies étaient caractérisées par une anomalie de nombre de la veine dorsale longitudinale qui pouvait être dupliquée ou tripliquée, représentant 82% des embryons injectés par le Ephb4a-MO (n=14/17) contre 0% des embryons contrôles non injectés (n=0/21) et contre 0% des embryons injectés par le 5mis-Ephb4a-MO (n=0/8 ; p<0.0001). De façon similaire, des anomalies de la morphologie des veines mésencéphaliques (agénésie ou sténose ; uni ou bilatérale) ont été notées de façon significativement importante chez les embryons injectés par le Ephb4a-MO (76% ; n=13/17) par rapport aux embryons contrôles non injectés (0% ; n=0/21) et aux embryons injectés par le 5mis-Ephb4a-MO (0% ; n=0/8 ; p<0.0001). L'examen des couches encéphaliques intermédiaires et profondes ne nous a pas permis de mettre en évidence d'autres anomalies vasculaires liées à l'injection du

Ephb4a-MO (**Figure 20**). Cela atteste de la spécificité topographique des anomalies morphologiques vasculaires induites par l'injection du Ephb4a-MO.

c. Réversion du phénotype morphant par micro-injection d'ARN EPHB4 sauvage

Afin d'investiguer le lien de causalité entre les anomalies vasculaires observées chez *Danio rerio* et l'injection de Ephb4a-MO, nous avons procédé à un test de restauration du phénotype sauvage par injection concomitante d'un ARNm d'*EPHB4* pleine longueur (WT-mRNA). La co-injection de WT-mRNA avec le Ephb4a-MO aboutit à une réduction significative des anomalies vasculaires cérébrales observées aussi bien pour les veines mésencéphaliques (8% ; n=1/13 ; p<0.0001) que pour la veine dorsale longitudinale (23% ; n=3/13 ; p<0.001) par rapport à l'injection isolée de Ephb4a-MO. A l'inverse, la co-injection d'un ARNm tronqué, permettant de mimer la mutation de la patiente AA5614, n'a pas permis de réduction significative des anomalies vasculaires observées aussi bien pour les veines mésencéphaliques (75% ; n=15/20 ; p=0.66) que pour la veine dorsale longitudinale (80% ; n=16/20 ; p=0.86). L'ensemble de ces observations atteste de la spécificité du « knockdown » d'*ephb4a*. Par ailleurs, ces données confirment que les mutations sont responsables d'une perte de fonction du gène *EPHB4* à l'origine des MAVG.

Figure 18 : Anomalies vasculaires cérébrales induites par l'inactivation de l'expression d'*ephb4a* chez les embryons de *Danio rerio* 72 heures post-fertilisation

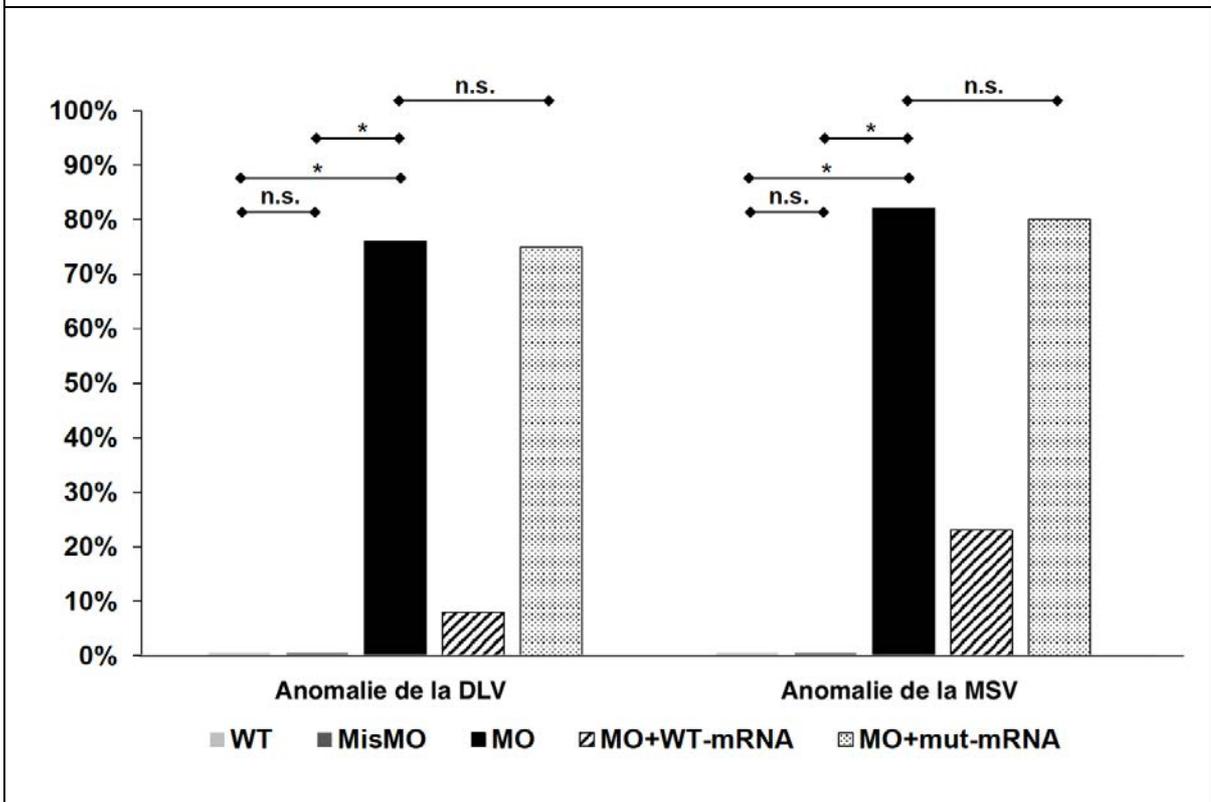


Images générées par microscopie confocale d'embryons de *Danio rerio* au stade 72 heures post-fertilisation issus de la lignée transgénique Tg[fli1:EGFP]y1 (coupes transversales cérébrales dorsales superficielles). Échelle (barre blanche) : 60 μ m.

- WT : embryons sauvages
- MisMO : embryons injectés avec le morpholino contrôle 5mis-Ephb4a-MO
- MO : embryons injectés avec le morpholino Ephb4a-MO
- MO+WT-mRNA : embryons co-injectés avec le morpholino Ephb4a-MO et l'ARNm pleine longueur d'*EPHB4*
- MO+mut-mRNA : embryons co-injectés avec le morpholino Ephb4a-MO et l'ARNm tronqué d'*EPHB4* correspondant à la mutation de la patiente AA5614

1) veine mésencéphalique, 2) veine cérébrale moyenne, 3) veine dorsale longitudinale, 4) veine cérébrale postérieure

Figure 19 : Anomalies vasculaires cérébrales induites par la répression de l'expression du gène *Ephb4a* et restauration du phénotype sauvage chez *Danio rerio*

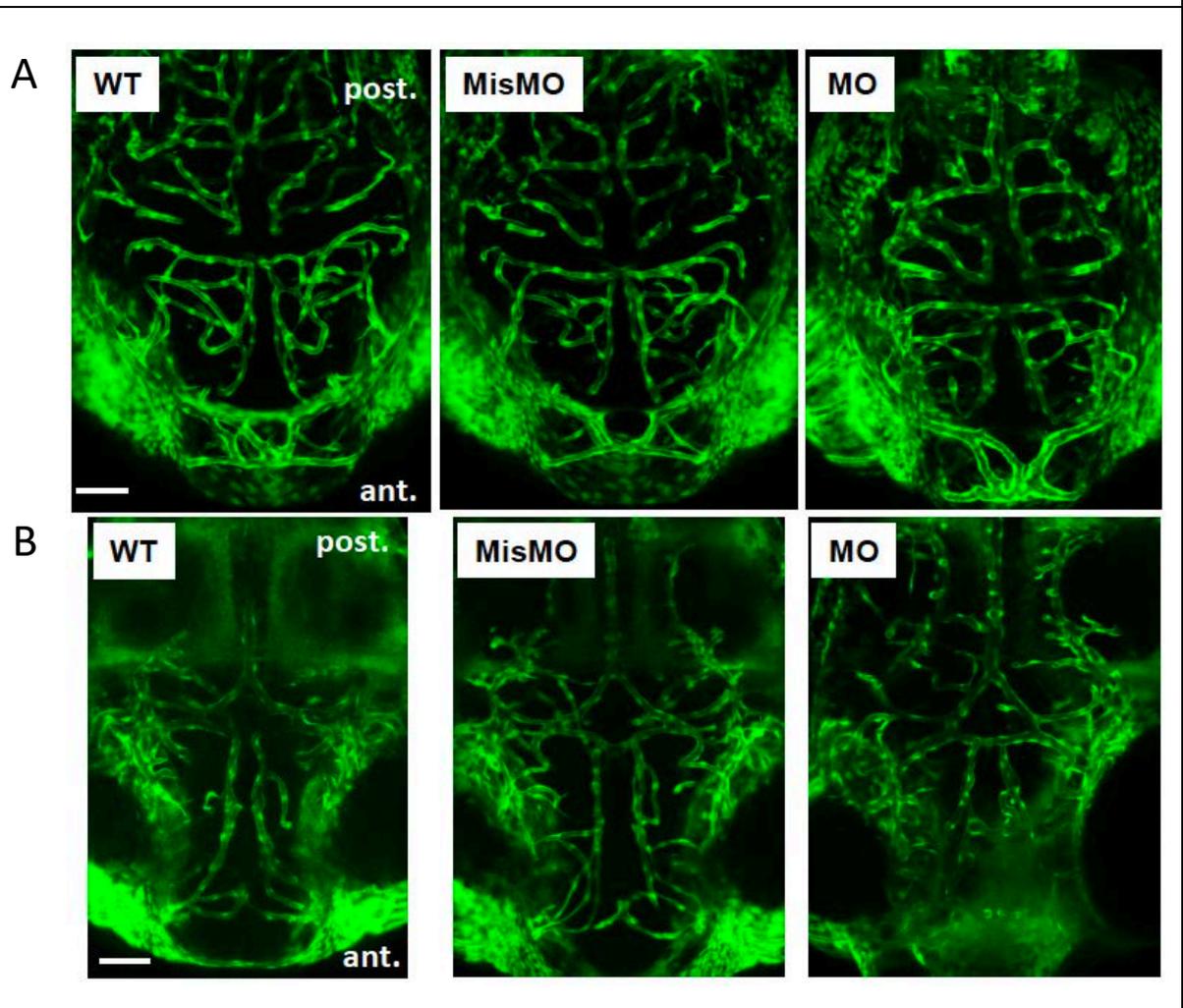


- WT : embryons sauvages (n=21)
- MisMO : embryons injectés avec le morpholino contrôle 5mis-Ephb4a-MO (n=8)
- MO : embryons injectés avec le morpholino Ephb4a-MO (n=17)
- MO+WT-mRNA : embryons co-injectés avec le morpholino Ephb4a-MO et l'ARNm pleine longueur d'*EPHB4* (n=13)
- MO+mut-mRNA : embryons co-injectés avec le morpholino Ephb4a-MO et l'ARNm tronqué d'*EPHB4* correspondant à la mutation de la patiente AA5614 (n=20)

Les embryons de *Danio rerio* transgénique (Tg[fli1:EGFP]y1) ont été observés au stade 72 heures post-fertilisation et ont bénéficié d'une analyse morphologique au niveau de la veine dorsale longitudinale (DLV) et de la veine mésencéphalique (MSV).

*p<0.0005; n.s. = non significatif.

Figure 20 : Morphologie vasculaire cérébrale de la larve de *Danio rerio* sauvage et après invalidation de l'expression du gène *Ephb4a* (étage moyen et étage profond) 72 heures post-fertilisation



Images générées par microscopie confocale d'embryons de *Danio rerio* au stade 72 heures post-fertilisation issues de la lignée transgénique Tg[fli1:EGFP]y1 (coupes transversales cérébrales dorsales moyennes (**A**) et profondes (**B**)).

- WT : embryons sauvages
- MisMO : embryons injectés avec le morpholino contrôle 5mis-Ephb4a-MO
- MO : embryons injectés avec le morpholino Ephb4a-MO

Les phénotypes vasculaires cérébraux des étages moyens (**A**) et profonds (**B**) sont identiques chez les larves de *Danio rerio* sauvages par rapports à celles qui ont subi une invalidation d'expression du gène *Ephb4a* par micro-injection de morpholino.

Partie V

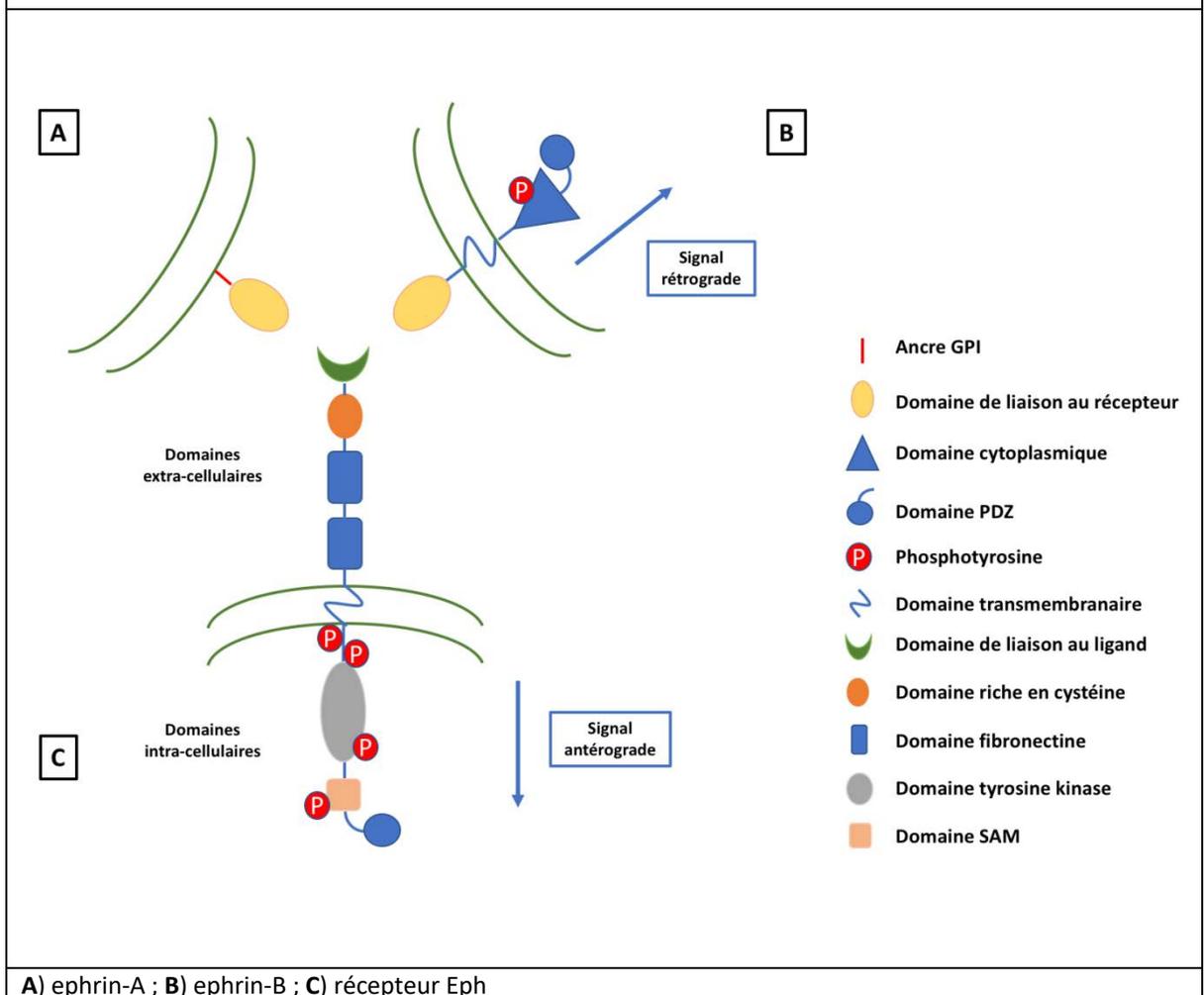
Discussion

Nous rapportons l'identification de mutations germinales hétérozygotes du gène *EPHB4* chez cinq patients atteints d'une MAVG au sein d'une cohorte de 51 patients. Ces cinq mutations, non répertoriées, sont composées d'une mutation tronquante *de novo* située en 5' du gène, de deux mutations de la jonction intron-exon impactant le même site d'épissage, ainsi que de deux mutations faux sens prédites pour être pathogéniques. Les caractéristiques intrinsèques génétiques de ces mutations sont renforcées par la démonstration de l'impact de la répression de l'expression d'*EPHB4* sur l'altération du phénotype vasculaire cérébral de la larve de *Danio rerio*. L'ensemble de ces données démontre que ces mutations sont responsables d'une perte de fonction du gène *EPHB4*. Ces données génétiques et fonctionnelles démontrent le caractère pathogénique de ces mutations et leur implication dans la genèse des MAVG.

Ephrin type B receptor 4 (EPHB4) appartient à la famille des récepteurs Eph qui elle-même appartient à la super famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Tous les récepteurs Eph sont composés des domaines suivants : un domaine extracellulaire globulaire de liaison au ligand, un domaine Cys (comprenant des motifs sushi et *epidermal growth factor-like*), de deux unités répétées fibronectine de type III, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine intra-cellulaire à activité tyrosine kinase adjacent à un domaine *sterile alpha motif* (SAM) et d'un domaine PDZ (**Figure 21**).⁵³ Les récepteurs Eph comportent deux sous-familles : les récepteurs EphA comportent 9 membres (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8 et EphA10) et les récepteurs EphB comportent 5 membres (EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 et EphB6).^{54,55} Les ligands des récepteurs Eph appartiennent à la famille des *Eph family receptor interacting proteins (ephrins)* qui comportent deux sous-familles selon qu'elles soient arrimées à la

membrane cytoplasmique à l'aide d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (ephrin-A1, ephrin-A2, ephrin-A3, ephrin-A4 et ephrin-A5) ou bien qu'elles disposent d'un domaine transmembranaire (ephrin-B1, ephrin-B2 et ephrin-B3). La sous-famille des ephrin-A est dépourvue de domaine intra-cellulaire. D'une façon générale, la sous-famille de ligands ephrin-A a une affinité spécifique pour les récepteurs de la sous-famille EphA. Il en est de même pour les ligands ephrin-B avec les récepteurs EphB. Il existe quelques exceptions à cette règle : EphA4 est capable de se lier aux ligands de la sous-famille ephrin-B, de même, EphB2 est capable de se lier à ephrin-A5.⁵⁶

Figure 21 : Représentation schématique de la structure des récepteurs Eph et des ligands ephrins



La grande famille des éphrines est impliquée dans de multiples fonctions cellulaires. Historiquement, la première fonction décrite, et largement étudiée, correspond à leur implication dans le développement du système nerveux. Le signal relayé par l'interaction ephrin-Eph est capable d'impacter les communications cellulaires à courte distance. On note une fonction prépondérante des éphrines dans le guidage axonal⁵⁷, dans la prolifération des cellules souches nerveuses^{58,59} et dans la formation synaptique.⁶⁰ Les couples ephrin-Eph ont également un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la séparation des tissus durant la période embryonnaire^{61,62} et l'organisation du cytosquelette dans plusieurs types cellulaires et tissus.⁶³ Plus récemment, le système des éphrines a été reconnu pour son implication notable dans le développement des vaisseaux endothéliaux (vasculogenèse et angiogenèse) et lymphatiques (lymphangiogenèse), par le biais de l'interaction d'un couple spécifique : ephrin-B2-EphB4. Ephrin-B2 (codé par le gène *Efnb2*) est capable d'activer le récepteur EphB4 à travers un signal antérograde (*forward signalling*). Le contact du ligand avec son récepteur induit l'autodimérisation de ce dernier et la transphosphorylation des domaines tyrosines kinases intra-cytoplasmiques. La stimulation du récepteur EphB4 est responsable d'une activation des voies de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/AKT/mTOR) et des *mitogen activated protein kinases* (MAPK/ERK). De multiples résidus tyrosine intra-cytoplasmiques sont présents dans la portion intra-cytoplasmique des récepteurs Eph. Ces derniers sont doués de la capacité d'autophosphorylation et de recrutement de protéines adaptatrices dont les protéines de la famille Ras-GAP, comme la protéine RAS p21 protein activator 1 codée par le gène *RASA1*.⁶⁴⁻⁶⁶

