



HAL
open science

Aspects physiopathologiques du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire

Tristan Mirault

► **To cite this version:**

Tristan Mirault. Aspects physiopathologiques du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire. Hématologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB128 . tel-01578131

HAL Id: tel-01578131

<https://theses.hal.science/tel-01578131>

Submitted on 28 Aug 2017

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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

ANNEE 2015

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

École doctorale : Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies

Présentée et soutenue publiquement par

Tristan Mirault

Aspects physiopathologiques du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire

Le 06 Novembre 2015

Devant le Jury composé des :

Professeur Françoise Dignat-George

Rapporteur

Docteur Alban Redheuil

Rapporteur

Professeur Mickaël Tanter

Examineur

Professeur Xavier Jeunemaître

Examineur

Professeur Emmanuel Messas

Examineur

Docteur Mathieu Pernot

Invité

Professeur Joseph Emmerich

Directeur de thèse

Remerciements

Au professeur Françoise Dignat-George.

C'est un privilège pour moi de pouvoir présenter les résultats et conclusions de ces années de recherche, à l'experte que vous êtes dans la physiopathologie vasculaire. Je mesure pleinement l'honneur que vous me faites d'être rapporteur de ma thèse et vous remercie d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail, malgré votre emploi du temps chargé comme doyen de la faculté de pharmacie d'Aix-Marseille université.

Au docteur Alban Redheuil.

Tu as bien voulu accepter d'être rapporteur de ma thèse et je t'en remercie. Les publications de tes travaux de recherche en imagerie, ton expertise en rigidité artérielle, ton expérience à l'hôpital européen Georges-Pompidou dans l'imagerie des patients atteints de syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire et nos discussions autour de diagnostics rares à partir d'images encore plus rares à la console d'IRM m'ont convaincu de soumettre ce travail à ton jugement. Tu as immédiatement souscrit à l'idée, j'en ai été flatté et très heureux. Je suis impatient d'échanger avec toi sur de futures collaborations de recherche.

Au professeur Mickaël Tanter.

Je tenais à vous remercier sincèrement pour l'enthousiasme avec lequel vous avez accepté de participer à mon jury de thèse. A chacune de nos rencontres à l'institut Langevin ou à l'hôpital européen Georges-Pompidou, j'ai toujours été frappé par votre gentillesse, votre sympathie et cet enthousiasme dont je viens de parler. Prenant soins de vous informer de l'état d'avancement des expérimentations animales et de leurs résultats, vous m'avez, sans le savoir, encouragé à persévérer dans ma démarche alors que certaines journées étaient désespérantes. Mathieu, Clément et Blandine peuvent en témoigner...

Au professeur Xavier Jeunemaître.

Merci de votre présence dans ce jury. Vous connaissez parfaitement le syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire, et avez pu juger de mon implication auprès de ces patients en clinique. Je suis heureux de pouvoir vous présenter les résultats de mes travaux de recherche menés sur cette pathologie, en lien avec le centre de référence des maladies vasculaires rares que vous dirigez. Bientôt l'aménagement de mon planning hospitalier me permettra d'être régulièrement présent au sein de votre unité INSERM et je m'en réjouis. Il me tarde de retrouver les pipettes, les Falcon, et les plaques 96 puits...!

Au professeur Emmanuel Messas.

Cher Emmanuel. Je tiens à exprimer dans ces remerciements toute ma gratitude à ton égard. En effet, Emmanuel, tu es, et a été pour cette thèse notamment, un véritable catalyseur. Je m'explique. A la définition "substance qui augmente la vitesse d'une réaction chimique sans paraître participer à cette réaction", je lui préfère "élément qui provoque une réaction par sa seule présence ou par son intervention". Par ton intermédiaire, les portes de l'institut Langevin se sont ouvertes sur le syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire, et m'ont permis d'appliquer une technologie innovante dans cette pathologie.

Au docteur Mathieu Pernot.