L'interaction ephrin-B2-Ephb4 est également capable d'activer ephrin-B2 via un signal rétrograde (*reverse signalling*) responsable d'une activité bidirectionnelle. Le concept de signal bidirectionnel pour les couples ephrin-Eph a été mis en évidence grâce à des études chez *Danio rerio* et sur modèle murin. Une première équipe a développé un modèle poisson (*animal cap assay*) dans lequel il était possible d'observer l'existence de frontières nettes entre deux populations cellulaires adjacentes (l'une exprimant une forme sauvage d'ephrin-B2 et l'autre une forme sauvage d'EphB2).⁶⁷ Cette frontière est permise par le phénomène de répulsion cellulaire induit par le couple ephrin-B2-EphB2. Cependant, l'expression de formes tronquées des protéines EphB2 ou ephrin-B2 (formes dépourvues de leur domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase) aboutissait à la perte de ces frontières induisant un entremêlement de ces deux populations cellulaires. Ce résultat signifiait que la répulsion cellulaire nécessaire à l'établissement de cette frontière nécessitait aussi bien l'activation du ligand ephrin-B2 que de son récepteur EphB2. Ces données ont été par la suite confirmées par des travaux réalisés chez la souris.⁶⁸ Dans ce modèle, les souris exprimant à l'état homozygote une protéine ephrin-B2 dépourvue de leur portion intracellulaire présentaient des anomalies vasculaires aussi sévères que les souris *knock-out* (KO) homozygotes vis-à-vis du gène *EFNB2*. Ces résultats suggèrent que la mise en place du système vasculaire chez la souris requiert l'activation d'ephrin-B2. Cependant, les souris exprimant la même forme tronquée d'ephrin-B2 ne présentaient pas d'anomalie de la migration des cellules des crêtes neurales à la différence des souris KO vis-à-vis d'*EFNB2*. Ces résultats indiquent que le développement vasculaire nécessite la bonne fonctionnalité du signal rétrograde d'ephrin-B2 (présence du site catalytique intracellulaire tyrosine kinase) alors qu'il n'est pas nécessaire pour la mise en place des cellules des crêtes neurales chez l'embryon. D'autres travaux menés

chez la souris montrent que des souris KO homozygotes vis-à-vis du gène *EPHB4* présentent un phénotype vasculaire similaire aux souris KO homozygotes du gène *EFNB2*.⁶⁹ Les anomalies vasculaires cérébrales objectivées correspondaient à des défauts de modelage de principaux axes vasculaires impactant de façon équivalente veines et artères. On notait également des fusions de réseaux capillaires. Le KO homozygote de ces deux gènes est par ailleurs létal avec une pénétrance importante. Dans cette étude de 1999, aucune anomalie morphologique vasculaire n'avait été mise en évidence chez les embryons hétérozygotes (étude en immunohistochimie). Malgré la grande similitude des phénotypes observés lors de l'inactivation de l'expression des gènes *EPHB4* et *EFNB2* sur les modèles animaux, aucune mutation codante de ce dernier gène n'a pu être mise en évidence chez les 19 patients ayant bénéficié du séquençage de l'exome entier.

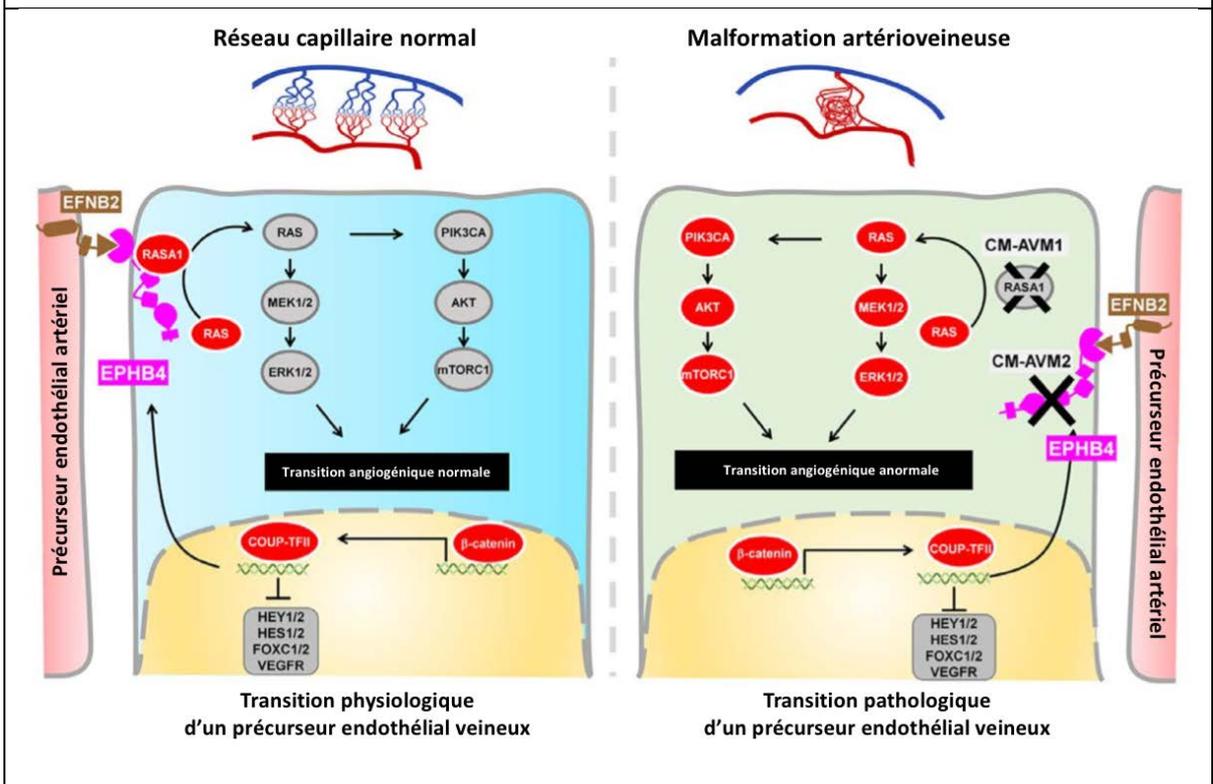
Il a été démontré que les cellules endothéliales artérielles et veineuses ont une programmation moléculaire mise en place dès les stades les plus précoces du développement du système vasculaire. Cette dualité est révélée par l'expression différentielle de protéines en fonction du type cellulaire endothélial : l'expression d'ephrin-B2 est ubiquitaire mais marque de façon spécifique les cellules endothéliales artérielles^{70,71} alors qu'EphB4 est particulièrement exprimée à la surface des cellules endothéliales veineuses.⁷² Une répression de l'expression du gène *EFNB2* empêche le modelage des veines à partir de capillaires.⁷³ De plus, cette répression empêche également le développement harmonieux des artères, ce qui suggère que des interactions réciproques entre cellules endothéliales veineuses et artérielles sont nécessaires pour le bon déroulement du processus d'angiogenèse. La formation des deux vaisseaux embryonnaires majeurs primitifs, l'aorte dorsale et la veine cardinale, est sous

la dépendance directe du couple ephrin-B2-Ephb4. Les travaux réalisés chez *Danio rerio* ainsi que chez la souris montrent que l'aorte dorsale est le premier vaisseau à se mettre en place. Celle-ci contient une population mixte de cellules exprimant soit ephrin-B2 soit Ephb4. Le signal engendré par l'interaction entre cellules endothéliales ephrin-B2+ et cellules Ephb4+ est responsable d'une répulsion entre ces deux populations cellulaires. Ce mécanisme aboutit à un bourgeonnant de cellules exprimant Ephb4 à partir de l'aorte dorsale. Ce contingent cellulaire sera à l'origine de la formation de la veine cardinale.^{74,75}

Les mutations pertes de fonction du gène *RASA1* sont responsable du syndrome CM-AVM 1.^{19-21,25} De façon récente, des mutations pertes de fonction du gène *EPHB4* ont également été impliquées dans un syndrome phénotypiquement similaire : CM-AVM 2.⁷⁶ Ces syndromes se manifestent par l'existence de malformations capillaires auxquelles peuvent s'associer des MAV dont les territoires sont variables. Cinquante et une mutations distinctes d'*EPHB4* ont été isolées grâce à une étude de l'exome entier au sein de cinq familles ainsi que par le criblage d'une cohorte de 54 cas index non apparentés. Il s'agissait pour moitié de codons stop prématurés ou de mutations d'épissage suggérant le caractère perte de fonction de ces mutations. Aucune des mutations de cette étude n'était similaire aux mutations mises en évidence dans notre cohorte. Les patients mutés vis-à-vis d'*EPHB4* de l'étude de Amyere et al. étaient porteurs de malformations capillaires alors que seuls 12 patients étaient également atteints d'une MAV. Sur ces 12 patients, un seul était porteur d'une MAV cérébrale notifiée comme une MAVG. Cependant, aucune donnée morphologique n'était fournie pour confirmer le diagnostic nosologique. Notre étude souligne le fait qu'une mutation perte de fonction peut également être à l'origine d'une MAV cérébrale en l'absence de malformations capillaires.

Les mutations pertes de fonction de *RASA1* et *EPHB4* sont responsables d'une activation constitutive de la protéine RAS ainsi que des voie de signalisation MAPK/ERK et PI3K/AKT/mTORC1 en aval.⁷⁶ Cette activation constitutive a été constatée au sein de tissus de patients porteurs de mutations de *RASA1*.⁶⁴ Elle est à l'origine de la différenciation veineuse anormale et de la désorganisation vasculaire observée dans les MAVG. Les protéines RAS appartiennent à la famille des GTPases. Ces protéines sont codées par trois gènes distincts : *NRAS*, *HRAS* et *KRAS*. Les protéines RAS sont impliquées dans la transduction du signal après activation de divers récepteurs à activité tyrosine kinase dont le *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGF-R). Certaines mutations somatiques pathogéniques du gène *KRAS* sont connues pour générer des tumeurs malignes. L'équipe de Radovanovic a récemment rapporté l'existence d'une prévalence importance de mutations somatiques pathogéniques au sein de MAV cérébrales (62% des individus).⁷⁷ L'hypothèse de l'existence d'une mosaïque somatique impliquant *KRAS* au sein de notre cohorte de patients atteints de MAVG a été testée. Le séquençage Sanger de l'ADN issu de tissu affecté n'a révélé aucune mutation dans les régions codant de *KRAS* sur les quatre fœtus testés.

Figure 22 : Rôle d'EPHB4 et de RASA1 dans la genèse des malformations artério-veineuses



Les précurseurs endothéliaux à destinée artérielle (en rouge) expriment EphrinB2 et inhibent l'expression de marqueurs veineux (Ephb4 et COUP-TFII qui est un facteur de transcription d'EPHB4). Les précurseurs endothéliaux à destinée veineuse (en bleu) expriment COUP-TFII et Ephb4 et inhibent la voie de signalisation Notch. L'interaction physiologique entre EphrinB2 et son récepteur Ephb4 inhibe les voies RAS/MEK/ERK et RAS/AKT/mTORC1. Un défaut d'expression de RAS p21 protéin activator 1 ou Ephb4 est responsable d'une activation constitutive de la protéine RAS ainsi que des voies de signalisation RAS/MEK/ERK et RAS/AKT/mTORC1 en aval, à l'origine d'une différenciation veineuse anormale et d'une désorganisation vasculaire.

Schéma adapté de Amyere et al.⁷⁶

Dans notre cohorte et à ce jour, dix pour cent des patients atteints d'une MAVG sont porteurs d'une mutation pathogénique d'*EPHB4*. Certaines limites inhérentes aux techniques employées sont à mentionner. L'analyse des données de séquençage de l'exome entier doit tenir compte des limites de cette approche. La technique de séquençage employé comporte une étape dite de capture. Cette capture est possible grâce au *design* d'amorces qui vont s'hybrider aux régions d'intérêt. Il peut arriver que certaines régions soient mal couvertes et seront donc moins bien capturées puis séquencées. Si une mutation d'intérêt se situe dans une telle région, elle ne sera pas correctement séquencée et non détectée. C'est notamment le cas de mutations situées à distance des jonctions intron-exon ou dans les régions non codantes. De même, les insertions ou délétions de grande taille sont mal détectées, ou encore les anomalies de méthylation et les mutations dans des gènes très homologues (en raison des difficultés d'alignement). De la même façon, la profondeur de lecture médiane doit impérativement être vérifiée. Elle correspond au nombre de fois qu'une base données sera séquencée. Cette dernière tient compte de la taille de la cible à séquencer (ici, l'exome entier : approximativement 30 megabases), du nombre d'échantillons séquencés sur le même *run* ainsi que de la capacité de séquençage du séquenceur. Plus la profondeur de lecture est importante, plus grande est la probabilité de séquencer un variant d'intérêt. D'autres paramètres rentrent en compte dans l'analyse des données. L'application de filtres successifs permet de réduire le nombre de variants potentiellement candidats. Certains de ces filtres prennent en compte des bases de données qui sont évolutives. Dans le cas de malformations congénitales rares, l'analyse tient compte de la fréquence de l'allèle mineure (MAF) qui est comparé à la fréquence de survenue de la maladie. Dans le contexte des MAVG, l'incidence estimée de survenue de cette pathologie est estimée à

environ 30 nouveaux cas annuels en France pour une moyenne de 800 000 naissances. En se plaçant dans une hypothèse de transmission autosomique dominante, le seuil fixé dans notre étude à 0.003 était donc approprié. Les MAF sont issues de base de données publiques (1000 genome project et Exome Aggregation Consortium pour notre étude) qui sont régulièrement mises à jour. Une stratégie d'analyse régulière des données d'exome doit être mise en place afin d'augmenter le taux de succès en cas de première analyse non concluante. De la même façon, les mutations faux-sens subissent un filtrage à l'aide de scores de prédiction de pathogénicité *in silico* (PolyPhen et SIFT pour notre étude). Les mises à jour récurrentes de ces algorithmes doivent être prises en compte car les scores de prédiction de pathogénicité sont susceptibles de varier (possibilité de retenir un variant antérieurement exclu et réciproquement). La ré-analyse régulière des données d'exome non contributifs doit intégrer ces évolutions. L'ensemble de ces mesures, si elles sont correctement contrôlées, est susceptible d'augmenter le taux de détection de variants pathogéniques pour une pathologie donnée.

Certains paramètres non techniques peuvent également constituer une limite dans le taux de détection de variants pathogéniques. L'homogénéité du phénotype au sein d'une cohorte est un facteur essentiel. La cohorte MAVG a été constituée sur la base d'une expertise neuroradiologique assurée par le centre de référence des malformations neurovasculaires congénitales de Bicêtre. L'homogénéité phénotypique a été confirmée par l'analyse angiographique cérébrale : toutes les MAVG des patients de la cohorte répondaient à la définition précise telle que stipulée dans la partie I du manuscrit. Ce faisant, il était licite de croiser l'ensemble des données bioinformatiques afin d'identifier un ou plusieurs gènes communs. Au fur et à mesure des inclusions, nous avons constaté

une forte prévalence de malformations capillaires chez les patients de la cohorte. Ces malformations capillaires n'étaient pas systématiquement signifiées par les patients à l'interrogatoire et nécessitaient un examen dermatologique complet. Un examen physique et une enquête génétique approfondie ont permis de faire émerger un sous-groupe de patients porteurs de malformations capillaires associées aux MAVG. La qualité du phénotypage est apparue essentielle dans un contexte de maladie à transmission dominante et à expressivité variable. Compte-tenu de nos résultats et de l'association fréquente des MAVG à des malformations capillaires chez les patients porteurs de mutations d'*EPHB4*, nous avons entrepris le séquençage de l'exome entier chez les patients présentant cette association et qui ne portaient pas de mutation d'*EPHB4* par séquençage d'exome ciblé ou Sanger (n=6). Par cette approche, nous sélectionnons ainsi un sous-groupe de patients à phénotype vasculaire cutané et cérébral semblable, ce qui devrait nous permettre, nous l'espérons, l'identification de nouveaux gènes candidats.

Enfin, le taux de détection de dix pour cent de mutations d'*EPHB4* dans notre cohorte peut trouver une explication dans la physiopathologie même des MAV. Comme décrit précédemment, une publication récente a démontré que l'existence de mosaïques somatiques permettait d'expliquer la genèse de certaines MAV. Des mutations somatiques de *KRAS* ont été mises en évidence dans plus de 60% des MAV cérébrales.⁷⁷ L'hypothèse d'une mosaïque somatique de *KRAS* a été testée et exclue concernant quatre fœtus inclus dans la cohorte. Il pourrait être envisagé de poursuivre les investigations par un séquençage de l'exome entier comparatif (tissu lésé contre tissu indemne). La limite principale de l'exploration des mosaïques est liée au mode de prise en charge thérapeutique des MAV et plus particulièrement des MAVG en France. La sclérose par

artériembolisation est préférentiellement pratiquée à la différence d'autres pays qui optent plus volontiers par un traitement chirurgical. Ce dernier offre une source d'ADN de tissu lésé qu'il n'est pas possible d'obtenir par la technique d'embolisation. Dans notre étude, la seule source d'ADN de tissu lésé a été exclusivement obtenue dans le cadre d'interruptions médicales de grossesse.

Le modèle *Danio rerio* transgénique Tg[fli1:EGFP]y1 trouve toute sa place dans la caractérisation des anomalies neurovasculaires chez l'Homme pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la mise en place de la circulation vasculaire cérébrale et les mécanismes moléculaires aboutissant à l'angiogenèse et à la vasculogenèse possèdent une grande homologie avec celle de *Homo sapiens*^{44,78}. Dans notre étude, la répression de l'expression du gène *EPHB4* impacte de façon spécifique la région vasculaire correspondant, par analogie, à la Grande Veine de Galien chez l'Homme.⁴⁷ Cette correspondance a été permise grâce aux travaux antérieurement menés par l'équipe du Professeur Lasjaunias. Le développement des modèles de poissons exprimant des protéines fluorescentes sous contrôle de promoteurs impliqués dans la vasculogenèse a largement facilité l'étude *in vivo* des mécanismes physiologiques et pathologiques du développement vasculaire embryonnaire à des stades de plus en plus précoces.⁷⁹⁻⁸¹ Plusieurs modèles de poissons zèbres ont montré des résultats significatifs dans l'étude de pathologies neurovasculaires telles que l'angiopathie cérébrale amyloïde⁸², certaines MAV cérébrales^{83,84}, les cavernomes cérébraux⁸⁵, les vascularites cérébrales des gros vaisseaux (maladie de Moyamoya)⁸⁶ ou encore les accidents vasculaires cérébraux ischémiques⁸⁷. Les voies de signalisations impliquant *EPHB4* et *RASA1* ont été étudiées grâce au modèle *Danio rerio* transgénique Tg[fli1:EGFP]y1 employé dans notre étude.⁶⁴

Les auteurs ont étudié l'effet de l'inactivation de l'expression des gènes *RASA1* et *EPHB4* sur la mise en place des vaisseaux intersomitiques. Par une approche de morpholinos, il a été montré que la perte d'expression de *RASA1* aboutissait à des anomalies vasculaires similaires à la perte d'expression d'*EPHB4* chez la larve de *Danio rerio*. Ces anomalies concernaient la formation des vaisseaux intersomitiques ainsi que la vascularisation caudale des poissons zèbres qui était amputée chez les morphants. Il est à noter que ces anomalies n'ont pas été reproduites sur notre modèle avec des conditions expérimentales similaires. De plus, les auteurs de cette étude n'ont pas exploré la vascularisation cérébrale chez les morphants dont l'expression d'*EPHB4* était réprimée.

Les mutations perte de fonction d'*EPHB4* sont à l'origine d'anomalies spécifiques du développement vasculaire cérébral. *EPHB4* a également été impliqué dans la mise en place du réseau lymphatique au cours de la vie embryonnaire.⁸⁸ Récemment, des mutations germinales d'*EPHB4* ont été rapportées dans le syndrome d'anasarque fœtale non immunologique en lien avec des malformations du réseau lymphatique.⁸⁹ Deux mutations hétérozygotes faux-sens ont été rapportées dans le domaine catalytique de la tyrosine kinase (p.Arg739Glu et p.Ile782Ser). L'association de ces données aux résultats obtenus dans notre étude permet de conclure que les mutations germinales hétérozygotes d'*EPHB4* sont responsables d'entités nosologiques vasculaires dont le spectre est large. L'identification de mutations pathogéniques d'*EPHB4* chez des patients présentant des malformations capillaires implique une surveillance attentive de la grossesse. Cette surveillance échographique renforcée pourrait permettre la détection précoce d'une MAVG et une prise en charge anténatale et néonatale optimale. Par ailleurs, l'utilisation de drogues comme la rapamycine, qui est un inhibiteur de la voie

mTORC1, pourrait faire l'objet d'une étude dans la prévention des récurrences de MAVG. Il serait intéressant de tester les effets de l'administration de rapamycine sur les anomalies vasculaires cérébrales observées sur notre modèle *Danio rerio* Tg[fli1:EGFP]y1 knockdown pour ephb4. Un effet bénéfique pourrait ouvrir la voie à un traitement par cette molécule. La rapamycine employée en tant que thérapie ciblée des malformations vasculaires telles que CM-AVM, malformations lymphatiques et veineuses et dans la sclérose tubéreuse de Bourneville fait l'objet actuellement de plusieurs essais thérapeutiques de phase 2 et 3 (NCT01811667, NCT02042326, NCT00975819). Compte tenu du rôle essentiel de la voie de signalisation mTOR sur le développement cérébral, l'administration de rapamycine durant la grossesse implique des études préalables poussées sur des modèles animaux.

Partie VI

Bibliographie

1. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(8):457-474. doi:10.1038/nrc.2017.51
2. Raybaud CA, Strother CM, Hald JK. Aneurysms of the vein of Galen: embryonic considerations and anatomical features relating to the pathogenesis of the malformation. *Neuroradiology*. 1989;31(2):109-128.
3. Raybaud C. Normal and Abnormal Embryology and Development of the Intracranial Vascular System. *Neurosurg Clin N Am*. 2010;21(3):399-426. doi:10.1016/j.nec.2010.03.011
4. Ozanne A, Alvarez H, Krings T, Lasjaunias P. Pathologie neurovasculaire malformative de l'enfant: malformations anévrismales de la veine de Galien (MAVG), malformations artérioveineuses piales (MAVP), malformations des sinus duraux (MSD). *J Neuroradiol*. 2007;34(3):145-166. doi:10.1016/j.neurad.2007.04.005
5. Husson B, Lasjaunias[†] P. Malformations vasculaires cérébrales de l'enfant. *Datatraitesrx31-41804*. September 2008. <http://emvmsa1a.jouve-hdi.com/article/183659>. Accessed May 8, 2018.
6. Deloison B, Chalouhi GE, Sonigo P, et al. Hidden mortality of prenatally diagnosed vein of Galen aneurysmal malformation: retrospective study and review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012;40(6):652-658. doi:10.1002/uog.11188
7. Frawley GP, Dargaville PA, Mitchell PJ, Tress BM, Loughnan P. Clinical course and medical management of neonates with severe cardiac failure related to vein of Galen

malformation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002;87(2):F144-149.

8. Lasjaunias P, Hui F, Zerah M, et al. Cerebral arteriovenous malformations in children. Management of 179 consecutive cases and review of the literature. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg.* 1995;11(2):66-79; discussion 79.

9. Kurihara N, Tokieda K, Ikeda K, et al. Prenatal MR findings in a case of aneurysm of the vein of Galen. *Pediatr Radiol.* 2001;31(3):160-162. doi:10.1007/s002470000389

10. Beucher G, Fossey C, Belloy F, Richter B, Herlicoviez M, Dreyfus M. Diagnostic anténatal et prise en charge d'un anévrisme de la veine de Galien. [/data/revues/03682315/00340006/613/](http://www.em-consulte.com/en/article/115430). September 2008. <http://www.em-consulte.com/en/article/115430>. Accessed May 8, 2018.

11. Pilu G, Falco P, Perolo A, et al. Differential diagnosis and outcome of fetal intracranial hypoechoic lesions: report of 21 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997;9(4):229-236. doi:10.1046/j.1469-0705.1997.09040229.x

12. Paladini D, Deloison B, Rossi A, et al. Vein of Galen Aneurysmal malformation (VGAM) in the fetus. A retrospective analysis of perinatal prognostic indicators in a two-center series of 49 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol.* August 2016:n/a-n/a. doi:10.1002/uog.17224

13. Paternoster DM, Manganelli F, Moroder W, Nicolini U. Prenatal diagnosis of vein of Galen aneurysmal malformations. *Fetal Diagn Ther.* 2003;18(6):408-411. doi:10.1159/000073133

14. Wagner MW, Vaught AJ, Poretti A, Blakemore KJ, Huisman TAGM. Vein of Galen aneurysmal malformation: prognostic markers depicted on fetal MRI. *Neuroradiol J*. 2015;28(1):72-75. doi:10.15274/NRJ-2014-10106
15. Saliou G, Vraka I, Teglas J-P, et al. Pseudofeeders on fetal magnetic resonance imaging predict outcome in vein of Galen malformations. *Ann Neurol*. 2017;81(2):278-286. doi:10.1002/ana.24873
16. Bouvaist H, Rossignol AM, Rocca C, Andrini P, Durand C, Bost M. [Aneurysm of the vein of Galen and cardiac insufficiency. Current therapeutic approach]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1998;91(5):637-643.
17. Lasjaunias PL, Chng SM, Sachet M, Alvarez H, Rodesch G, Garcia-Monaco R. The management of vein of Galen aneurysmal malformations. *Neurosurgery*. 2006;59(5 Suppl 3):S184-194; discussion S3-13. doi:10.1227/01.NEU.0000237445.39514.16
18. Khullar D, Andeejani AMI, Bulsara KR. Evolution of treatment options for vein of Galen malformations. *J Neurosurg Pediatr*. 2010;6(5):444-451. doi:10.3171/2010.8.PEDS10231
19. Eerola I, Boon LM, Mulliken JB, et al. Capillary Malformation–Arteriovenous Malformation, a New Clinical and Genetic Disorder Caused by RASA1 Mutations. *Am J Hum Genet*. 2003;73(6):1240-1249.
20. Revencu N, Boon LM, Mulliken JB, et al. Parkes Weber syndrome, vein of Galen aneurysmal malformation, and other fast-flow vascular anomalies are caused by RASA1 mutations. *Hum Mutat*. 2008;29(7):959-965. doi:10.1002/humu.20746

21. Revencu N, Boon LM, Mendola A, et al. RASA1 Mutations and Associated Phenotypes in 68 Families with Capillary Malformation–Arteriovenous Malformation. *Hum Mutat.* 2013;34(12):1632-1641. doi:10.1002/humu.22431
22. Trahey M, Wong G, Halenbeck R, et al. Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science.* 1988;242(4886):1697-1700.
23. Hsieh CL, Vogel US, Dixon RA, Francke U. Chromosome localization and cDNA sequence of murine and human genes for ras p21 GTPase activating protein (GAP). *Somat Cell Mol Genet.* 1989;15(6):579-590.
24. Henkemeyer M, Rossi DJ, Holmyard DP, et al. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature.* 1995;377(6551):695-701. doi:10.1038/377695a0
25. Eerola I, Boon LM, Watanabe S, Grynberg H, Mulliken JB, Vikkula M. Locus for susceptibility for familial capillary malformation ('port-wine stain') maps to 5q. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2002;10(6):375-380. doi:10.1038/sj.ejhg.5200817
26. Hershkovitz D, Bercovich D, Sprecher E, Lapidot M. RASA1 mutations may cause hereditary capillary malformations without arteriovenous malformations. *Br J Dermatol.* 2008;158(5):1035-1040. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08493.x
27. Heuchan A, Joss S, Berg J, Suri M, Bhattacharya J. G25 RASA1 Mutations and Vein of Galen Arterial Malformations. *Arch Dis Child.* 2013;98(Suppl 1):A16-A17. doi:10.1136/archdischild-2013-304107.038

28. Macmurdo CF, Wooderchak-Donahue W, Bayrak-Toydemir P, et al. RASA1 somatic mutation and variable expressivity in capillary malformation/arteriovenous malformation (CM/AVM) syndrome. *Am J Med Genet A*. 2016;170(6):1450-1454. doi:10.1002/ajmg.a.37613
29. Lapinski PE, Doosti A, Salato V, North P, Burrows PE, King PD. Somatic second hit mutation of RASA1 in vascular endothelial cells in capillary malformation-arteriovenous malformation. *Eur J Med Genet*. 2018;61(1):11-16. doi:10.1016/j.ejmg.2017.10.004
30. Pagenstecher A, Stahl S, Sure U, Felbor U. A two-hit mechanism causes cerebral cavernous malformations: complete inactivation of CCM1, CCM2 or CCM3 in affected endothelial cells. *Hum Mol Genet*. 2009;18(5):911-918. doi:10.1093/hmg/ddn420
31. McDonald J, Pyeritz RE. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*[®]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1351/>.
32. Maher CO, Piegras DG, Brown RD, Friedman JA, Pollock BE. Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke*. 2001;32(4):877-882.
33. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet Lond Engl*. 2004;363(9412):852-859. doi:10.1016/S0140-6736(04)15732-2

34. Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, et al. Vein of Galen aneurysmal malformation associated with an endoglin gene mutation. *Pediatrics*. 2011;128(5):e1307-1310. doi:10.1542/peds.2010-0961
35. Chida A, Shintani M, Wakamatsu H, et al. ACVRL1 gene variant in a patient with vein of Galen aneurysmal malformation. *J Pediatr Genet*. 2013;2(4):181-189. doi:10.3233/PGE-13067
36. Xu DS, Usman AA, Hurley MC, Eddleman CS, Bendok BR. Adult presentation of a familial-associated vein of galen aneurysmal malformation: case report. *Neurosurgery*. 2010;67(6):E1845-1851; discussion 1851. doi:10.1227/NEU.0b013e3181fa00d8
37. Komiyama M, Miyatake S, Terada A, Ishiguro T, Ichiba H, Matsumoto N. Vein of Galen Aneurysmal Malformation in Monozygotic Twin. *World Neurosurg*. 2016;91:672.e11-15. doi:10.1016/j.wneu.2016.04.031
38. Steggerda S, Lopriore E, Sueters M, Bartelings M, Vandenbussche F, Walther F. Twin-to-twin transfusion syndrome, vein of galen malformation, and transposition of the great arteries in a pair of monozygotic twins: coincidence or related association? *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc*. 2006;9(1):52-55. doi:10.2350/06-05-0060.1
39. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010;26(5):589-595. doi:10.1093/bioinformatics/btp698
40. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25(16):2078-2079.

doi:10.1093/bioinformatics/btp352

41. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164. doi:10.1093/nar/gkq603
42. Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe W, Kondrashov AS, Bork P. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet.* 2001;10(6):591-597.
43. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001;11(5):863-874. doi:10.1101/gr.176601
44. Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The Vascular Anatomy of the Developing Zebrafish: An Atlas of Embryonic and Early Larval Development. *Dev Biol.* 2001;230(2):278-301. doi:10.1006/dbio.2000.9995
45. Wilkinson RN, van Eeden FJM. The zebrafish as a model of vascular development and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;124:93-122. doi:10.1016/B978-0-12-386930-2.00005-7
46. Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol.* 2002;248(2):307-318.
47. Aurboonyawat T, Suthipongchai S, Pereira V, Ozanne A, Lasjaunias P. Patterns of cranial venous system from the comparative anatomy in vertebrates. Part I, introduction and the dorsal venous system. *Interv Neuroradiol J Peritherapeutic Neuroradiol Surg Proced Relat Neurosci.* 2007;13(4):335-344. doi:10.1177/159101990701300404
48. Westerfield M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*

(*Danio Rerio*). University of Oregon Press.; 1995.

49. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat Genet.* 2000;26(2):216-220. doi:10.1038/79951
50. Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouzé P, Brunak S. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(17):3439-3452.
51. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):e67. doi:10.1093/nar/gkp215
52. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol.* 1991;220(1):49-65.
53. Kania A, Klein R. Mechanisms of ephrin–Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(4):240. doi:10.1038/nrm.2015.16
54. Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, et al. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron.* 1996;17(1):9-19.
55. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, et al. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D662-669. doi:10.1093/nar/gku1010
56. Himanen J-P, Chumley MJ, Lackmann M, et al. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci.* 2004;7(5):501-509. doi:10.1038/nn1237

57. Triplett JW. Molecular guidance of retinotopic map development in the midbrain. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;24(1):7-12. doi:10.1016/j.conb.2013.07.006
58. Qiu R, Wang X, Davy A, et al. Regulation of neural progenitor cell state by ephrin-B. *J Cell Biol.* 2008;181(6):973-983. doi:10.1083/jcb.200708091
59. North HA, Zhao X, Kolk SM, Clifford MA, Ziskind DM, Donoghue MJ. Promotion of proliferation in the developing cerebral cortex by EphA4 forward signaling. *Dev Camb Engl.* 2009;136(14):2467-2476. doi:10.1242/dev.034405
60. Feng G, Laskowski MB, Feldheim DA, et al. Roles for ephrins in positionally selective synaptogenesis between motor neurons and muscle fibers. *Neuron.* 2000;25(2):295-306.
61. Cooke JE, Kemp HA, Moens CB. EphA4 is required for cell adhesion and rhombomere-boundary formation in the zebrafish. *Curr Biol CB.* 2005;15(6):536-542. doi:10.1016/j.cub.2005.02.019
62. Xu Q, Mellitzer G, Robinson V, Wilkinson DG. In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature.* 1999;399(6733):267-271. doi:10.1038/20452
63. Xu N-J, Henkemeyer M. Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nat Neurosci.* 2009;12(3):268-276. doi:10.1038/nn.2254
64. Kawasaki J, Aegerter S, Fevurly RD, et al. RASA1 functions in EPHB4 signaling pathway to suppress endothelial mTORC1 activity. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2774-2784.

doi:10.1172/JCI67084

65. Holland SJ, Gale NW, Gish GD, et al. Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *EMBO J.* 1997;16(13):3877-3888. doi:10.1093/emboj/16.13.3877
66. Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell.* 2008;133(1):38-52. doi:10.1016/j.cell.2008.03.011
67. Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature.* 1999;400(6739):77-81. doi:10.1038/21907
68. Adams RH, Diella F, Hennig S, Helmbacher F, Deutsch U, Klein R. The Cytoplasmic Domain of the Ligand EphrinB2 Is Required for Vascular Morphogenesis but Not Cranial Neural Crest Migration. *Cell.* 2001;104(1):57-69. doi:10.1016/S0092-8674(01)00191-X
69. Gerety SS, Wang HU, Chen Z-F, Anderson DJ. Symmetrical Mutant Phenotypes of the Receptor EphB4 and Its Specific Transmembrane Ligand ephrin-B2 in Cardiovascular Development. *Mol Cell.* 1999;4(3):403-414. doi:10.1016/S1097-2765(00)80342-1
70. Bennett BD, Zeigler FC, Gu Q, et al. Molecular cloning of a ligand for the EPH-related receptor protein-tyrosine kinase Htk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(6):1866-1870.
71. Bergemann AD, Cheng HJ, Brambilla R, Klein R, Flanagan JG. ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. *Mol Cell Biol.* 1995;15(9):4921-4929.

72. Andres AC, Reid HH, Zürcher G, Blaschke RJ, Albrecht D, Ziemiecki A. Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. *Oncogene*. 1994;9(5):1461-1467.
73. Wang HU, Chen Z-F, Anderson DJ. Molecular Distinction and Angiogenic Interaction between Embryonic Arteries and Veins Revealed by ephrin-B2 and Its Receptor Eph-B4. *Cell*. 1998;93(5):741-753. doi:10.1016/S0092-8674(00)81436-1
74. Herbert SP, Huisken J, Kim TN, et al. Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science*. 2009;326(5950):294-298. doi:10.1126/science.1178577
75. Lindskog H, Kim YH, Jelin EB, et al. Molecular identification of venous progenitors in the dorsal aorta reveals an aortic origin for the cardinal vein in mammals. *Dev Camb Engl*. 2014;141(5):1120-1128. doi:10.1242/dev.101808
76. Amyere M, Revencu N, Helaers R, et al. Germline Loss-of-Function Mutations in EPHB4 Cause a Second Form of Capillary Malformation-Arteriovenous Malformation (CM-AVM2) Deregulating RAS-MAPK Signaling. *Circulation*. 2017;136(11):1037-1048. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026886
77. Nikolaev SI, Vetiska S, Bonilla X, et al. Somatic Activating KRAS Mutations in Arteriovenous Malformations of the Brain. *N Engl J Med*. 2018;378(3):250-261. doi:10.1056/NEJMoa1709449
78. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res*. 2000;10(9):1351-1358.

79. McKinney MC, Weinstein BM. Chapter 4. Using the zebrafish to study vessel formation. *Methods Enzymol.* 2008;444:65-97. doi:10.1016/S0076-6879(08)02804-8
80. Walcott BP, Peterson RT. Zebrafish models of cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(4):571-577. doi:10.1038/jcbfm.2014.27
81. Ulrich F, Ma L-H, Baker RG, Torres-Vázquez J. Neurovascular development in the embryonic zebrafish hindbrain. *Dev Biol.* 2011;357(1):134-151. doi:10.1016/j.ydbio.2011.06.037
82. Donnini S, Solito R, Cetti E, et al. Abeta peptides accelerate the senescence of endothelial cells in vitro and in vivo, impairing angiogenesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2010;24(7):2385-2395. doi:10.1096/fj.09-146456
83. Corti P, Young S, Chen C-Y, et al. Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations. *Dev Camb Engl.* 2011;138(8):1573-1582. doi:10.1242/dev.060467
84. Roman BL, Pham VN, Lawson ND, et al. Disruption of acvrl1 increases endothelial cell number in zebrafish cranial vessels. *Dev Camb Engl.* 2002;129(12):3009-3019.
85. Zheng X, Xu C, Di Lorenzo A, et al. CCM3 signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations. *J Clin Invest.* 2010;120(8):2795-2804. doi:10.1172/JCI39679
86. Liu W, Morito D, Takashima S, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One.* 2011;6(7):e22542. doi:10.1371/journal.pone.0022542

87. Yu X, Li YV. Zebrafish as an alternative model for hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2011;3(2):88-96.
88. Li D, Wenger TL, Seiler C, et al. Pathogenic variant in EPHB4 results in central conducting lymphatic anomaly. *Hum Mol Genet*. June 2018. doi:10.1093/hmg/ddy218
89. Martin-Almedina S, Martinez-Corral I, Holdhus R, et al. EPHB4 kinase-inactivating mutations cause autosomal dominant lymphatic-related hydrops fetalis. *J Clin Invest*. 2016;126(8):3080-3088. doi:10.1172/JCI85794

Partie VII

Annexes

Annexe A :

Vivanti A., Ozanne A., Grondin C., Saliou G., Quevarec L., Maurey H., Aubourg P., Benachi A., Gut M., Gut I., Martinovic L., Senat M.V., Tawk M., Melki J. Loss of function mutations in *EPHB4* are responsible for vein of Galen aneurysmal malformation. *Brain*. 2018;141:979–988.

Article de Thèse

Annexe B :

Maluenda J., Manso C., Quevarec L., **Vivanti A.**, Marguet F., Gonzales M., Guimiot F., Petit F., Toutain A., Whalen S., Grigorescu R., Coeslier A.D, Gut M., Gut I., Laquerriere A., Devaux J., Melki J. Mutations in *GLDN*, encoding gliomedin, a critical component of the nodes of Ranvier, are responsible for lethal arthrogryposis. *Am. J. Hum. Genet.* 2016;99:928–933.

Participation aux travaux de recherche de l'équipe dans le cadre de l'apprentissage des techniques de production et d'analyse du séquençage haut débit de l'exome entier.