Un grand merci à toi pour ton implication dans ces projets de recherche. Tu as consacré des jours entiers pour ces différents projets autour de l'Ultrafast chez l'homme et chez les souris. Tu ne pouvais être absent de ce jury de thèse. Nous allons poursuivre cette thématique avec l'aide de Guillaume qui va pouvoir développer encore les applications vasculaires de l'Ultrafast et réemployer le modèle animal que nous avons mis au point. J'ai hâte de reprendre les expérimentations à tes côtés. Encore merci pour ton aide si précieuse et tes corrections attentives.

Au professeur Joseph Emmerich.

Ô combien crucial est le rôle du directeur de thèse. Vous m'avez mis le pied à l'étrier en m'accueillant tout d'abord comme étudiant de Master dans votre unité INSERM puis comme chef de clinique dans votre service. J'ai fait mes premières armes à la paillasse à générer des caillots et révéler beaucoup de western-blots. Puis mon activité clinique a plutôt consisté à dissoudre des caillots et enfiler parfois des vestes au bloc. Au cours de ma thèse, vous avez su être disponible aux moments cruciaux, orienter les recherches vers une voie plus productive, et diriger efficacement l'avancée des travaux même à distance. Mais surtout vous avez éveillé en moi cette attirance pour la recherche fondamentale, le travail à la paillasse, sur des questionnements bien en amont de ceux que nous sommes amenés à résoudre au lit du patient, et mon année à UCSF n'a fait qu'attiser cette flamme. Vous m'avez transmis le goût de l'expérimentation, parfois aventureuse, de l'innovation, de l'équilibre instable générateur de tension créatrice. J'ai la plus profonde reconnaissance pour votre esprit libre et affranchi. Je vous adresse mes plus sincères remerciements au soutien que vous avez su témoigner pour mes engagements professionnels et personnels.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe INSERM U765 dirigée par Joseph Emmerich, Catherine Boisson-Vidal et Pascale Gaussem successivement, pour les bons moments passés en votre compagnie, pour nos échanges scientifiques et humains. Je remercie tout particulièrement Blandine pour ton implication dans ce travail, ta dextérité, ton adaptation aux emplois du temps changeant, aux conditions de travail parfois inconfortables, aux difficultés expérimentales. Tu m'as beaucoup appris, et ce fut un très grand plaisir de travailler à tes côtés et de partager ces moments complices. Je tiens enfin à souligner l'implication de Catherine tout au long de ces années de thèse. De ton aide, ton soutien, tes relances, tes corrections, tes conseils, ... je te suis grandement redevable, alors un très grand merci.

Je profite de ce chapitre pour saluer les membres de l'institut Langevin pour votre accueil chaleureux, votre intérêt envers des biologistes égarés dans cette tribu de physiciens acoustiques ! Un grand merci à Clément pour ton assistance lors des expérimentations, ta patience et ton acharnement à disséquer des données pas toujours évidentes à acquérir chez des souris de 30 grammes!

Special thanks to Bob and his team, Yien, Sunny, Ianai and Cher qui m'ont accueilli bras ouverts et permis de réaliser des expérimentations originales à l'université Californie de San Francisco, et à Amanda du Gladstone Institute, la meilleure étudiante en droit que je connaisse capable de passer des cultures cellulaires d'IPS, aux TALENs faits maison, en passant par des protocoles de ddPCR expérimentaux que même BioRad récupèrent! et ce toujours avec le sourire et une patience infinie pour l'apprenti que j'étais.

Merci à mes consœurs et confrères hospitaliers. Le laboratoire, l'hôpital, ... deux univers qui ont malheureusement beaucoup de mal à se comprendre. Élégamment, Emmanuel, Marc, Audrey, Aude, Valentine, vous avez assumé mes tâches durant mes absences. Toute ma reconnaissance car sans vous, cette thèse n'aurait jamais abouti.

Enfin, je remercie de tout cœur ma famille, Antoine, ma mère, mes frères, Jérôme et Stéphanie, Martine, Philippe pour m'avoir toujours encouragé et soutenu tout au long de ces années. Je vous embrasse comme je vous aime.