**Loss of function mutations in *EPHB4*
are responsible for vein of Galen aneurysmal malformation**

Authors:

Alexandre Vivanti,¹ Augustin Ozanne,² Cynthia Grondin,¹ Guillaume Saliou,³ Loic Quevarec,¹ Hélène Maurey,⁴ Patrick Aubourg,⁴ Alexandra Benachi,⁵ Marta Gut,^{6,7} Ivo Gut,^{6,7} Jelena Martinovic,⁸ Marie Victoire Sénat,⁹ Marcel Tawk^{10*} and Judith Melki^{1*}

Affiliations:

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR-1169 and University Paris Sud, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France; ²Department of Neuroradiology, National Reference Center for Paediatric Neurovascular Malformation, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, 94276, France; ³Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne University Hospital, Lausanne, CH-1011, Suisse; ⁴Department of Paediatric Neurology, Hôpital Bicêtre, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, 94276, France; ⁵Department of Obstetrics and Gynecology, Hôpital Antoine-Béclère, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, 92140, Clamart, France; ⁶CNAG-CRG, Centre for Genomic Regulation, Barcelona Institute of Science and Technology, 08028, Barcelona, Spain; ⁷Universitat Pompeu Fabra, 08002, Barcelona, Spain; ⁸Unit of Fetal Pathology, Hôpital Antoine-Béclère, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, 92140, Clamart, France; ⁹Department of Obstetrics and Gynecology, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, 94276, France; ¹⁰INSERM UMR-1195, University Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, 94276, France.

*** Co-Corresponding authors:**

Judith Melki

UMR-1169, Inserm, University Paris Sud,
80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.
Email: judith.melki@inserm.fr
Tel: 33 01 49595370

Marcel Tawk

INSERM UMR-1195, University Paris Sud,
80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.
Email: marcel.tawk@inserm.fr
Tel: 33 01 49591893

Running title: Loss of function *EPHB4* mutations in VGAM

Abstract

Vein of Galen aneurysmal malformation (VGAM) is a congenital anomaly of the cerebral vasculature representing 30% of all pediatric vascular malformations. VGAM is largely sporadic. We conducted whole exome sequencing in 19 unrelated VGAM patients and subsequently screened candidate gene in a cohort of 32 additional patients using either targeted exome or Sanger sequencing. In a cohort of 51 VGAM patients, we found 5 affected individuals with heterozygous mutations in *EPHB4* including *de novo* frameshift (p.His191Alafs*32) or inherited deleterious splice or missense mutations predicted to be pathogenic by *in silico* tools. Knockdown of *EPHB4* in zebrafish embryos leads to specific anomalies of dorsal cranial vessels including dorsal longitudinal vein, the ortholog of the median prosencephalic vein, the embryonic precursor of the vein of Galen. This model allowed to demonstrate *EPHB4* loss of function mutations in VGAM by the ability to rescue the brain vascular defect in knockdown zebrafish co-injected with wild type but not truncated *EPHB4* mimicking the p.His191Alafs mutation. Our data showed that in both species, loss of function mutations of *EPHB4* result in specific and similar brain vascular development anomalies. Recently, *EPHB4* germline mutations have been reported in non-immune hydrops fetalis and in cutaneous capillary malformation–arteriovenous malformation. Here, we show that *EPHB4* mutations are also responsible for VGAM indicating that heterozygous germline mutations of *EPHB4* result in a large clinical spectrum. The identification of *EPHB4* pathogenic mutation in patients presenting capillary malformation or VGAM should lead to careful follow up of pregnancy of carriers for early detection of VGAM in order to propose optimal neonatal care. Endovascular embolization indeed greatly improved the prognosis of VGAM patients.

Key Words: vein of Galen aneurysmal malformation; arteriovenous malformation; exome sequencing; *EPHB4* mutation; zebrafish.

Introduction

VGAMs are characterized by brain arteriovenous shunt, supplied by a variety of choroidal arterial feeding vessels that drain into the aberrantly persistent median prosencephalic vein, an embryonic precursor of the vein of Galen, and associated with abnormal deep venous drainage.^{1,2} This condition can be diagnosed during the prenatal stage with intrauterine ultrasound and MRI. Prenatal diagnosis is usually made during the third trimester, with color Doppler ultrasonography. Fetal MRI is important to confirm VGAM, to detect associated brain abnormalities and to rule out differential diagnoses. The outcome is particularly poor when anomalies such as cerebral defects or signs of cardiac dysfunction are associated. VGAM can cause congestive heart failure and pulmonary hypertension in neonates, macrocrania, ventriculomegaly, seizures, mental retardation, hemorrhage or venous ischemia. Endovascular embolization is the treatment of choice and greatly improved the prognosis.^{5,6}

VGAM is largely sporadic, affecting either males or females. Several cases of cerebral arteriovenous shunts (AVS) are known to be hereditary. Some are recognized as hemorrhagic hereditary telangiectasia or Osler–Weber–Rendu syndrome, a heterogeneous genetic autosomal dominant disorder associated with cerebral AVS and particularly with arteriovenous fistulae and caused by mutation of *ENG* (MIM: 187300), *GDF2* (MIM: 615506) or *ACVRL1* (MIM: 600376). Affected individuals with neurofibromatosis type 1 caused by mutations in *NF1* (MIM: 162200) can also show arteriovenous fistulae after rupture of weak vessel walls. Among 140 affected individuals with the association capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM1, MIM: 608354), germline mutations in *RASA1* were identified in 2 individuals suffering from CM associated with VGAM.⁷ The protein encoded by *RASA1*, p120RasGAP, is an inhibitor of RAS p21. Its critical role in vascular development has been established by the phenotype observed in *Rasa1* knockout mice.⁸

In order to gain further insight into the underlying cause of VGAM, we took advantage of the added value of whole and targeted exome sequencing to study a cohort of 51 unrelated affected individuals with VGAM.

Materials and Methods

Participants and study design

Fifty-one unrelated affected individuals with VGAM were included from 2015 through the National Reference Center for Paediatric Neurovascular Malformation of Bicêtre University Hospital. VGAM diagnosis was established through digital subtracted angiography. Detailed neuroimaging features of the patients are presented in the ‘Results’ section.

The parents of all affected individuals provided written informed consents for genetic analysis of their children or fetuses and themselves in accordance with the ethical standards of our institutional review boards.

Procedures

Whole exome sequencing

Genomic DNA for each individual was extracted from blood or frozen tissue with the use of a QiaAmp DNA midi or mini Kit respectively (Qiagen). Whole exome sequencing (WES) was performed in 19 index cases using the Exome Capture Agilent SureSelect XT V5 kit for library preparation and exome enrichment as previously described.¹² Sequencing was performed on a Genome Analyzer IIX Illumina instrument in paired-end mode with a

read length of 2x100bp. The median coverage of the WES was 67. Reads were aligned to the human reference genome sequence (UCSC hg19, NCBI build 37.3) via the BWA program.¹³ Variants were selected using the SAMtools¹⁴ then annotated using Annovar softwares.¹⁵ Variants in coding regions (including non-synonymous and nonsense mutations), intron-exon junctions or short coding insertions or deletions were selected when the minor allele frequency (MAF) was less than 0.003. Non-synonymous mutations were selected when the prediction of pathogenicity gave a score ≥ 0.5 using the Polyphen-2¹⁶ or ≤ 0.05 with Sift softwares.¹⁷

Predicted deleterious variants in genes shared by two or more affected individuals were selected as candidates. After variant selection of the best candidate, the coding regions of *EPHB4* were sequenced in a cohort of 32 additional unrelated affected individuals.

Targeted exome sequencing

Targeted exome sequencing of *EPHB4* was performed using the Agilent SureSelectXT Custom kit for library preparation and exome enrichment. Sequencing was performed on an Illumina MiSeq System using paired-end 150bp reads and following Illumina's protocol using the MiSeq Reagent Micro Kit, v2. The average of the median coverage was 490. Variants were selected using the same filters as those used for WES data.

Sanger sequencing

All variants identified through whole or targeted exome sequencing were further validated by Sanger sequencing. PCR primer pairs were designed from genomic DNA to amplify and sequence each *EPHB4* exon (**supplementary Table 1**). PCR amplification was carried out as previously described.¹² PCR products were then purified then sequenced using the forward or reverse primers (Eurofins Genomics). The obtained DNA sequences were compared with published sequences (BLAST, NCBI). Sanger sequencing was also performed to establish the genotype of each family member and to analyze the segregation of the variant within each family.

Reverse Transcription-PCR Amplification

Total RNAs were extracted from lymphoblastoid cell lines by using TRI Reagent LS method (Sigma). Four μg RNA was used to synthesize cDNA by using random primers following the manufacturer's manual (SuperScript III reverse Transcriptase, Invitrogen) in a final volume of 20 μL . PCR amplification was carried out as previously described.¹² RT-PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and labelled with ethidium bromide. To determine the effect of mutations closed to intron-exon junctions, PCR amplification analysis from single strand cDNA was performed using primers flanking exons of *EPHB4* (**supplementary Table 1**). As internal control for PCR amplification, β -Actin cDNA was coamplified (**supplementary Table 1**). Sanger sequencing was performed from the RT-PCR products.

Zebrafish studies

Embryo care: Embryos were cared for according to standard protocols.¹⁸

The transgenic line (Tg[fli1:EGFP]y1:Tg[gata:dsRed]) allowed *in vivo* simultaneous imaging of blood vessel architecture by visualizing endothelial cells (fli1:EGFP) and erythrocytes (gata1:dsRed) in the same animal during embryonic vascular development and was used for the knockdown experiments.^{19,20} Embryos were collected by natural spawning, and raised in fish water with methylene blue at 28.5°C.

Knockdown of *EPHB4* in transgenic zebrafish using antisense morpholino oligonucleotide (MO): Antisense morpholino oligonucleotides *ephb4a* (splice, *ephb4a*-MO) and 5mis-*ephb4a* (splice, *ephb4a*-MisMO) were purchased from Gene Tools LLC as previously described by Kawasaki et al. 2014, **supplementary Table 1**).²¹ 0.4 pmoles of MO was injected into 1–4 cell stage embryos using picospritzer injector.²² Knockdown efficiency for *ephb4a*-MO was previously reported by Kawasaki et al. (2014).²¹

Ephb4 mRNA synthesis and microinjection: Human *EPHB4* cDNA (GenBank: BC052804.1), corresponding to full length *EPHB4* mRNA (NM_004444.4) was purchased

from Source BioScience, linearized and capped RNAs were *in vitro* transcribed using the mMessage mMachine Kit (Ambion Inc.) following the manufacturer's instructions. A truncated form of cDNA was generated from BC052804.1 and cloned to express a truncated protein retaining the first 269 amino acids mimicking the frameshift deletion observed in affected individuals AA5614. *In vivo* transcription was performed as described above. 60 pg of each mRNA were co-injected with *ephb4a*-MO.

Zebrafish phenotype scoring: Two types of assays to score distinct vascular phenotypes of the dorsal cranial vessels were used at 3 days post fertilization (dpf). To evaluate dorsal longitudinal vein (DLV) anatomy, the phenotype was categorized into either normal (a single vein indistinguishable from WT controls) or abnormal (duplicated or triplicated vein). We also evaluated the mesencephalic vein (MsV) anatomy: the two MsV can be seen projecting rostrally from the DLV and then diving ventrally in two branches in WT controls. The morphological aspect of paired MsV was evaluated as either normal or abnormal (absent or interrupted in one or both MsV). Scoring for normal or abnormal embryos for either DLV or MsV in WT, *ephb4a*-MO, *ephb4a*-misMO, embryos co-injected with *ephb4a*-MO with full length or truncated EPHB4 mRNA was undertaken. This quantification was carried out blindly by two examiners. All assays were performed using transgenic embryos with endothelial cells labeled in green. A 2-tailed Student's t test was used for all statistical analyses. In each case, the P value is provided.

Confocal image analysis: Image acquisition was performed using a Leica SP8 confocal microscope. Image analysis was performed offline using ImageJ.

Results

Neuroimaging features of VGAM patients

Digital subtracted angiography established VGAM diagnosis based on the following criteria: arterial choroidal feeders of the arteriovenous shunt, aneurysmal dilatation of the so called vein of Galen (actually its precursor, the median vein of the prosencephalon) and deep venous drainage (such as internal cerebral veins) not connected to the vein of Galen but to venous alternative pathways such as lateral mesencephalic, sub temporal veins or lateral sinus (**Fig. 1**).^{1,11} Other disease entities such as vein of Galen dilatations characterized by arteriovenous malformations draining into a dilated mature vein of Galen which is connected to the internal cerebral veins, dural arteriovenous shunts draining into a dilated mature vein of Galen, or vein of Galen varix characterized by a dilated vein of Galen without arteriovenous shunt were not included.

Identification of *EPHB4* heterozygous mutations in VGAM

Whole exome sequencing was performed in 19 unrelated affected individuals with VGAM. Predicted deleterious variants in genes shared by two or more affected individuals were selected as candidates. Under the hypothesis of autosomal recessive inheritance, no candidate variants were identified. Under the hypothesis of autosomal dominant inheritance, three affected individuals were carrying deleterious mutations in *EPHB4*. In affected individual AA5614, a heterozygous 1bp duplication in *EPHB4* (Genbank: NM_004444.4, c.570dupG) leading to frameshift and premature stop codon (p.His191Alafs*32, **Fig. 2**) was identified. Sanger sequencing of PCR products using primers flanking the mutation (**supplementary Table 1**) confirmed the mutation in the affected individual (**Fig. 2**). Analysis of both parents showed that the mutation had occurred *de novo* (**supplementary Fig. 1**). This variant was not annotated in the 1000 Genomes or ExAC Browser databases.

In two unrelated affected individuals, heterozygous *EPHB4* mutations were located in intron 14 very close to the junction with exon 14. In the affected individual AA5615, the mutation was located at the first nucleotide of intron 14 (c.2484+1G>T, **Fig. 2**), suggesting

a potential impact on splicing. This variant was not annotated in the 1000 Genomes or ExAC Browser databases. Analysis of both parents showed that the mutation was inherited from the mother (**supplementary Fig. 1**). In the affected individual, VGAM was associated with cutaneous capillary malformation (data not shown). Clinical examination of the healthy mother, revealed similar cutaneous malformation of the skin (data not shown) without any clinical history of neurological defect. RT-PCR product of *EPHB4* cDNA from lymphoblastoid cells RNA of the affected individual and his mother compared to control revealed, in addition to the wildtype, an abnormal RT-PCR product (**Fig. 2**). Sequencing of the RT-PCR products revealed that the smaller PCR product corresponded to truncated transcript leading to the lack of amino acids 814 to 829 (p.Met814_Val829del) establishing the deleterious effect of the c.2484+1G>T mutation (**Fig. 2**). In the affected individual AA5616, a splice mutation similar to the previous one was identified (c.2484+2insT, **Fig. 2**). This mutation was inherited from the healthy father (**supplementary Fig. 1**). Clinical examination of the father was not available as well as cell lines for RNA analysis. This variant was not annotated in the 1000 Genomes or ExAC Browser databases. No germline mutation was identified in *RASA1*, *ENG*, *ACVRL1*, *GDF2* or *NF1* in our cohort of 19 affected individuals.

EPHB4 was therefore selected as high candidate for the disease-causing gene. Targeted exome sequencing or Sanger sequencing of the coding regions of *EPHB4* were performed on the DNA sample of a cohort of 32 additional unrelated affected individuals with VGAM. This approach further revealed two unrelated affected individuals (AA5717 and AA5718) carrying distinct heterozygous missense mutation in *EPHB4* (**Fig. 2**). These mutations (c.2609T>A: p.Val870Glu and c.319T>C: p.Cys107Arg) were not annotated in the 1000 Genomes or ExAC Browser databases and are predicted to be pathogenic with a high score (PolyPhen-2 score of 1 for both mutations). These heterozygous mutations were inherited from healthy mothers (**supplementary Fig. 1**). No neurological defect was reported in the mothers.

The main clinical and genetic features of the 5 patients carrying *EPHB4* heterozygous mutations are summarized in **Table 1**.

Knockdown of *EPHB4* in transgenic zebrafish embryos leads to marked anomalies of dorsal cranial vessels

Antisense morpholino (*ephb4a*-MO) oligonucleotides and their corresponding “mismatch” controls (*ephb4a*-MisMO) were designed to specifically knockdown the *EPHB4* ortholog (*ephb4a*) in transgenic zebrafish (Tg[fli1:EGFP]y1:Tg[gata1:dsRed]). The embryos were analyzed at 3 dpf when vascular morphogenesis is well established. Transgenic embryos injected with *ephb4a*-MisMO were indistinguishable from non-injected control embryos (WT) (n=29; **Fig. 3**). In contrast, by looking at different brain layers, transgenic zebrafish embryos injected with *ephb4a*-MO exhibited marked vascular anomalies of the dorsal cranial vessels including both DLV and MsV by 3 dpf (**Fig. 3 and 4**). Abnormal number of DLV (duplicated or triplicated vein) was observed in 82% of *ephb4a*-MO embryos (14 out of 17 embryos) when compared to 0% in either WT (n=21) or *ephb4a*-MisMO (n=8, P<0.0001, **Fig. 3 and 4**). Similarly, abnormal morphology of MsV (absent or interrupted in both or one MsV) was observed in 76% of *ephb4a*-MO (13 out of 17 embryos) when compared to 0% in either WT (n=21) or *ephb4a*-MisMO (n=8, P<0.0001, **Fig. 3 and 4**). Interestingly, the upper and lower middle layers of cranial vessels did not exhibit abnormal vascular pattern (**supplementary Fig. 2**) indicating that the anomalies were restricted to specific vessels of the brain. To determine whether the *ephb4a*-MO abnormal phenotype of dorsal cranial vessels was specific to *ephb4a* knockdown, we co-injected *ephb4a*-MO with full length human *EPHB4* mRNA (WT-mRNA). The percentage of vascular anomalies was significantly reduced for both MsV (only 1 out of 13 embryos showed anomaly, 8%,

$P < 0.0001$) and DLV (only 3 out of 13 embryos showed anomaly, 23%, $P = 0.0005$) in embryos co-injected with both *ephb4a*-MO and WT-mRNA compared with those injected with *ephb4a*-MO only (Fig. 3 and 4). In contrast, co-injection of *ephb4a*-MO with mut-mRNA, mimicking the mutation of the affected individual AA5614, did not result in statistically significant difference with *ephb4a*-MO injected embryos for both MsV (15 out of 20 showed anomalies, 75%, $P = 0.66$) and DLV (16 out of 20 showed anomalies, 80%, $P = 0.86$, Fig. 3 and 4). These data indicate first that knockdown of *ephb4a* was specific. In addition, these results strongly suggest that the *EPHB4* mutation found in affected individual AA5614 (c.570dupG) leads to a loss of function since the *EPHB4* WT-mRNA but not mut-mRNA is able to markedly improve the vascular phenotype of *ephb4a*-MO zebrafish. These data demonstrate that *EPHB4* plays an essential role in the development of specific brain vessels.

Discussion

We report herein the identification of germline loss of function *EPHB4* mutations in VGAM. In a cohort of 51 affected unrelated individuals with VGAM, we found 5 affected individuals with heterozygous mutations in *EPHB4* including *de novo* frameshift or inherited deleterious splice or predicted pathogenic missense mutations which strongly suggest that *EPHB4* mutations are responsible for VGAM. Mutations occurred in various domains of *EPHB4* (Fig. 2). No germline mutation of *RASA1* was found in our cohort.

In recent years, the zebrafish has emerged as an important vertebrate model system for studying vascular development. The molecular mechanisms underlying vessel formation in zebrafish and its anatomical vascular architecture are highly similar to those in higher vertebrates.²⁵ As a model system, the zebrafish offers unique advantages for studying vascular development *in vivo*.^{26,27} Although knockdown of *ephb4a*, the *EPHB4* ortholog, was already performed in zebrafish,²¹ previous study has only analyzed spinal cord vascular development but not the one in the brain. Here, we show a critical role of *ephb4a* in the development of specific veins in the brain by the observation of marked venous anomalies of the dorsal cranial vessels including both DLV and MsV in *ephb4a*-MO zebrafish larvae. Our data showed that *EPHB4* has a critical role in brain vascular development in both zebrafish and human. This model allowed us to demonstrate that *EPHB4* loss of function is responsible for VGAM since we were able to rescue the vascular brain defect of *ephb4a*-MO zebrafish by overexpressing a human wild type form of *EPHB4* but not truncated *EPHB4* mimicking the frameshift mutation found in patient AA5614. In addition, our data strongly suggest that loss of function mutations in *EPHB4* result in specific brain vascular development anomalies in both species. Interestingly, comparative anatomy in vertebrates suggested that DLV is the ortholog of the median prosencephalic vein of Markowski,²⁹ which is aberrantly persistent in VGAM and shows abnormal morphology in *ephb4a*-MO zebrafish.

Among the Ephrin family, the *EPHB4* receptor plays a unique role in vascular development, where it regulates venous differentiation.^{23,24} EphB4 is highly enriched in veins, and is the only EphB receptor that specifically binds to ephrinB2.²⁸ During early stages of vertebrate embryogenesis, coordinated sorting and segregation of arterial/venous-fated angioblasts into distinct networks of arteries and veins is essential to establish a functional vasculature. The ligand EphrinB2 and its receptor EphB4, that are expressed in arterial and venous progenitors respectively, interact to establish a directional progenitor migration. Here, we provide evidence for a critical role of *EPHB4* in embryo/fetal development of specific brain vessels in human.

Recently, mutations of *EPHB4* have been reported in two distinct clinical disease entities. In two unrelated families with autosomal dominant lymphatic-related hydrops fetalis with atrial septal defect (MIM: 617300), Martin-Almedina *et al.* (2016) reported heterozygous missense variants in *EPHB4*.⁹ Among capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM2), inherited heterozygous mutations in *EPHB4* have been reported in 54 families with cutaneous capillary malformation either isolated (63%) or associated with AVM (35%).¹⁰ Among them, CM was associated with VGAM in a single family. These results revealed that heterozygous germline mutations of *EPHB4* result in a large clinical spectrum ranging from non-immune hydrops fetalis, capillary malformation without neurological expression to VGAM. In addition, the clinical penetrance of the disease mutation is incomplete within the same family as shown for family AA5615 in whom the affected child is suffering from VGAM with cutaneous capillary malformation while the carrier mother had cutaneous capillary malformation without neurological defect. These data strongly suggest a role of other genes linked or not to the *EPHB4* locus in the clinical expression of disease phenotype.

In summary, we show herein that 10% of VGAM are associated with deleterious heterozygous mutations of *EPHB4*. Search for intragenic mutations of *EPHB4* should be proposed in affected individuals with VGAM. It should be also proposed in affected individuals with cutaneous capillary malformation only. The identification of *EPHB4* pathogenic mutation should provide better information of families on the autosomal dominant mode of inheritance of the trait, the large clinical spectrum, and the need for careful follow up of pregnancy of *EPHB4* mutation carriers for early detection of VGAM in order to propose optimal care through endovascular embolization which greatly improved the prognosis of VGAM patients.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Ferechte Encha-Razavi and Aya Mikdache for their helpful assistance.

Sources of Funding

This work was supported by a grant from the Agence de Biomedecine (2015) and Inserm to J.M. A.V. is a recipient of an Inserm Ph.D. scholarship.

Disclosures

None

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

dbSNP150, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

1000 Genomes, <http://www.1000genomes.org/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/>

ExAC, <http://exac.broadinstitute.org/>

ANNOVAR, <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>

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

Sift, <http://sift.jcvi.org/>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Material include two figures and one table and can be found with this article online.

REFERENCES

1. Raybaud CA, Strother CM, Hald JK. Aneurysms of the vein of Galen: embryonic considerations and anatomical features relating to the pathogenesis of the malformation. *Neuroradiology*. 1989;31:109-128.
2. Alvarez H, Garcia-Monaco R, Rodesch G, Sachet M, Krings T, Lasjaunias P. Vein of Galen aneurysmal malformations. *Neuroimaging Clin. N. Am.* 2007;17:189-206.
3. Ozanne A, Alvarez H, Krings T, Lasjaunias P. Pediatric neurovascular malformations: vein of Galen arteriovenous malformations (VGAM), pial arteriovenous malformations (pial AVM), dural sinus malformations (DSM). *J. Neuroradiol.* 2007;3:145-166.
4. Mortazavi MM, Griessenauer CJ, Foreman P, Bavarsad Shahripour R, Shoja MM, Rozzelle CJ, Tubbs RS, Fisher WS 3rd, Fukushima T. Vein of Galen aneurysmal malformations: critical analysis of the literature with proposal of a new classification system. *J. Neurosurg. Pediatr.* 2013;12:293-306.
5. Lasjaunias PL, Chng SM, Sachet M, Alvarez H, Rodesch G, Garcia-Monaco R. The management of vein of Galen aneurysmal malformations. *Neurosurgery*. 2006;59:S184-194.(a)
6. Recinos PF, Rahmathulla G, Pearl M, Recinos VR, Jallo GI, Gailloud P, Ahn ES. Vein of Galen malformations: epidemiology, clinical presentations, management. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2012;23:165-177.
7. Revencu N, Boon LM, Mulliken JB, Enjolras O, Cordisco MR, Burrows PE, Clapuyt P, Hammer F, Dubois J, Baselga E, Brancati F, Carder R, Quintal JM, Dallapiccola B, Fischer G, Frieden IJ, Garzon M, Harper J, Johnson-Patel J, Labrèze C, Martorell L, Paltiel HJ, Pohl A, Prendiville J, Quere I, Siegel DH, Valente EM, Van Hagen A, Van Hest L, Vaux KK, Vicente A, Weibel L, Chitayat D, Vikkula M. Parkes Weber syndrome, vein of Galen aneurysmal malformation, and other fast-flow vascular anomalies are caused by RASA1 mutations. *Hum. Mutat.* 2008;29:959-965.
8. Henkemeyer M, Rossi DJ, Holmyard DP, Puri MC, Mbamalu G, Harpal K, Shih TS, Jacks T, Pawson T. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature*. 1995;377:695-701.
9. Martin-Almedina S, Martinez-Corral I, Holdhus R, Vicente A, Fotiou E, Lin S, Petersen K, Simpson MA, Hoischen A, Gilissen C, Jeffery H, Atton G, Karapouliou C, Brice G, Gordon K, Wiseman JW, Wedin M, Rockson SG, Jeffery S, Mortimer PS, Snyder MP, Berland S, Mansour S, Makinen T, Ostergaard P. EPHB4 kinase-inactivating mutations cause autosomal dominant lymphatic-related hydrops fetalis. *J. Clin. Invest.* 2016;126:3080-3088.
10. Amyere M, Revencu N, Helaers R, Pairet E, Baselga E, Cordisco MR, Chung WK, Dubois J, Lacour JP, Martorell L, Mazereeuw-Hautier J, Pyeritz RE, Amor DJ, Bisdorff A, Blei F, Bombei H, Domp Martin A, Brooks DG, Dupont J, González-Enseñat MA, Frieden IJ, Gérard M, Kvarnung M, Hanson-Kahn AK, Hudgins L, Léauté-Labrèze C, McCuaig C, Metry D, Parent P, Paul C, Petit F, Phan A, Quéré I, Salhi A, Turner AM, Vabres P, Vicente A, Wargon O, Watanabe S, Weibel L, Wilson A, Willing M, Mulliken JB, Boon LM, Vikkula M. Germline Loss-of-Function Mutations in EPHB4 Cause a Second Form of Capillary Malformation-Arteriovenous Malformation (CM-AVM2) Deregulating RAS-MAPK Signaling. *Circulation*. 2017; In press (Jul 7).
11. Lasjaunias P, Brugge KG ter., Berenstein A. Clinical and Interventional Aspects in Children. In *Surgical neuroangiography, Springer Ed.* 2006;3:105-226. (b)
12. Zhou J, Tawk M, Tiziano FD, Veillet J, Bayes M, Nolent F, Garcia V, Servidei S, Bertini E, Castro-Giner F, Renda Y, Carpentier S, Andrieu-Abadie N, Gut I, Levade T, Topaloglu H, Melki J. Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in ASAH1. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;91:5-14.
13. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler

- transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754-1760 (a).
14. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2078-2079 (b).
 15. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e164.
 16. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 2010;7:248-249.
 17. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 2009;4:1073-1081.
 18. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene, OR, *University of Oregon Press.* 1995
 19. Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* 2002;248:307-318.
 20. Traver D, Paw BH, Poss KD, Penberthy WT, Lin S, Zon LI. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat. Immunol.* 2003;4:1238-1246.
 21. Kawasaki J, Aegerter S, Fevurly RD, Mammoto A, Mammoto T, Sahin M, Mably JD, Fishman SJ, Chan J. RASA1 functions in EPHB4 signaling pathway to suppress endothelial mTORC1 activity. *J. Clin. Invest.* 2014;124:2774-2784.
 22. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat. Genet.* 2000;26:216-220.
 23. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 1999;13:295-306.
 24. Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol. Cell.* 1999;4:403-414.
 25. Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev. Biol.* 2001;230:278-301.
 26. McKinney MC, Weinstein BM. Using the zebrafish to study vessel formation. *Methods Enzymol.* 2008;444:65-97.
 27. Isogai S, Hitomi J, Yaniv K, Weinstein BM. Zebrafish as a new animal model to study lymphangiogenesis. *Anat. Sci. Int.* 2009;84:102-111.
 28. Herbert SP, Huisken J, Kim TN, Feldman ME, Houseman BT, Wang RA, Shokat KM, Stainier DY. Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science.* 2009;326:294-298.
 29. Aurboonyawat T, Suthipongchai S, Pereira V, Ozanne A, Lasjaunias P. Patterns of cranial venous system from the comparative anatomy in vertebrates. Part I, introduction and the dorsal venous system. *Interv Neuroradiol.* 2007;13:335-344.

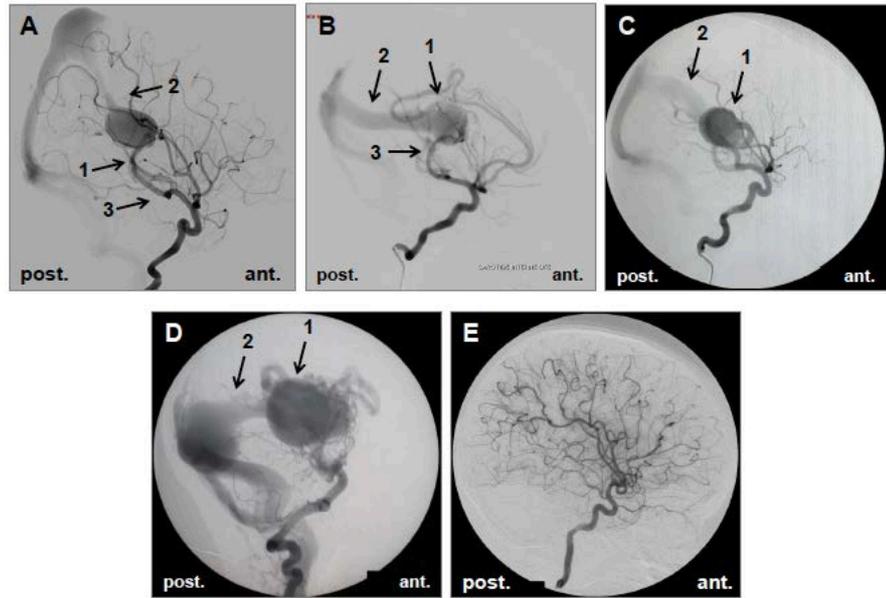


Figure 1

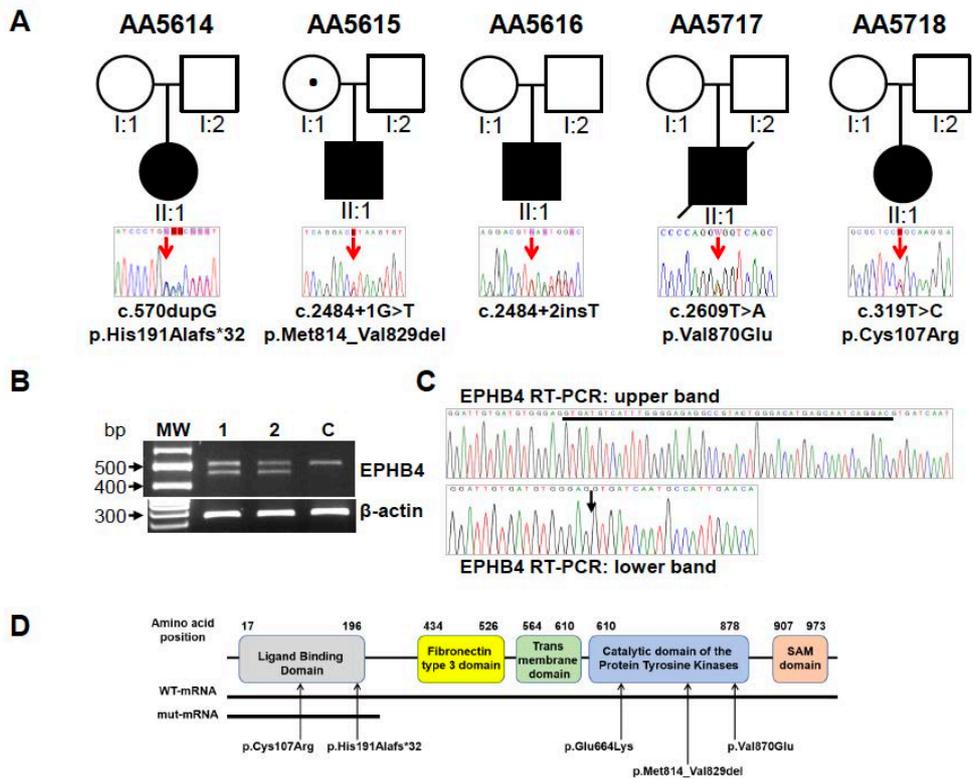


Figure 2

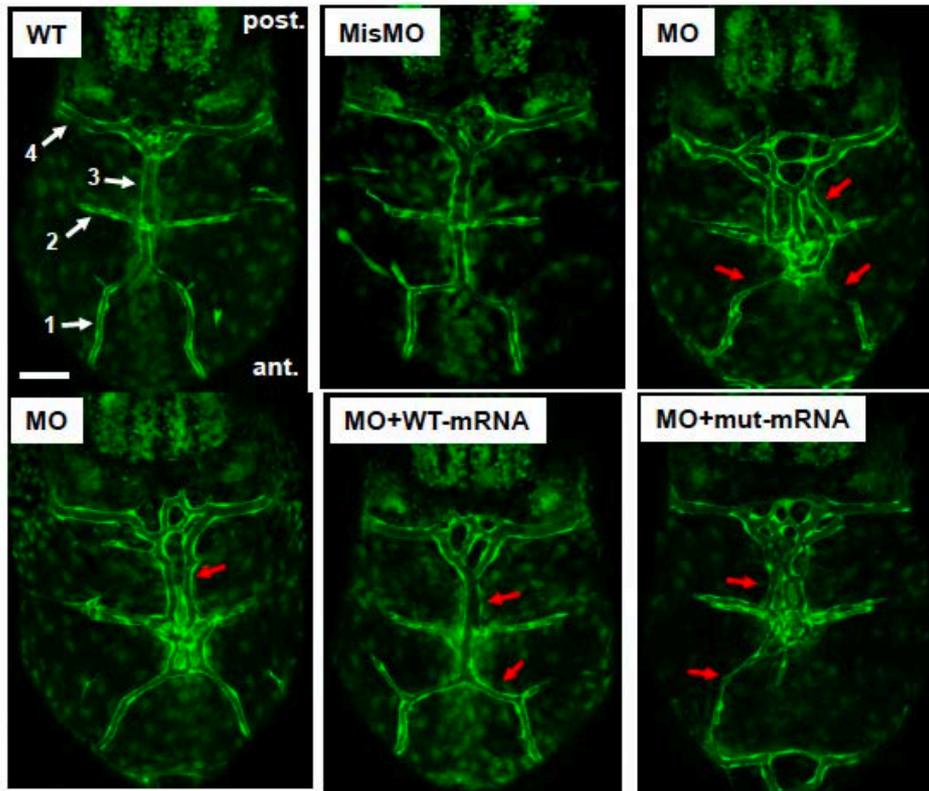


Figure 3

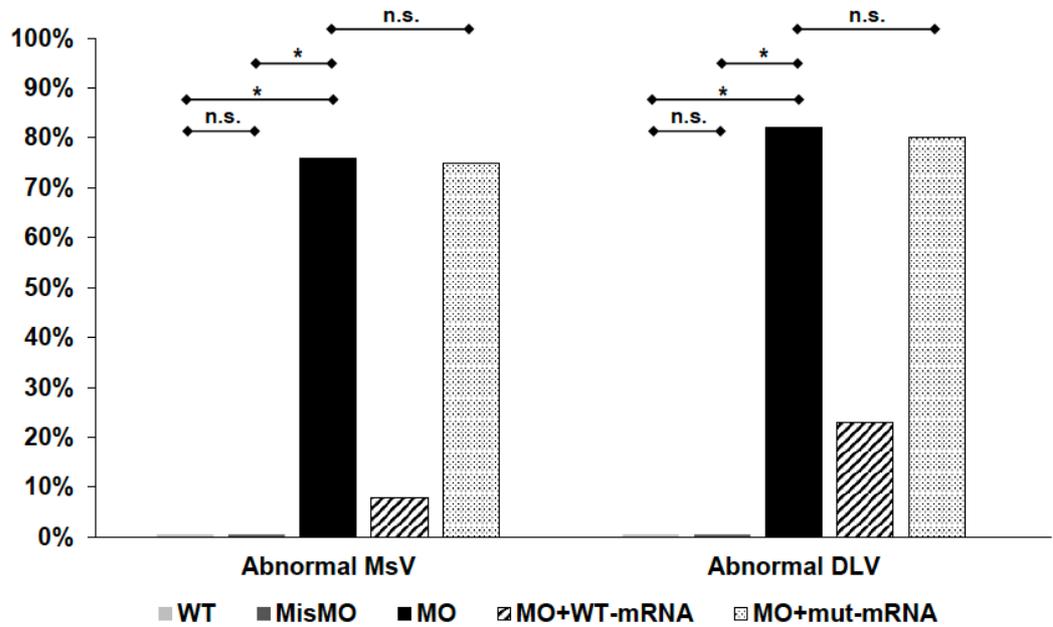


Figure 4

Table 1: Main clinical features and characteristics of *EPHB4* mutations found in VGAM patients

Patients	AA5614	AA5615	AA5616	AA5717	AA5718
<i>Clinical characteristics</i>					
Age at diagnosis	Prenatal: 3rd trimester ultrasound	Prenatal: 3rd trimester ultrasound	Postnatal: 4 days of life (cardiac failure)	Prenatal: 3rd trimester ultrasound	Prenatal: 3rd trimester ultrasound
Prenatal MRI additional findings	None	Unknown	N/A	Hydrocephaly & leukomalacia*	Unknown
Head circumference at delivery (cm, percentile)	35, 90	38, 97	37, 90	37.5, 97	32, 20
Neonatal cardiac failure	No	No	Yes: stable with medical treatment	N/A	No
Age at first embolization (month)	2	6	4	N/A	3.5
Associated capillary malformations	Yes, hemifacial	Yes, disseminated	No	Unknown	No
Psychomotor development (age of evaluation)	Normal (3 years)	Normal (8 years)	Normal (10 years)	N/A	Normal (2 years)
<i>EPHB4 mutations</i>					
cDNA change	c.570dupG	c.2484+1G>T	c.2484+2insT	c.2609T>A	c.319T>C
Inheritance	<i>de novo</i>	Mother	Father	Mother	Mother
Predicted protein change	p.His191Alafs*32	p.Met814_Val829del	Unknown	p.Val870Glu	p.Cys107Arg
Protein domain	Truncated protein	Catalytic Domain of PTK	Catalytic Domain of PTK	Catalytic Domain of PTK	Ligand Binding Domain
Polyphen-2	N/A	N/A	N/A	Probably damaging (1)	Probably damaging (1)
SIFT	N/A	N/A	N/A	Deleterious (0.0)	Deleterious (0.0)
1000 Genomes MAF	absence	absence	absence	absence	absence
ExAc Browser MAF	absence	absence	absence	absence	absence

N/A: not applicable; aa: aminoacid; MAF: minor allele frequency; * termination of pregnancy; PTK: Protein Tyrosine Kinases.