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

BBEST : Beta-Blockers in Ehlers-Danlos syndrome Treatment

CML : cellules musculaires lisses

ddPCR: digital droplet polymerase chain reaction

FACIT : fibril-associated collagens with interrupted triple-helices (collagènes localisés à la surface des fibrilles avec des triples hélices fragmentées)

HEK293T cells: Human Embryonic Kidney 293T cells (cellules rénales embryonnaires) SV40 large T

GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

Cellules iPS: induced pluripotent stem cells (cellules souches pluripotentes induites)

IRM : imagerie par résonance magnétique

KO : knock-out

KI: knock-in

MEC : matrice extracellulaire

MMP: matrix metalloproteinase (métalloprotéinase de la matrice)

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man

rtPCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SED : syndrome d'Ehlers-Danlos

SEDv : syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire

siRNA: small interfering ribonucleic acid : petit ARN interférent

TALENs: transcription activator-like effector nucleases (nucléases effectrices de transcription de type activateur)

UCSF: university California San Francisco

VOP : vitesse de l'onde de pouls

WTC11 : wild type cells 11 : cellules iPS issues d'un témoin sain

Liste des tableaux

<i>Tableau 1-1: Quelques exemples de pathologies liées à l'anomalie d'un collagène.....</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 2-1 : Classification des syndromes d'Ehlers-Danlos (SED) selon la classification de Villefranche-sur-Mer 1997 (Beighton et al. 1998) rappel de l'ancienne classification de Berlin 1986 (Beighton et al. 1988) mode de transmission : autosomique dominant (AD), autosomique récessif (AR), récessif lié à l'X (XR) et anomalie moléculaire retrouvée à l'époque avec les gènes correspondants.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 2-2 Critères diagnostiques du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire. D'après la classification de Villefranche-sur-Mer(Beighton et al. 1998).....</i>	<i>30</i>
<i>Tableau 2-3: Répartition des atteintes artérielles au cours du SEDv d'après trois grandes séries de la littérature.....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 2-4: Caractéristiques cliniques des grandes séries rapportées dans la littérature, de patients atteints de SEDv. L'âge est exprimé en médiane (25ème-75ème percentiles).....</i>	<i>47</i>
<i>Tableau 3-1: Caractéristiques cliniques des patients atteints de SEDv en fonction du type d'altération génique COL3A1. Gly substit. : substitution d'une glycine du domaine de la triple hélice pour un autre acide aminé ; Splice/Ins/Del : mutation du site d'épissage, insertion, délétion ; Haploinsuf. : haploinsuffisance ; MIN : toute altération génique responsable d'une production mineure de la protéine collagène type III en opposition à l'haploinsuffisance (Shalhub et al. 2014); non-Gly substit. : substitution au sein du domaine de la triple hélice affectant un autre acide aminé qu'une glycine; extrémités C/ N : altérations géniques des domaines N et C terminaux. L'âge est exprimé en médiane (25ème-75ème percentiles).....</i>	<i>98</i>