Legend to Figures

Figure 1: Digital subtracted angiogram of the affected individuals (A-D) and control (E). On the arterial phase, VGAM diagnosis was established based on the observation of marked dilatation of vein of Galen (1) draining into a falcine sinus (2), and arterial choroidal feeders of the arteriovenous shunt (3) in patients AA5718 (A), AA5614 (B), AA5615 (C), AA5616 (D) when compared to control (E). The angiogram was not performed in fetus AA5717 since the pregnancy was terminated at the request of the parents.

Figure 2: *EPHB4* Mutations identified in VGAM. (A) Pedigrees for families AA5614, AA5615, AA5616, AA5717 and AA5718 are shown. Arrows indicate mutant nucleotide positions. The affected individuals carry heterozygous mutation. The nucleotide and amino acid changes based on NM_004444.4 and NP_004435.3 reference sequences respectively are indicated. Segregation analysis of mutations within families are shown in **supplementary Fig. 1**. Open symbols: unaffected; filled symbols: affected. In family AA5615, the carrier mother (black dot) displays cutaneous capillary malformation. (B) RT-PCR analysis was performed from RNA after reverse transcription in affected individual AA5615 (1), his mother (2) and a control (C) and revealed two bands on gel electrophoresis in (1) and (2) when compared to (C) and internal control (β -actin). (C) Sanger sequencing was performed from the RT-PCR products using primers EPHB-Ex12-15-F and EPHB-Ex12-15-R (**supplementary Table 1**). Sequence analysis revealed, in addition to the wild type sequence (upper band), a truncated transcript (lower band, arrow) leading to the lack of amino acids 814 to 829 in both affected individual and his mother (underlined, p.Met814_Val829del). (D) Location of mutations found in the VGAM affected individuals from our cohort and in the VGAM family reported by Amyere et al. (2017, p.Glu664Lys). The amino acid sequences encoded by WT-mRNA or mut-mRNA used in zebrafish experiments are shown. SAM domain: Sterile alpha motif domain.

Figure 3: *ephb4a* knockdown in transgenic zebrafish embryos leads to brain vascular defects. Morphological views of the most dorsal cranial vessels using the transgenic line *fli1:EGFP* in WT or embryos injected with either *ephb4a*-MO (MO) or 5-base mismatch control *ephb4a*-MO (MisMO) at 3 dpf. Anterior is to the bottom and posterior is to the top in all stills. Note that *ephb4a*-MisMO phenotype was indistinguishable from WT. In contrast, transgenic zebrafish embryos injected with *ephb4a*-MO exhibited marked vascular anomalies of the DLV and MsV veins at 3 dpf (red arrows). Abnormal number of DLV (duplicated or triplicated veins) was observed. Similarly, abnormal morphology of MsV (absent or interrupted in one or both MsV) was observed in *ephb4a*-MO. Co-injection of *ephb4a*-MO with full length human EPHB4 mRNA (WT-mRNA) can rescue the MsV and DLV anomalies in most embryos. In contrast, when *ephb4a*-MO is co-injected with truncated EPHB4 transcript (mut-mRNA), MsV and DLV anomalies remain similar to those observed in *ephb4a*-MO. Scale bar: 60 μ m.

1: Mesencephalic Vein (MsV); 2: Middle Cerebral Vein (MCeV); 3: Dorsal Longitudinal Vein (DLV); 4: Posterior (caudal) Cerebral Vein (PCeV).

Figure 4: Graph indicating the percentage of brain venous anomalies in transgenic zebrafish in each condition. Transgenic zebrafish embryos were non-injected (Wild Type, WT, n=21) or injected with *ephb4a*-MO (MO, n=17), *ephb4a*-MisMO (MO, n=8), or co-injected with *ephb4a*-MO and either full length EPHB4 mRNA (MO+WT-mRNA, n=13) or truncated EPHB4 (MO+mut-mRNA, n=20). Zebrafish embryos were mounted for microscopy and then scored for the number of abnormal Dorsal Longitudinal Vein (abnormal DLV) or abnormal Mesencephalic Vein (abnormal MsV). *P ≤ 0.0005, n.s.: not significant.

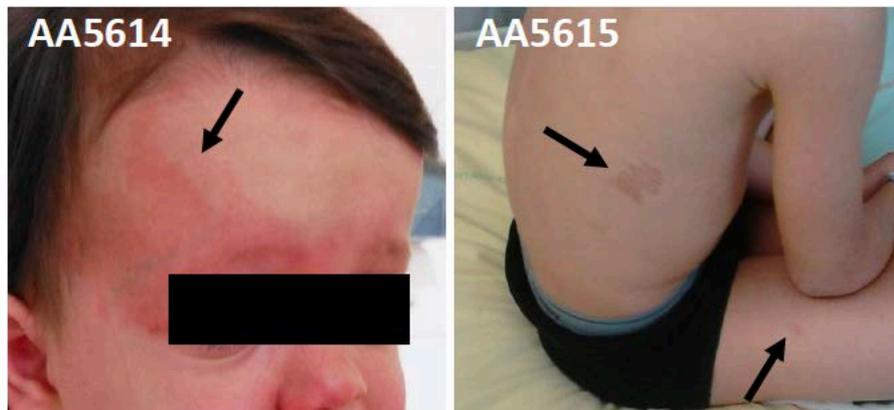
SUPPLEMENTAL MATERIAL

Figure 1: Sanger sequencing of mutations identified in *EPHB4* in VGAM and segregation analysis of mutations within families. Arrows indicate mutant nucleotide positions. The nucleotide and amino acid changes based on NM_004444.4 and NP_004435.3 reference sequences respectively are indicated. Open symbols: unaffected; filled symbols: affected. Black dot: cutaneous capillary malformation. Note that the frameshift mutation found in patient AA5614 (c.570dupG) occurred *de novo*.

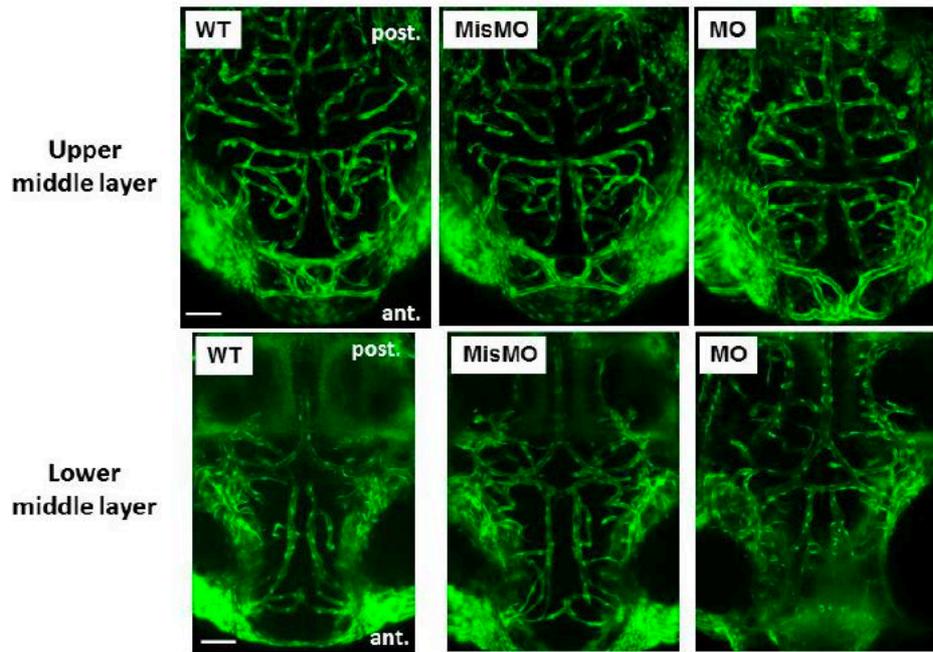
Figure 2: Vascular pattern of the upper and lower middle layers of cranial vessels in transgenic zebrafish at 3 dpf. Transgenic embryos injected with *ephb4a*-MO or MisMO were indistinguishable from WT embryos at the upper and lower middle layers of cranial vessels in contrast to marked vascular anomalies of the dorsal cranial vessels observed in *ephb4a*-MO zebrafish (see Figure 3). Scale bar: 60 μm.

Supplementary Data

Vivanti et al.



Supplementary Figure 1: In the affected individual AA5614, vein of Galen aneurysmal malformation is associated with a large cutaneous capillary malformation on the face (arrow). In the affected individual AA5615, the aneurysmal malformation was associated with several cutaneous capillary malformations on the body (arrows).



Supplementary Figure 2: Vascular pattern of the upper and lower middle layers of cranial vessels in transgenic zebrafish at 3 dpf. Transgenic embryos injected with *ephb4a*-MO or MisMO were indistinguishable from WT embryos at the upper and lower middle layers of cranial vessels in contrast to marked vascular anomalies of the dorsal cranial vessels observed in *ephb4a*-MO zebrafish (see Figure 3). Scale bar: 60 μ m.

Supplementary Table 1: Sequences of Primers

Designation	Primer sequences
Detection of <i>EPHB4</i> mutations	
EPHB-Ex1-F	5'-GTCCGAAGTGTTTGGGACTG-3'
EPHB-Ex1-R	5'-CGGAGTATCGGGCGTCCAC-3'
EPHB-Ex2-F	5'-GAGAAGGGCTCAGACGACAC-3'
EPHB-Ex2-R	5'-GCAGAAGAGGCCAGAAATCA-3'
EPHB-Ex3a-F	5'-CCTAAGCCTCCTGCTTCCA-3'
EPHB-Ex3a-R	5'-GCTGACCTCCTTCTCTGCAC-3'
EPHB-Ex3b-F	5'-CACTCGAGCATGGTGAAGC-3'
EPHB-Ex3b-R	5'-CCCTCCTCGCAGTACCAG-3'
EPHB-Ex4a-F	5'-AGAGCAAGCCTCCATTCAA-3'
EPHB-Ex4a-R	5'-AGCAAGGCTGGCTTCTACCT-3'
EPHB-Ex4b-F	5'-GCCATCCTCACGGCAGTA-3'
EPHB-Ex4b-R	5'-AGGTGGAGGGAAGATTCTGG-3'
EPHB-Ex5-F	5'-CTCCGGGCTAGGGACAAG-3'
EPHB-Ex5-R	5'-TTGGCTCAAGCGATCCTC-3'
EPHB-Ex6-a-F	5'-ATTGCCCTCTTTCTGCCTCT-3'
EPHB-Ex6-a-R	5'-GCCGAGAGGACCTCACCTA-3'
EPHB-Ex6-b-F	5'-GTAGCCCTCGAACCACCAC-3'
EPHB-Ex6-b-R	5'-TGGGCTTCTTCCCTTIGTC-3'
EPHB-Ex7-F	5'-ACAGGCCAAGGGGCTTAC-3'
EPHB-Ex7-R	5'-AAGGGACAGAGCTACCATGC-3'
EPHB-Ex8-F	5'-GATGGGACTTTGGAGACCTG-3'
EPHB-Ex8-R	5'-GGCTTGCATGCGTAAGTTCT-3'
EPHB-Ex9-F	5'-CAAAGGAAGGAGCAGGGATT-3'
EPHB-Ex9-R	5'-CTTGTGTCCTCTCCCTCCAC-3'
EPHB-Ex10-F	5'-TAGATAGGAGCCACCACACCC-3'
EPHB-Ex10-R	5'-CCACCTGCCTGGGTGCTA-3'
EPHB-Ex11-F	5'-CACACCTCGCCAAACTCAC-3'
EPHB-Ex11-R	5'-AGGGGTTTGGGGCTAAAAG-3'
EPHB-Ex12-F	5'-AGAGGAAAAGGCTGGAGGAG-3'
EPHB-Ex12-R	5'-TGAAGAGGTGATTGGTGCAG-3'
EPHB-Ex13-F	5'-CTTCCTGGAGCTGACTGTCC-3'
EPHB-Ex13-R	5'-CTGGGCGACAGAACAAGAC-3'
EPHB-Ex14-F	5'-GCTGGGATTACAGGCTTGAG-3'
EPHB-Ex14-R	5'-AACCTGGGCAAACAGAGTTG-3'
EPHB-Ex15-F	5'-ATGGGGAGGAATGCTGAGTA-3'
EPHB-Ex15-R	5'-AGGAGGATTCCTGGATCTGTT-3'
EPHB-Ex16-F	5'-GCAGTGCAAGAAGACAGCAT-3'

EPHB-Ex16-R	5'-CAGAAGTGTCCGTTTCATTGG-3'
EPHB-Ex17-F	5'-CCCAAATCCTGTCTCTCCAA-3'
EPHB-Ex17-R	5'-ATGGCTGCCAGCTCTTA-3'-3'
Primers for real time PCR of <i>EPHB4</i>	
EPHB-Ex2-F	5'-GAGAAGGGCTCAGACGACAC-3'
EPHB-Ex2-R	5'-GCAGAAGAGGCCAGAAATCA-3'
EPEX-5Fq	5'-GGCTGGCAGGACCCTTCT-3'
EPEX-5Rq	5'-TTTGATGAATGCTTTCTCTCTCA-3'
EPEX-9Fq	5'-CCATCAACTGAGGGCTTCCA-3'
EPEX-9Rq	5'-CGCAGTTCTCTGCCTCAGGTA-3'
EPEX-10Fq	5'-AAGCCCCTATTCCCATCAAATT-3'
EPEX-10Rq	5'-GGACAAACACGGACAGTATCTCAT-3'
EPEX-11Fq	5'-CCACCCCGCTTCGTT-3'
EPEX-11Rq	5'-TACGTCAAGATTGAAGAGGTGATTG-3'
EPEX-12Fq	5'-GGCACACCTCGCCAAACT-3'
EPEX-12Rq	5'-CTGGAGCGGGAGAGCTGAT-3'
EPEX-13Fq	5'-CACGAGCTGGATGACTGTGAA-3'
EPEX-13Rq	5'-CAAGCCCCACCTATCTG-3'
EPHB-Ex16-F	5'-GCAGTGCAAGAAGACAGCAT-3'
EPHB-Ex16-R	5'-CAGAAGTGTCCGTTTCATTGG-3'
Primers for real time PCR of human albumin (<i>ALB</i>)	
ALB-12Fq	5'-TGTTGCATGAGAAAACGCCA-3'
ALB-12Rq	5'-GTCGCCTGTTACCAAGGAT-3'
Primers for RT-PCR of human <i>EPHB4</i>	
EPHB-Ex12-15-F	5'-TGCCCGTCATGATTCTCACA-3'
EPHB-Ex12-15-R	5'-CATGAGCTGGTGGAGGGAG-3'
Primers for RT-PCR of human β-actin	
b-Actin-F	5'-GCCAGGTCATCACCATTGG-3'
b-Actin-R	5'-AGGACTCCATGCCAGGAA-3'
Zebrafish oligonucleotides	
EphB4a (splice)	5'-CTGGAAAACACACACGAGAGATAGA-3'
5mis-EPHB4a (splice)	5'-CTGcAAAAGAgACACcAcAGATAGA-3'

Table S1. Sequences of Primers

Designation	Primer sequences (5'-3')
1- Detection of <i>GLDN</i> mutation	
<i>Family 1</i>	
GLDN718-F	5'-TGGCCAGGAAACATCCCAAA-3'
GLDN718-R	5'-AGCATTAAATGGCCATCTTCCC-3'.
GLDN736-F	5'-TCCCTCCCCTTTCCTTCCC-3'
GLDN736-R	5'-GGACAAAACCTCCTCCCTC-3'
<i>Family 2</i>	
GldnEx1A-F	5'-GCCACCACTACTGTCCCC-3'
GldnEx1A-R	5'-GCTCAACTCGGCCAGGAA-3'
<i>Family 3</i>	
GldnEx4-F	5'-CTCTGCCATCACCATCCCC-3'
GldnEx4-R	5'-GTGGGACCAAGAAGTATACCCT-3'.
GldnEx10A-F	5'-CTCACAGCATTGCCCAAGG-3'
GldnEx10A-R	5'-ACCCTCATATCTTTGGTGTCTGT-3'.
<i>Family 4</i>	
GldnEx10A-F	5'-CTCACAGCATTGCCCAAGG-3'
GldnEx10A-R	5'-ACCCTCATATCTTTGGTGTCTGT-3'.
2- Long Range RT-PCR amplification of <i>GLDN</i> transcripts	
GLDN-Ex1Fq	5'-CCGCACCACCCCAAGA-3'
GLDN-Ex10Rq	5'-CGTGTTGCACCACTGAGAATGT-3'

**Mutations in *GLDN* encoding gliomedin, a critical component of nodes of Ranvier,
are responsible for lethal arthrogyrosis**

Jérôme Maluenda¹, Constance Manso², Loic Quevarec¹, Alexandre Vivanti¹, Marie Gonzales³, Fabien Guimiot⁴, Florence Petit⁵, Annick Toutain⁶, Sandra Whalen³, Romulus Grigorescu³, Florent Marguet⁷, Anne Dieux Coeslier⁵, Marta Gut⁸, Ivo Gut⁸, Annie Laquerrière⁷, Jérôme Devaux², and Judith Melki^{1*}

¹Unité Mixte de Recherche (UMR)-1169, Inserm, Université Paris Saclay, Le Kremlin Bicêtre, 94276, France. ²Aix-Marseille Université, CNRS, CRN2M-UMR-7286, 13444 Marseille, France. ³Département de Génétique Médicale, Hôpital Trousseau, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 75571, France. ⁴Service de Biologie du Développement, INSERM U1141, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France. ⁵Clinique de Génétique Guy Fontaine, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU, 59037, Lille. ⁶Service de Génétique, Hôpital Bretonneau, CHU de Tours, Tours, 37044, France. ⁷Pathology Laboratory and NeoVasc Region-Inserm Team ERI28, Institute of Research for Innovation in Biomedicine, University of Rouen, 76031, Rouen, France. ⁸Centro Nacional de Análisis Genómico, Barcelona, 080028, Spain.

*Correspondence should be addressed to J. Melki (judith.melki@inserm.fr)

Arthrogryposis multiplex congenita (AMC) is a developmental condition characterized by multiple joint contractures resulting from reduced or absent fetal movements. Whole or targeted exome sequencing in four unrelated families with lethal AMC allowed the identification of biallelic mutations in *GLDN* encoding gliomedin, a secreted cell adhesion molecule involved in the formation of nodes of Ranvier. The *GLDN* mutations abolish the cell surface expression of gliomedin but also the interaction with its axonal partner, neurofascin-186 (NF186) in a cell-based assay. The axoglial contact between gliomedin and NF186 is essential for the initial clustering of Na⁺ channels at developing nodes. Our paper adds to the recent report of lethal arthrogryposis caused by mutations in *CNTNAPI* encoding CASPR-1, a paranodal component also involved in node formation. These results indicate a major role of these proteins in the development of peripheral nervous system in humans. These inherited nodopathies represent a novel disease entity among peripheral neuropathies.

Arthrogryposis multiplex congenita (AMC) is a group of clinical conditions presenting with multiple joint contractures. AMC has an overall incidence of 1 in 3000^{1,2}. Isolated AMC are the direct consequence of reduced or absent fetal movement. They are clinically heterogeneous and arise as a result of mutations in genes encoding components required for the formation or the function of the neuromuscular junction, the skeletal muscle, the survival of motor neurons or myelination of peripheral nerve³. However, many patients remain without a genetic diagnosis suggesting the involvement of other pathogenic mechanisms.