Liste des figures

- Figure 1-1: Hélice de collagène. Cette hélice est de pas gauche (elle tourne en montant dans le sens des aiguilles d'une montre). Tous les 3 acides aminés revient une glycine; les autres résidus X sont le plus souvent une proline ou une hydroxyproline. L'hélice de collagène s'élève de 0,29 nm par résidu et elle compte un peu moins de trois résidus par tour. In <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/3f.html> _____ 18*
- Figure 1-2: Formation du tropocollagène à partir de 3 chaînes α . In <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/3f.html> _____ 19*
- Figure 1-3: Organisation structurale des différents types de collagène. In (Ricard-Blum 2011) _____ 21*
- Figure 1-4: Collagène fibrillaire. A) arrangements réguliers et continus des collagènes, formant des chevauchements à leurs extrémités N et C-terminales. B) visualisation en microscopie électronique. Echelle: 100nm. D'après (Garrone 1986) _____ 22*
- Figure 1-5: De la formation des protocollagènes à partir des trimères d'hélices alpha, à la formation des fibrilles puis des fibres. D'après (Garrone 1986) _____ 23*
- Figure 2-1 Score de Beighton. Figure d'après (Steinmann et al. 2003) _____ 25*
- Figure 2-2: Caractéristiques cutanées : A (<http://www.tadcoalition.org/tad/4771/Josh>) & B (in (Nuytinck et al. 1992): morphotype facial ; C: transparence cutanée; D : acrogérie; E & F !n (Germain 2002) : cicatrices papyracées; G : hypolobulation de l'oreille. _____ 36*
- Figure 2-3: Tomodensitométrie thoracique mettant en évidence des bulles: sous-pleurale (supra), intra-parenchymateuse (infra) chez un homme de 17 ans atteint de SEDv _____ 38*
- Figure 2-4: Complications artérielles du SEDV. A: rupture de l'artère sous-clavière droite. B: faux anévrisme de l'artère iliaque primitive droite. C: dissection de l'artère iliaque externe droite et anévrisme de l'artère iliaque primitive gauche. D: anévrisme de l'artère splénique. E: rupture de l'artère hépatique gauche. F: embolisation de la rupture de l'artère hépatique gauche présentée en E. G: dissection de l'aorte abdominale et l'artère rénale gauche. H: 6 mois après la dissection présentée en G, artère rénale disséquée, atrophie rénale gauche. _____ 39*
- Figure 2-5: Complications artérielles cérébrales dans le SEDv. A : dissection de l'artère vertébrale droite à son entrée dans la boîte crânienne. B : Fistule carotido-caverneuse droite. C : compliquée d'un saignement intraparenchymateux secondaire à l'hyperpression veineuse du sinus latéral droit. _____ 40*
- Figure 2-6 Résumé des étapes de synthèse du collagène de type III par les fibroblastes. Les chaînes de procollagène sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Trois chaînes s'enroulent sur elles-mêmes pour former une triple hélice, à partir de leurs extrémités C-terminales. Dans le réticulum endoplasmique ont lieu toutes les modifications post-traductionnelles non représentées ici. Après le transport dans l'appareil de Golgi, et une fois sécrété en dehors de la cellule, le procollagène de type III voit ses extrémités N- et C-terminales clivées et le collagène ainsi formé, s'assemble avec le collagène de type I pour former des fibrilles consolidées par des liaisons covalentes entre les fibres. D'après (Canty and Kadler 2005) _____ 48*

Figure 2-7: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide sodium dodécyl sulfate, des collagènes et procollagènes des cellules d'un patient atteint de SEDv (P: péritoine, V: vein, S: skin: peau, A: artère) et de cellules de peau d'un sujet contrôle (C: contrôle). D'après (Nuytinck et al. 1992) A: séparation des collagènes non réduits, traités par pepsine. La bande $\alpha 1(\text{III})$ trimère est moins intense, surtout dans la peau du patient SEDv que la bande contrôle. B: Après lente réduction, les chaînes $\alpha 1(\text{III})$ migrent comme monomères. Tous les tissus du patients SEDv donnent un aspect de double bande $\alpha 1(\text{III})$ et $\alpha'1(\text{III})$ alors que le témoin ne donne qu'une seule entité. C: Séparation des procollagènes sécrétés dans le milieu par les cellules du patient SEDv montrant toujours les deux bandes $\alpha 1(\text{III})$ et $\alpha'1(\text{III})$ alors que le témoin ne donne qu'une seule entité. Le procollagène (I) est comparable entre le patient SEDv et le contrôle. _____ 52

Figure 2-8: Imagerie en microscopie électronique de fibres de collagène d'une biopsie de peau d'un témoin (a) et d'un patient atteint de SEDv (b). L'échelle représente $10\mu\text{M}$. in (Smith et al. 1997) _____ 53

Figure 2-9: Carte de soins et d'urgence éditée par la direction générale de la santé et gestes à risque de complication au cours du SEDv. D'après (Frank 2009; Messas et al. 2009). _____ 54

Figure 2-10: Courbe de survie chez 33 patients SEDv moléculairement prouvés, avec ou sans Celiprolol (A) sans évènement cardiaque ou artériel (dissection ou rupture) ; (B) sans évènement digestif (rupture), utérin (rupture) ou tout évènement relié au SEDv. In (Ong et al. 2010) _____ 56