Here, we further explored genetic alterations in a group of undiagnosed AMC families. The parents of all affected individuals provided written informed consents for genetic analyses of their children or fetuses and themselves in accordance with the ethical

standards of our institutional review boards. In family 1, two affected fetuses were born from non consanguineous healthy parents. Based on ultrasound examination, the first fetus displayed akinesia associated with polyhydramnios from 32 weeks of gestation (w.g.). Fetal death occurred at 33 w.g. Fetopathological examination revealed marked extension of lower limbs associated with extension of handles and pulmonary hypoplasia (Supplementary Fig. S1). For the second fetus, ultrasound examination revealed identical phenotype and the pregnancy was terminated at 33 w.g. Karyotype, *SMN1*, *DMPK* analyses were normal. Histological examination of the spinal cord and skeletal muscle was normal. Combining genetic mapping of disease loci under the hypothesis of autosomal recessive inheritance and whole exome sequencing, compound heterozygous mutations were identified in *GLDN* (Fig. 1a). An heterozygous frameshift deletion (NM_181789.2:c.758delC) resulting in premature stop codon (p.Pro253Leufs*51) was identified. This variant was not annotated in the 1000Genomes or ExAC Browser databases. The second mutation was a missense mutation (NM_181789.2:c.1423G>C) predicted to be pathogenic with a high score (p.Ala475Pro; Polyphen-2 score of 1). This mutation is annotated in dbSNP146 (rs764239923) with a very low minor allele frequency (MAF) in ExAC database (0.00000824). Both mutations were confirmed by Sanger sequencing in both fetuses and were allelic (Fig. 1a and Supplementary Fig. S2 and Table S1). Transmission Electron Microscopy of the sciatic nerve from the index case revealed a reduced number of myelinated fibers. In a comparable field of view (5000 μm^2), 47 axons were myelinated as compared to 77 in two age-matched control fetuses (Fig. 2). The nodal length was significantly increased at 5.96 +/- 2.33 μm in the patient when compared to 1.12 +/- 0.98 μm in the control fetus (Fig. 2).

Targeted exome sequencing was performed on the DNA sample of additional affected individuals with arthrogryposis and/or reduced fetal mobility of unknown origin (n=106) and allowed for the identification of three additional families carrying mutations

in *GLDN*. In family 2, the patient was born at 30 w.g. with marked polyhydramnios, intrauterine growth retardation and AMC characterized by retraction of elbows, extension of knees, camptodactyly and retrognathia. Ultrasound examinations performed at 14 and 23 w.g. were normal. The male neonate boy died at day 1. He was born from consanguineous parents. Combining homozygosity by descent using 250K SNP microarray and targeted exome sequencing, homozygous missense mutation in *GLDN* (NM_181789.2:c.95C>A; p.Ala32Glu) predicted to be pathogenic with a score of 0.8 (Polyphen-2) was identified (Fig. 1a). This mutation is annotated in dbSNP146 (rs779432560) with a very low MAF in ExAC database (0.00002829). The mutation was confirmed by Sanger sequencing and both parents were heterozygous carriers (Fig. 1a, Supplementary Fig. S2 and Table S1). In family 3, two affected fetuses were born from non consanguineous healthy parents. The first patient died at day 1 with akinesia, polyhydramnios and AMC involving fingers, wrists, thumbs, knees and pulmonary hypoplasia. Ultrasound examinations during pregnancy were normal at 22 w.g. then detected a marked polyhydramnios at 28 w.g. with bilateral flexion of fingers. Karyotype, *SMNI*, *DMPK* analyses were normal. Pathological examination of brain and spinal cord was normal. For the second male fetus, ultrasound examinations at 12 and 22 w.g. were normal. At 31 w.g., ultrasound examination revealed a similar abnormal phenotype characterized by polyhydramnios, marked extension of lower limbs associated with flexion of fingers and marked reduced mobility. The pregnancy was terminated at 31 w.g. and fetal examination confirmed AMC associated with microretrognathia and pulmonary hypoplasia. Targeted exome sequencing was performed on the DNA sample of the first affected individual and identified compound heterozygous mutations in *GLDN* (Fig. 1a): an heterozygous stop gained mutation (NM_181789.2:c.1240C>T: p.Arg414*) annotated in dbSNP146 (rs539703340) with a very low MAF in both 1000g (0.0002) and ExAC databases (0.000008) and a splice donor mutation (NM_181789.2:c.541+1G>A) not

annotated in the same databases. Both mutations were confirmed by Sanger sequencing in both fetuses and were allelic (Fig. 1a and Supplementary Fig. S2 and Table S1). Sequencing of RT-PCR products of *GLDN* from muscle RNA of patient II:1 revealed the stop gained mutation only, indicating that the allelic splice donor mutation leads to either a retention of large intronic sequence or instability of the corresponding transcript (Fig. 1b). In family 4, the patient was born from consanguineous parents. Ultrasound examinations performed at 13 and 21 w.g. were normal. At 27 w.g., ultrasound examination revealed reduced fetal mobility with marked polyhydramnios and at 29 w.g. fetal immobility. Karyotype, *SMNI*, *DMPK* analyses were normal. Pregnancy was terminated at 30 w.g. Fetopathological examination revealed distal arthrogyposis of hands, bilateral clubfoot and pulmonary hypoplasia. Pathological examination of brain and spinal cord was normal. Targeted exome sequencing was performed on the DNA sample of the affected individual and identified homozygous stop gained mutation in *GLDN* (NM_181789.2:c.1435C>T: p.Arg479*). The mutation is annotated in dbSNP146 (rs368085516) with a very low MAF in ExAC database (0.00001647). The mutation was confirmed by Sanger sequencing and both parents were heterozygous carriers (Fig. 1a, Supplementary Fig. S2 and Table S1).

The Ala475Pro mutation found in family 1 is located within the olfactomedin domain (aa 300-550, Fig. 1c) of gliomedin⁴. Pro253Leufs*51, Arg414* and Arg479* mutations found in families 1, 3 and 4 respectively, are also suspected to affect this domain. The olfactomedin domain mediates the interaction between gliomedin and NrCAM and neurofascin-186 (NF186), two cell adhesion molecules expressed at the nodes of Ranvier^{4,7}. These mutations may thus impact the formation of the NrCAM/NF186/gliomedin complex at nodes. In family 2, the Ala32Glu mutation is localized within the transmembrane domain of gliomedin (aa 16-38, Fig. 1c)^{4,6}. Gliomedin exists as a transmembrane and a secreted form, and this latter form only is found at nodes^{4,5}. However, mutations within the transmembrane domain may affect gliomedin secretion. To determine whether these

mutations had deleterious effects on gliomedin surface expression and NF186 binding, a myc tag epitope was inserted at the extracellular C-terminus of wild type (WT) and mutant Ala32Glu, Ala475Pro or Pro253Leufs*51 gliomedin constructs. These constructs were then transfected in CHO cells and living cells were incubated with anti-myc antibodies to detect surface gliomedin or incubated with soluble NF186 (NF186-Fc). An antibody to myc tag was then used to reveal the total WT and mutant gliomedin after fixation and permeabilization. WT gliomedin was readily expressed at the cell surface (Fig. 3) and bound NF186-Fc (Fig. 4). In contrast, Ala32Glu, Ala475Pro or Pro253Leufs*51 gliomedin mutations strongly affected the surface expression of gliomedin (Fig. 3) and resulted in the loss of NF186-Fc binding to cells (Fig. 4). These data indicate that *GLDN* mutations found in patients had major deleterious effect on gliomedin transport to the cell surface and its binding to NF186. The p.Arg414* and p.Arg479* mutations identified in families 3 and 4, respectively are located within the olfactomedin domain and are expected to lead to similar defective effects.

In the peripheral nervous system (PNS), the axoglial contact mediated by the binding of glial gliomedin and NrCAM to axonal NF186 is crucial for the initial clustering of voltage-gated Na⁺ channels at nodes of Ranvier^{4,6}. The concentration of these channels allows saltatory conduction along myelinated axons. In the mature nerve, the secreted form of gliomedin is localized at the node of Ranvier and maintains the position of the Schwann cell microvilli towards the nodal axolemma^{4,6}. Here, our approach allowed the identification of *GLDN* mutations in four unrelated families with severe hypokinesia with AMC. The p.Ala475Pro and p.Pro253Leufs*51 mutations both affected the olfactomedin domain of gliomedin and resulted in defects in surface expression and interaction with NF186. This suggested that the patients carrying these mutations on both alleles may exhibit alterations of the axoglial contact at nodes. In keeping, one of these patients showed important node lengthening and myelination defect in the sciatic nerve.

Interestingly, the p.Ala32Glu mutation resulted also in defects in surface expression of gliomedin and may thus affect its aggregation at nodes. Surprisingly, mice carrying homozygous deletion of exons 9 and 10 of *Gldn*, which encode for the olfactomedin domain of gliomedin, display no overt neurological abnormalities⁸. The mutations found in patients may have stronger effects by impacting on the gliomedin/NrCAM/NF186 complex. Indeed, mutant gliomedin proteins may affect the expression or transport of glial partner proteins. Our data adds to the recent report of four unrelated AMC families showing homozygous frameshift mutations in *CNTNAPI*⁹. Patients showed a marked reduction in motor nerve conduction velocity and severe abnormalities of myelination and node lengthening. *CNTNAPI* encodes CASPR-1, an essential component of the paranodal axoglial junction composed by Caspr-1/Contactin-1/neurofascin-155 (NF155). This junction is believed to form a barrier to the lateral diffusion of nodal Na⁺ channels^{10,11}. Altogether, these results indicate that mutations of *GLDN* or *CNTNAPI* encoding essential components of the nodes of Ranvier and paranode, respectively lead to severe developmental defect of the PNS leading to reduced fetal mobility and AMC. These inherited nodopathies represent a novel disease entity among peripheral neuropathies.

URLs.

BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

dbSNP146, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

1000 Genomes, <http://www.1000genomes.org/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org/>

ExAC, <http://exac.broadinstitute.org/>

ANNOVAR, <http://www.openbioinformatics.org/annovar/>

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

Human Splicing Finder, <http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.P., F.G., A.T., S.W., A.D-C. recruited and clinically characterized the study subjects and collected the biological samples. M.Go., R.G. and F.G. performed pathological studies. A.L. performed and analyzed the morphology of the neuromuscular system of patient and control. F.M. provided assistance for morphological analysis. M.Gu. and I.G. performed the WES. J.Ma. performed genetic mapping, targeted exome sequencing with L.Q., Sanger sequencing and RNA analysis. A.V. and L.Q contributed to the targeted-exome sequencing data analysis. J.Me. performed bioinformatics analysis of WES, TES data and genetic mapping. C.M. and J.D. performed cell-binding assay studies and J.D. analyzed and interpreted the data. J.Me. conceived, designed and supervised the project. J.Me. and J.D. wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC 2010, AOM10181), the Association Française contre les Myopathies (AFM, DAJ1891), University Paris Saclay (ERM2013) and Inserm to J.M. This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ACAMIN) under the frame of E-Rare-2, the ERA-Net for Research on Rare Diseases, and from the Association Française contre les Myopathies (MNM1 2012-14580) to JD. The authors would like to thank Damien Gentil for technical assistance, the Clinical Research Unit of Bicêtre Hospital and the Direction of Clinical Research and Development (AP-HP).

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests

REFERENCES

1. Hall, J.G. Genetic aspects of arthrogyrosis. *Clin. Orthop.* **194**, 44-53 (1985).
2. Fahy, M.J. & Hall, J.G. A retrospective study of pregnancy complications among 828 cases of arthrogyrosis. *Genet. Couns.* **1**, 3-11 (1990).
3. Hall JG. Arthrogyrosis (multiple congenital contractures): diagnostic approach to etiology, classification, genetics, and general principles. *Eur. J. Med. Genet.* **57**, 464-72 (2014).
4. Eshed, Y. *et al.* Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* **47**, 215-229 (2005).
5. Eshed, Y., Feinberg, K., Carey, D.J. & Peles E. Secreted gliomedin is a perinodal matrix component of peripheral nerves. *J. Cell Biol.* **177**, 551-562 (2007).
6. Maertens, B. *et al.* Cleavage and oligomerization of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of ranvier formation. *J. Biol. Chem.* **282**, 10647-10659 (2007).
7. Labasque, M., Devaux, J.J., Lévêque, C. & Faivre-Sarrailh, C. Fibronectin type III-like domains of neurofascin-186 protein mediate gliomedin binding and its clustering at the developing nodes of Ranvier. *J. Biol. Chem.* **286**, 42426-42434 (2011).
8. Feinberg, K. *et al.* A glial signal consisting of gliomedin and NrCAM clusters axonal Na⁺ channels during the formation of nodes of Ranvier. *Neuron* **65**, 490-502 (2010).
9. Laquérrière, A. *et al.* Mutations in *CNTNAP1* and *ADCY6* are responsible for severe arthrogyrosis multiplex congenita with axoglial defects. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2279-89 (2014).
10. Peles, E. *et al.* Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor

with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J.* **16**, 978-988 (1997).

11. Rios, J.C. *et al.* Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J. Neurosci.* **20**, 8354-8364 (2000).

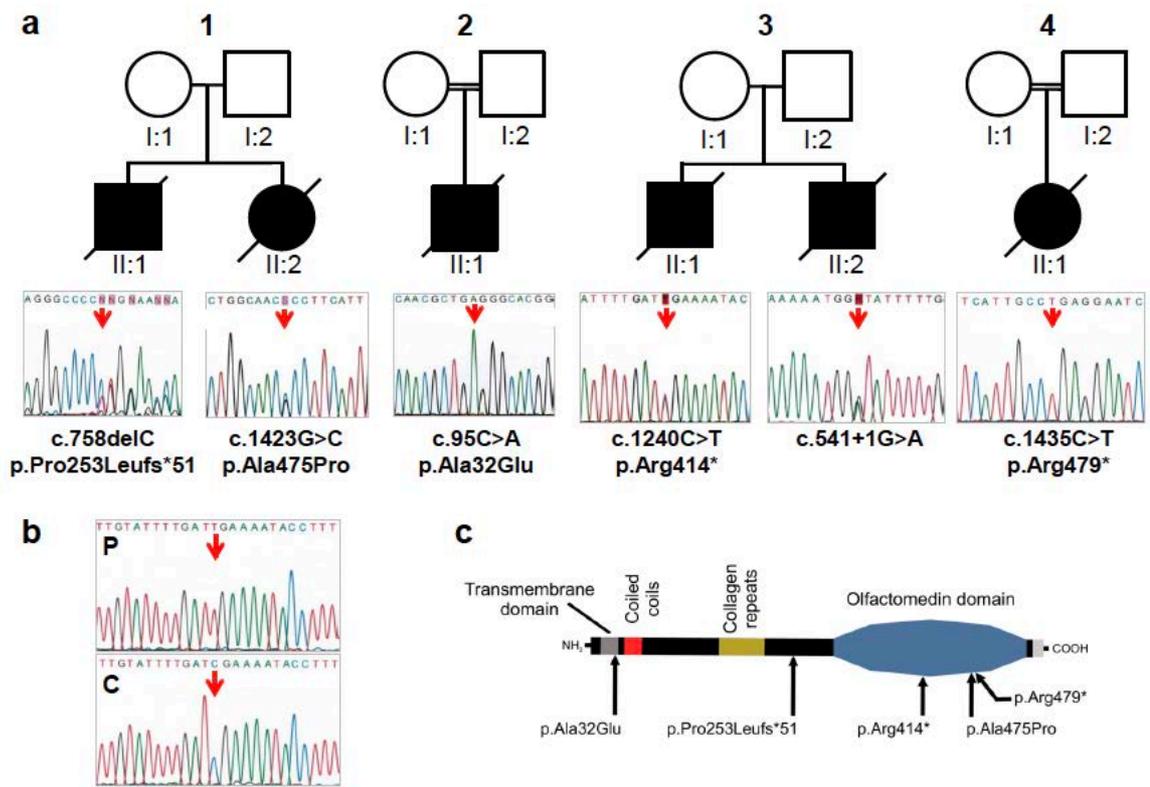


Figure 1

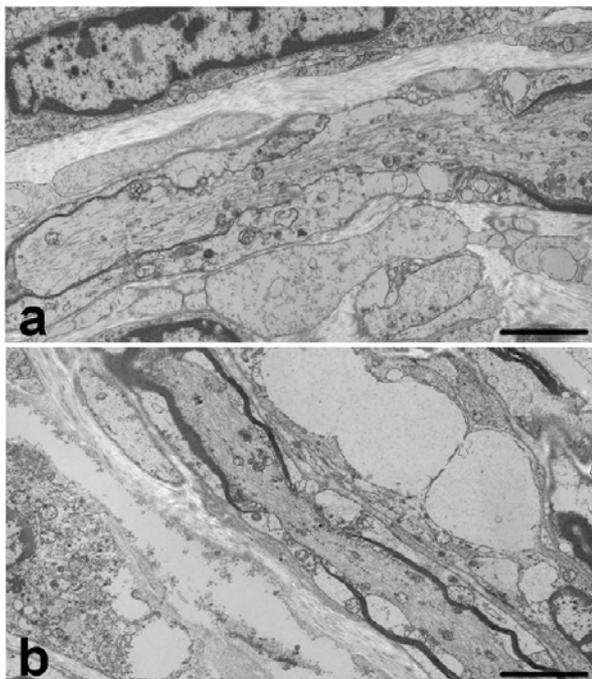


Figure 2

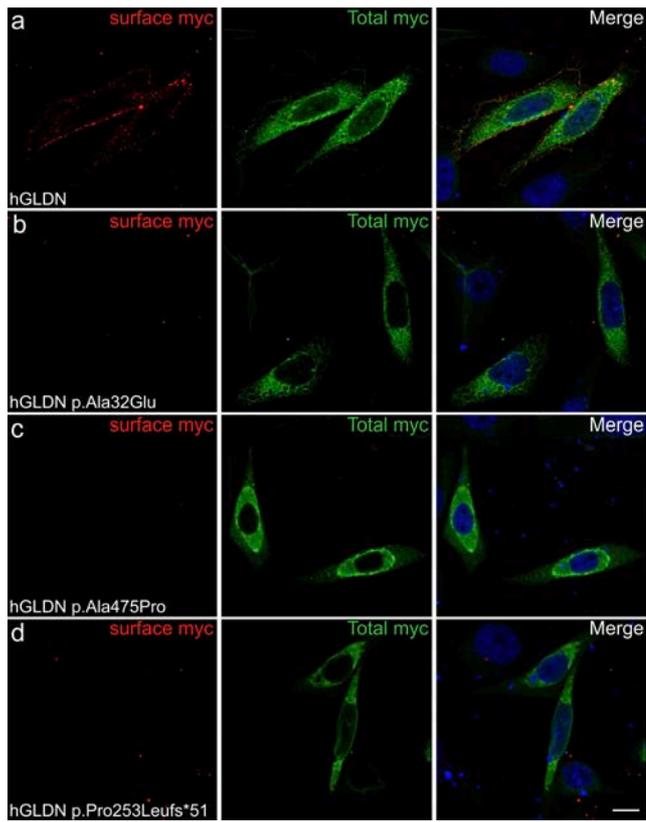


Figure 3

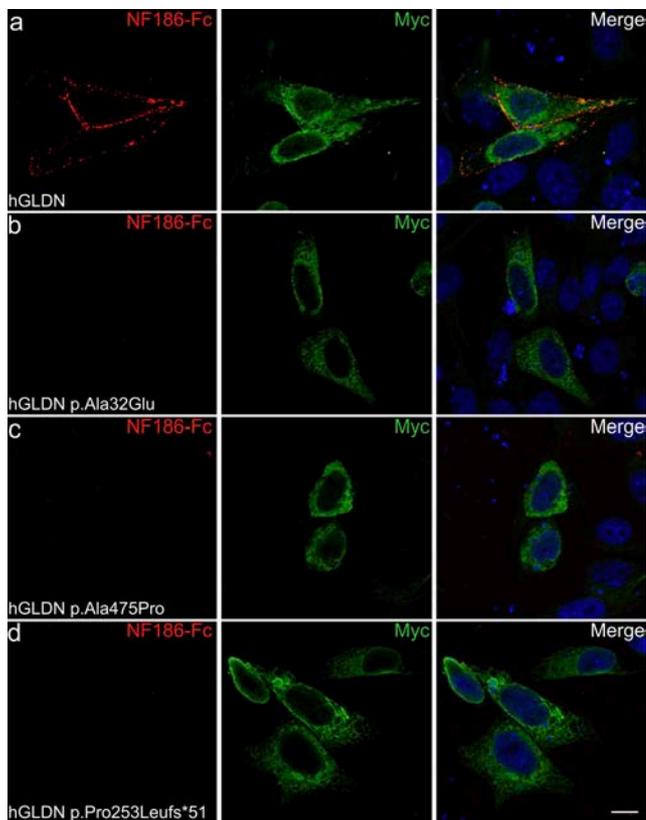


Figure 4

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Mutations identified in *GLDN* in AMC families.