Figure 2-11: Hématome au point de ponction fémorale d'une artériographie chez une patiente atteinte de SEDv _____ 58

Figure 2-12 : Principe de la formation d'une image en imagerie ultrasonore classique (ici en échocardiographie). Une première onde est focalisée le long d'une ligne du milieu en ajustant la loi de retard à l'émission. Les signaux rétrodiffusés permettent de reconstruire une ligne de l'image en appliquant une focalisation dynamique en réception. Ensuite, une deuxième onde est focalisée sur la ligne à côté. De la même manière, les signaux rétrodiffusés permettent de reconstruire la ligne de l'image en appliquant une focalisation dynamique en réception. En balayant le faisceau sur une centaine de lignes, une image complète est reconstruite. _____ 70

Figure 2-13 : Principe de la sommation cohérente d'ondes planes. Le milieu est imagé avec des ondes planes angulées, l'image reconstruite par chacune des ondes planes est une image de basse qualité. La sommation cohérente de ces images, crée une tache focale synthétique partout dans l'image et permet de reconstruire une image de haute qualité. _____ 72

Figure 5-1 Relations entre les dimensions de l'artère, les contraintes et les paramètres physiologiques. Les dimensions sont le rayon interne (r_i) la longueur (l), l'épaisseur (t). Les contraintes sont la contrainte de cisaillement pariétal, (τ_w), la contrainte longitudinale (σ_z), et la contrainte circonférentielle (σ_θ). Les paramètres physiologiques sont le débit sanguin (Q), les forces d'étirement longitudinal [$F(l)$], et la pression artérielle (P). La viscosité du sang (μ) intervient dans l'équation de la contrainte de cisaillement pariétal. D'après (Wagenseil and Mecham 2009) _____ 112

Figure 5-2: Relation Tension (T) (ou force) – Longueur (L) de fibres d'élastine (relation linéaire à allongement long), de fibres de collagène (relation linéaire à allongement court) et relation telle qu'observée dans la paroi artérielle: comportement non linéaire. D'après (Burton 1954) _____ 114

Figure 6-1: Principe de liaison spécifique à l'ADN génomique des TALENs (transcription activator-like effector nucleases) et clivage ADN au site spécifique de la région d'intérêt par des endonucléases (FokI). (d'après http://www.bulldog-bio.com/newsletters/NEPA21_CRSPR_barker.html/) _____ 118

Figure 6-2: Différentes approches de production de lignées isogéniques de cellules iPS, et leur utilisation pour une meilleure compréhension physiopathologique grâce à leur capacités à être dérivées vers tous les types de tissus. D'après (Musunuru 2013) _____ 119

Figure 6-3: Test Surveyor afin de s'assurer que la paire de TALENs transfectée effectue la césure ADN dans la région d'intérêt la colonne PHOX2B sert de contrôle positif pour la technique. Il s'agit de la paire de TALENs spécifique d'une région du gène PHOX2B. COL3A1 HomoD est la paire de TALENs homodimérique construite pour cibler la région d'intérêt dans l'exon 6 du gène COL3A1. COL3A1 HétéroD est la paire de TALENs hétérodimérique construite pour cibler la région d'intérêt dans l'exon 6 du gène COL3A1. Ex6FWD et Ex7REV sont un couple d'amorces encadrant l'exon 6 de COL3A1 (amplicon de 704 paires de base (bp)), de même #1FWD et #3REV sont un couple d'amorces encadrant la région d'intérêt dans l'exon 6 (146 bp). _____ 122

Figure 6-4: Sélection de la paire d'amorces et de la température d'hybridation les plus adaptées afin d'obtenir les signaux des sondes TaqMan sauvage-6-FAM et mutée-VIC les plus intenses. _____ 124

Figure 6-5: Résultats de la quantification de l'allèle sauvage et de l'allèle mute en digital droplet PCR (ddPCR) _____ 124

Figure 6-6: Détermination du succès de l'édition génomique de cellules iPS par ddPCR. Les points verts correspondant au signal de la sonde VIC, spécifique de la séquence de l'exon 6 du gène COL3A1 avec la mutation générée par la transfection de la paire de TALENs (ici hétérodimérique) couplés à une séquence ADN porteuse de la mutation (séquence forward). Chaque point correspond au résultat de la PCR au sein d'une gouttelette lipidique comportant l'ADN génomique d'une à trois cellules. Ainsi l'abondance de cellules iPS porteuses de la mutation dans les puits de culture s'élève en moyenne à 0,2%. _____ 126

Figure 6-7: Progression au cours des différents passages (round 1 à 5) de l'enrichissement en cellules iPS exprimant la mutation du gène COL3A1. _____ 127

Figure 6-8: Progression au cours des différents passages (SS=sib selection 1 à 3) de l'enrichissement en cellules iPS après transfection de paires de TALENs avec ADN donneur (MUT). Résultats d'éditions génomiques de plusieurs gènes et différentes mutations. _____ 129

Figure 6-9: Expression de l'ARN messager (ARNm) de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de chaîne alpha1 de procollagène de type III (COL3A1) après extraction de l'ARN total de 3 cultures de cellules iPS. _____ 130

Résumé

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (SEDv) est une maladie artérielle génétique autosomique dominante, affectant le collagène de type III au sein de la matrice extracellulaire de la paroi artérielle notamment. Les patients atteints de SEDv ont une prédisposition aux ruptures artérielles, digestives et utérines qui font toute la sévérité de cette maladie. Les mutations du gène COL3A1 codant pour le collagène de type III sont le plus souvent des mutations hétérozygotes faux-sens, responsables de la substitution d'une glycine par un autre acide aminé, affectant la structure en triple hélice du collagène de type III. Des variants d'un site d'épissage, des insertions-délétions sont également rencontrées, et plus rarement des mutations faux-sens n'affectant pas une glycine, ou des mutations responsables d'haploinsuffisance.

Les mutations du COL3A1 sont presque exclusivement privées, et une corrélation entre le phénotype observé et les mutations retrouvées n'a jamais été mise en évidence. Nous avons rapporté l'expérience du centre de référence français du SEDv sur 215 patients, et retrouvé une sévérité de la maladie plus importante chez ceux avec une substitution glycine, ou une insertion/délétion du cadre de lecture dans région de la triple hélice comparativement aux autres génotypes: variants responsables d'haploinsuffisance, variants faux-sens n'affectant pas une glycine, ou les altérations des extrémités N ou C-terminales. Par ailleurs, le phénotype de ces 3 derniers groupes de génotype ne rassemblait pas l'ensemble des symptômes habituellement décrits dans le SEDv et notamment pas de complication digestive.

Afin de mieux comprendre l'altération des propriétés biomécaniques de la paroi artérielle des patients atteints de SEDv nous avons utilisé une nouvelle technologie ultrasonore, ultrafastécho, permettant de visualiser et mesurer la vitesse de l'onde de pouls (VOP) localement au niveau carotidien et tout au long du cycle cardiaque. La VOP est un marqueur de rigidité artérielle bien étudié dans l'athérosclérose, et connu pour être un facteur indépendant de mortalité cardiovasculaire. Nous avons établi des valeurs normales des paramètres de l'ultrafastécho chez 102 volontaires sains et analysés 37 patients avec SEDv. Cette étude n'a pas retrouvé de différence de la VOP, donc de rigidité artérielle, en début de systole. En revanche, au cours du cycle cardiaque on a pu observer une moindre rigidification de la paroi artérielle avec l'augmentation de la pression artérielle chez les patients SEDv.

Nous avons poursuivi nos explorations par ultrafastécho sur un modèle murin haploinsuffisant pour le collagène de type III (souris Col3a1 hétérozygote) et retrouvé le même profil de réponse. En effet une moindre augmentation de la rigidité artérielle alors que la pression artérielle était augmentée par perfusion de vasopresseur était constatée chez les souris col3a1 hétérozygotes comparativement aux souris sauvages.