(a) Pedigrees for families 1, 2, 3 and 4 are shown. Arrows indicate mutant nucleotide positions. The patients carry either compound heterozygous (families 1 and 3) or homozygous mutations (families 2 and 4). The nucleotide and amino acid changes based on NM_181789.2 and NP_861454.2 reference sequences respectively are indicated. Open symbols: unaffected; filled symbols: affected. (b) Sequencing of RT-PCR product from RNA of family 3's patient II:1 (P) and control (C). Patient sequence revealed the stop gained mutation only indicating that the allelic splice donor mutation leads to loss of the corresponding transcript. (c) Location of mutations relative to the predicted protein domains of gliomedin.

Figure 2: TEM analysis of nerve in patient II:1 of family 1 carrying deleterious *GLDN* mutations.

(a) Longitudinal section of sciatic nerve of the affected fetus displaying increased length of the node of Ranvier by comparison with an age matched control the same age (33 w.g., b). Scale bars: 3 μ m. a and b: OM x 3900.

Figure 3: Mutations in *GLDN* affect the surface expression of the protein.

CHO cells transfected with myc-tagged human gliomedin (hGLDN) were incubated with mouse antibodies against myc before fixation to label surface myc (red), and after fixation and permeabilization to label total myc (green). Nuclei are stained with DAPI (blue). WT gliomedin (a) is readily expressed at the cell surface. By contrast, p.A32G (b), p.A475P (c), and p.P253Lfs*51 (d) mutations strongly impacted the surface expression of gliomedin. Scale bars: 10 μ m.

Figure 4: NF186 binding is disrupted by *GLDN* mutations.

CHO cells transfected with myc-tagged human gliomedin (hGLDN, green) were incubated with NF186-Fc (red). Nuclei are stained with DAPI (blue). NF186-Fc bound to cells transfected with WT gliomedin (a), but did not bind to p.A32G (b), p.A475P (c), or p.P253Lfs*51 (d) mutants. Scale bars: 10 μ m.

ONLINE METHODS

Mutations in *GLDN* encoding gliomedin, a critical component of nodes of Ranvier, are responsible for lethal arthrogryposis. Maluenda J. et al.

Genetic mapping of disease loci was performed in families 1 and 2 using Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K microarray. Multipoint linkage analysis or homozygosity by descent of SNP data was performed using the Alohomora¹² and Merlin softwares¹³.

Whole exome sequencing (WES) was performed from DNA of the index case (family 1) using the Exome Capture Agilent SureSelect XT V5 kit for library preparation and exome enrichment as previously described¹⁴. Each library was sequenced using TruSeq SBS Kit v3-HS (Illumina, Inc), in paired-end mode with a read length of 2x100bp. On average 65x median coverage for each sample was generated in a fraction of a sequencing lane on HiSeq2000 following the manufacturer's protocol. Images analysis, base calling and quality scoring of the run were processed using the manufacturer's software Real Time Analysis (RTA 1.13.48, HCS 1.5.15.1) and followed by generation of FASTQ sequence files by CASAVA.

Targeted exome sequencing was performed using the Agilent SureSelectXT Custom kit (targeting 500 Kb including all known AMC genes and candidate genes including *GLDN*) for library preparation and exome enrichment. Sequencing was performed on an Illumina MiSeq System using paired-end 150bp reads and following Illumina's protocol using the MiSeq Reagent Micro Kit, v2. The average of the median coverage was 92.

Bioinformatics analysis: Reads from either whole or targeted exome sequencing were aligned to the human reference genome sequence (UCSC hg19, NCBI build 37.3) via the BWA program¹⁵. Variants were selected using the SAMtools¹⁶ then annotated using Annovar softwares¹⁷. Variants in coding regions (including non-synonymous and nonsense mutations), intron-exon junctions or short coding insertions or deletions were selected when the MAF was less than 0.0030. Variants mapping to the candidate loci as determined by linkage analysis were selected. Prediction of pathogenicity of non-synonymous or splice mutations was performed using the Polyphen-2¹⁸ and Human splicing finder respectively¹⁹.

Sanger sequencing. PCR amplification was carried out using 1.5 mM MgCl₂, 0.6 U DNA Polymerase, 0.25 μM each primer and 50 ng DNA. The primers used for the detection of mutations are described in Supplementary Table S1. After an initial cycle of denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles were performed consisting in denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 1min, and final extension 7 min at 72°C, on an ABI9700 Thermal Cycler. PCR products were then purified and sequenced using the forward or reverse primers (Eurofins). The obtained DNA sequences were compared with published sequences (BLAST, NCBI).

Reverse Transcription-PCR Amplification. Total RNAs were extracted by using TRI Reagent LS method (Sigma-Aldrich). RT-PCR analysis was performed from RNA after reverse transcription (SuperScript III Reverse Transcriptase, Thermofisher). Five μg RNA were used to synthesize cDNA by using random hexamers following the manufacturer's manual in a final volume of 20 μL. Long range PCR amplification was carried out using Advantage GC Genomic LA polymerase (Clontech). Sanger sequencing was performed

from the RT-PCR products using primers GLDN-Ex1Fq and GLDN-Ex10Rq (Supplementary Table S1).

Transmission Electron Microscopy

Nerve ultrastructural studies were carried out according to standardized protocols. Briefly, tissue samples were fixed in a 2% glutaraldehyde fixative solution, post-fixed with osmium tetroxide, and embedded in resin epoxy. Semi-thin sections were stained with toluidine blue. Ultra-thin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a PHILIPS CM10 transmission electron microscope.

Constructs

Human gliomedin (NM_181789.2) was amplified by PCR from a human placental cDNA library and sub-cloned into pcDNA3.1 (Thermofisher) at KpnI and XbaI sites and a myc tag epitope was inserted at the extracellular C-terminus. Mutations found in patients (NM_181789.2:c.1423G>C, c.758delC, c.95C>A) were inserted into cDNA using PrimeSTAR HS DNA polymerase (Clontech). All constructions were sequenced through the entire coding region and verified by western blots and immunolabelling. The extracellular domain of NF186 (NF186-Fc) fused to human IgG Fc was expressed in human embryonic kidney cells, and purified with Protein A-Sepharose beads (Sigma-Aldrich).

Cell-binding assay

Chinese hamster ovary cells were plated onto poly-L-lysine coated glass coverslips in 24-well plates at a density of 50,000 cells/wells and were transiently transfected with gliomedin constructs using JetPEI (Polyplus-transfection). The day after, cells were incubated with serum free Opti-MEM medium (Thermofisher) for 24 hours. For binding

experiments, 1 μ g of NF186-Fc was pre-incubated with Alexa 594 conjugated donkey anti-human IgG (1/100; Jackson ImmunoResearch) in Opti-MEM for 30 min. For surface expression, mouse monoclonal antibodies against Myc (1:50; Roche) was pre-incubated with Alexa 594 conjugated donkey anti-mouse IgG (1/100; Jackson ImmunoResearch) in Opti-MEM for 30 min. Living cells were then incubated for 20 min at 37°C with these mixtures. Cells were washed three times in PBS, fixed with 2% paraformaldehyde in 0.1 M PBS for 20 min, rinsed in PBS, and permeabilized with 5% fish skin gelatin containing 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min at room temperature. Cells were then incubated for 1 hour with mouse monoclonal antibodies against Myc (1/500; Roche). The cells were then washed and revealed with Alexa 488 conjugated donkey anti-mouse antibodies (1/500; Jackson ImmunoResearch). Cells were stained with DAPI, mounted with Mowiol plus 2% DABCO, and examined using an ApoTome fluorescence microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Digital images were manipulated into figures with CorelDraw.

12. Ruschendorf, F. & Nurnberg, P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics* **21**, 2123-2125 (2005).
13. Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O. & Cardon, L.R. Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* **30**, 97- 101 (2002).
14. Zhou, J. *et al.* Spinal muscular atrophy associated with progressive myoclonic epilepsy is caused by mutations in *ASAH1*. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 5-14 (2012).
15. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-1760 (2009) (a).
16. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079 (2009). (b).
17. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **38**, e164 (2010).

18. Adzhubei, I.A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248-249 (2010).
19. Desmet, F.O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **37**, e67 (2009).

SUPPLEMENTAL DATA

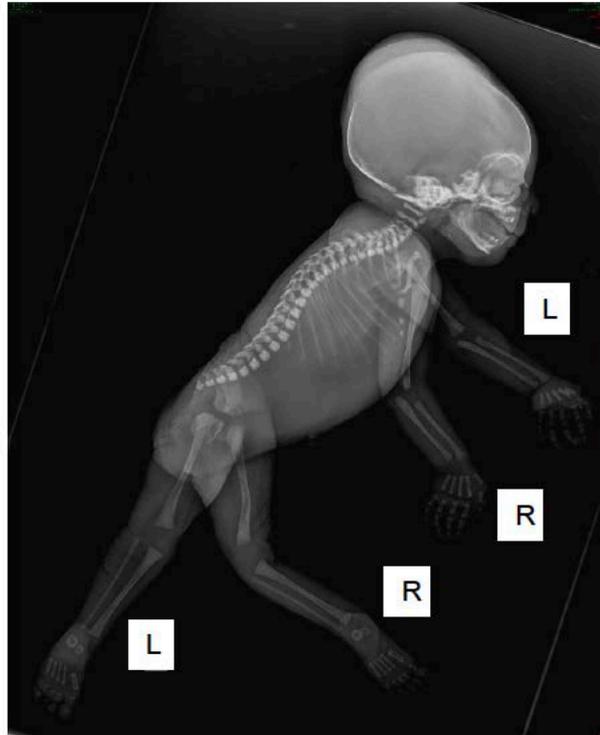


Figure S1: X-ray of affected individual II:1 of family 1 revealed marked extension of lower limbs associated with extension of handles and anomalies of the thoracic spine. L: left; R: right

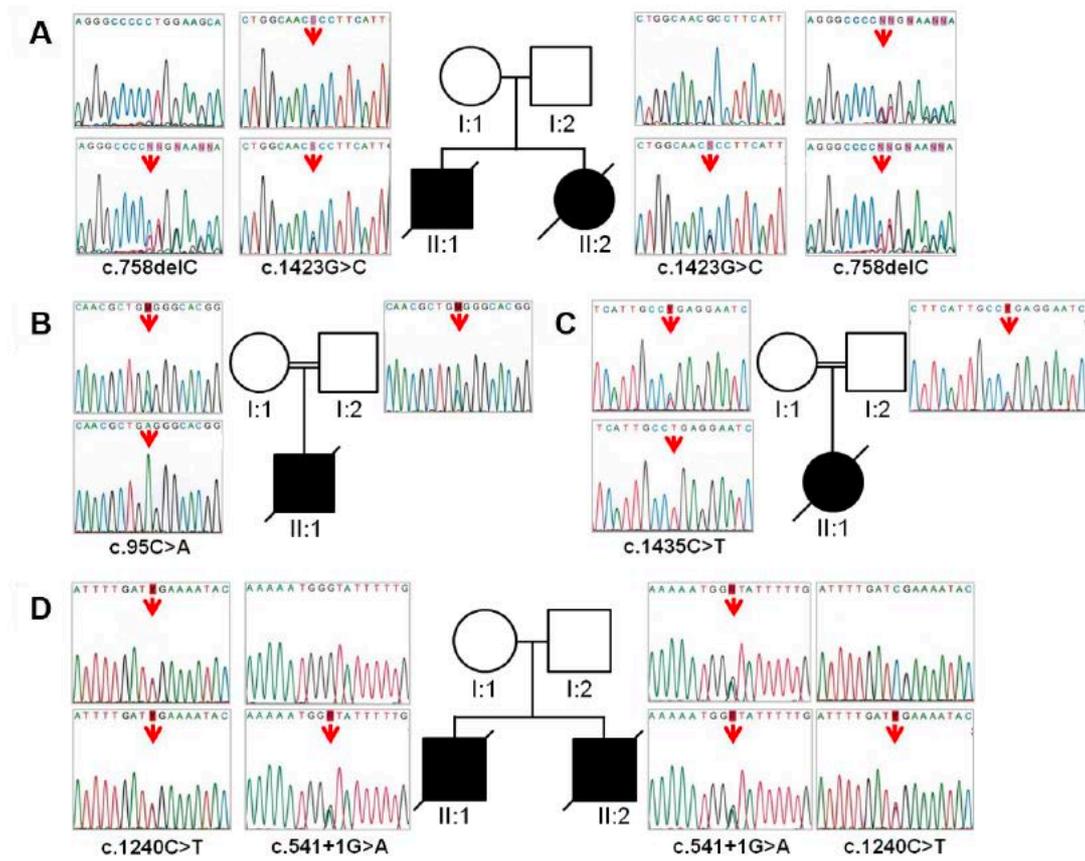


Figure S2: Sanger sequencing of mutations identified in *GLDN* in AMC families. Pedigrees for families 1 (A), 2 (B) and 3 (D) and 4 (C) are shown. Arrows indicate mutant nucleotide positions. The nucleotide changes based on NM_181789.2 reference sequence are indicated. Open symbols: unaffected; filled symbols: affected.

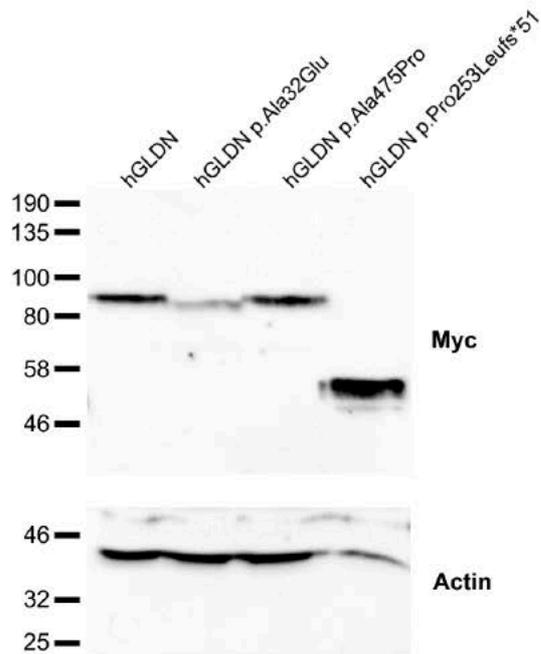


Fig. S3: Protein levels of *GLDN* mutants. Cell lysates were prepared from CHO cells transiently transfected with myc-tagged human WT and mutant gliomedin (hGLDN). Cells were solubilized in 1% Triton X-100, 140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing protease inhibitors (2 mM EDTA, 1 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Aprotinin, and 0.5 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride, Sigma-Aldrich), agitated on ice for 15 min, then centrifuged at 18,900 X g for 30 min. The supernatants were saved and the protein concentrations were determined using the BCA kit (Sigma-Aldrich). 100 μ g (WT, p.Ala32Glu, and p.Ala475Pro) and 25 μ g (p.Pro253Leufs*51) of proteins were denatured in SDS sample buffer for 2 min at 90°C, then separated on 7.5% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked for 1 hour using 5% powdered skim milk in PBS with 0.5% Tween-20 and incubated with a mouse monoclonal antibody Myc (1/1,000; Roche), or a rabbit antiserum against actin as a loading control (1/2,000; Sigma-Aldrich). After several washes, blots were incubated with the appropriate peroxidase-coupled secondary antibodies (1/5,000; Jackson ImmunoResearch) for 1 hour and washed several times. Immunoreactivity was

revealed using the BM chemiluminescence kit (Roche) and visualized on a G:BOX gel imaging and analysis system (Syngene). Protein levels were normal for p.Ala475Pro and decreased for p.Ala32Glu variants. By contrast, the protein level of hGldn bearing the p.Pro253Leufs*51 variant were 10 fold higher than those of WT, and appeared at a lower molecular weight as expected. Molecular weight markers are shown on the left (in kDa).

Table S1. Sequences of Primers

Designation	Primer sequences (5'-3')
1- Detection of <i>GLDN</i> mutation	
<i>Family 1</i>	
GLDN718-F	5'-TGGCCAGGAAACATCCCAAA-3'
GLDN718-R	5'-AGCATTAAATGGCCATCTTCCC-3'.
GLDN736-F	5'-TCCCTCCCCTTTCCTTCCC-3'
GLDN736-R	5'-GGACAAAACCTCCTCCCTC-3'
<i>Family 2</i>	
GldnEx1A-F	5'-GCCACCACTACTGTCCCC-3'
GldnEx1A-R	5'-GCTCAACTCGGCCAGGAA-3'
<i>Family 3</i>	
GldnEx4-F	5'-CTCTGCCATCACCATCCCC-3'
GldnEx4-R	5'-GTGGGACCAAGAAGTATACCCT-3'.
GldnEx10A-F	5'-CTCACAGCATTGCCCAAGG-3'
GldnEx10A-R	5'-ACCCTCATATCTTTGGTGTCTGT-3'.
<i>Family 4</i>	
GldnEx10A-F	5'-CTCACAGCATTGCCCAAGG-3'
GldnEx10A-R	5'-ACCCTCATATCTTTGGTGTCTGT-3'.
2- Long Range RT-PCR amplification of <i>GLDN</i> transcripts	
GLDN-Ex1Fq	5'-CCGCACCACCCCAAGA-3'
GLDN-Ex10Rq	5'-CGTGTTGCACCACTGAGAATGT-3'

Titre : Identification des bases génétiques des malformations anévrysmales de la veine de Galien

Mots clés : Malformation anévrysmale de la veine de Galien, séquençage haut débit, malformations congénitales rares, génétique

Résumé : La malformation anévrysmale de la veine de Galien (MAVG) est une malformation vasculaire cérébrale congénitale qui représente près d'un tiers des anomalies vasculaires pédiatriques. Au sein d'une cohorte de 51 patients atteints d'une MAVG, nous avons identifié 5 individus porteurs de mutations hétérozygotes pathogéniques d'*EPHB4*. Ces mutations incluent une mutation tronquante survenue *de novo* ainsi que des mutations d'épissage et faux-sens hétérozygotes délétères héritées d'un parent. L'inactivation d'*EPHB4* chez les embryons de *Danio rerio* est à l'origine d'anomalies vasculaires cérébrales spécifiques impliquant la veine dorsale longitudinale, la veine orthologue médiane du proencéphale (précurseur embryonnaire de la veine de Galien). La co-injection de l'ARNm

tronqué a permis la restauration d'un phénotype sauvage démontrant que le phénotype vasculaire observé est la conséquence d'une perte de fonction d'*EPHB4*. L'ensemble de ces données indique qu'*EPHB4* est un gène déterminant chez un sous-groupe de patients atteints d'une MAVG, comme chez *Danio rerio*. Les mutations perte de fonction d'*EPHB4* sont à l'origine d'anomalies spécifiques du développement vasculaire cérébral. L'identification de mutations pathogéniques d'*EPHB4* chez des patients présentant des malformations capillaires implique une surveillance attentive de la grossesse. Cette surveillance échographique renforcée pourrait permettre la détection précoce d'une MAVG et une prise en charge anténatale et néonatale optimale.

Title: Towards the identification of genetic basis of vein of Galen aneurysmal malformation

Keywords: Vein of Galen aneurysmal malformation, whole exome sequencing, rare congenital malformations, genetics

Abstract: Vein of Galen aneurysmal malformation (VGAM) is one of the most common fetal brain vascular malformations. We conducted whole exome sequencing in 19 unrelated VGAM patients and subsequently screened candidate gene in a cohort of 32 additional patients. We found 5 affected individuals with heterozygous mutations in *EPHB4* including *de novo* frameshift or inherited deleterious splice or missense mutations predicted to be pathogenic by *in silico* tools. Knockdown of *EPHB4* in zebrafish embryos leads to specific anomalies of dorsal cranial vessels including dorsal longitudinal vein, the ortholog of the median proencephalic vein, the embryonic precursor of the vein of Galen. This model allowed to

demonstrate *EPHB4* loss of function mutations in VGAM by the ability to rescue the brain vascular defect in knockdown zebrafish co-injected with wild type but not truncated *EPHB4* mimicking the frameshift mutation. Our data showed that in both species, loss of function mutations of *EPHB4* result in specific and similar brain vascular development anomalies. The identification of *EPHB4* pathogenic mutation in patients presenting capillary malformation or VGAM should lead to careful follow up of pregnancy of carriers for early detection of VGAM in order to propose optimal neonatal care. Endovascular embolization indeed greatly improved the prognosis of VGAM patients.