En conclusion, l'altération du collagène de type III dans le SEDv affecte les propriétés biomécaniques de la paroi artérielle des patients, avec notamment une moindre rigidification lors de l'augmentation de la pression artérielle. Nos travaux ont permis d'affiner la physiopathologie du SEDv, de préciser le phénotype vasculaire par une nouvelle mesure de la VOP et ouvrent des pistes de recherche thérapeutiques d'un traitement augmentant la rigidité artérielle afin de tenter de réduire les risques de ruptures artérielles.

Abstract

Vascular Ehlers-Danlos syndrome (vEDS) is an autosomal dominant genetic vascular disease, affecting the collagen type III, a component in the extracellular matrix of the arterial wall. Patients with vEDS are prone to arterial, intestine or uterine ruptures, which explain the severity of the disease. Mutations in COL3A1, gene encoding for collagen type III are usually heterozygous missense mutations responsible for the substitution of a glycine amino acid for another, which affects the triple helical conformational structure of the collagen type III. Variants of a splice site, deletions/insertions, are also encountered, and more rarely missense mutations not affecting a glycine residue, or alterations responsible for haploinsufficiency.

The COL3A1 mutations are almost exclusively private, and a genotype/phenotype correlation has not been clearly studied. We reported the experience of the French reference center for vEDS of 215 patients and found a greater severity of the disease in those with a glycine substitution, or in frame insertion / deletion within the triple helix domain than in other genotypes: responsible variants of haploinsufficiency, missense variants not affecting glycine, or alteration of the N- or C-terminal ends. Furthermore, the phenotype of these last three genotype groups did not combine the complete phenotype described in vEDS especially no gastrointestinal complication.

To better understand the alteration of the biomechanical properties of the arterial wall of patients with vEDS we used a new ultrasound technology, ultrafastecho, to visualize and measure the pulse wave velocity (PWV) locally on carotids, over the cardiac cycle. The PWV is a marker of arterial stiffness studied in atherosclerosis, and well known to be an independent risk factor for cardiovascular mortality. We have established normal values ultrafastecho parameters in 102 healthy volunteers and 37 patients with vEDS. This study found no difference in PWV, thus arterial stiffness, in early systole cardiac at diastolic blood pressure. However, in patients with vEDS, weaker stiffening of the arterial wall was observed when blood pressure increases during the cardiac cycle.

We continued our explorations by ultrafastecho on a mouse model of vEDS, haploinsufficient for the collagen type III (Col3a1 heterozygous mice). We figured out that Col3a1 heterozygous mice presented the same response profile. Indeed a smaller increase in arterial stiffness while blood pressure was increasing secondary to vasopressor infusion was revealed in the mice compared to the wild mice.

In conclusion, alterations of collagen type III in the vEDS affect the biomechanical properties of the arterial wall of the patient, through lower stiffening during the increase of blood pressure over the cardiac cycle. This provides a therapeutic approach for targeting treatment increasing arterial stiffness in vEDS in order to reduce the risk of arterial rupture.

Table des matières

INTRODUCTION	13
<u>1 LES COLLAGENES</u>	16
1.1 DIVERSITE AU SEIN DE LA SUPERFAMILLE DES COLLAGENES	16
1.2 LA TRIPLE HELICE	17
1.3 LES DIFFERENTS CLASSES DE COLLAGENES	20
1.4 LES COLLAGENES FIBRILLAIRES	22
1.5 MALADIES ASSOCIEES A DES ATTEINTES D'UN COLLAGENE	24
<u>2 SYNDROME D'EHLERS-DANLOS VASCULAIRE</u>	25
2.1 LES SYNDROMES D'EHLERS-DANLOS	25
2.2 HISTORIQUE	27
2.3 CLASSIFICATION DES SYNDROMES D'EHLERS-DANLOS	28
2.4 SYNDROME D'EHLERS-DANLOS DE TYPE VASCULAIRE, CRITERES DE VILLEFRANCE-SUR-MER (1997)	29
2.5 CARACTERISTIQUES DU SEDV	32
2.5.1 ÉPIDEMIOLOGIE	32
2.5.2 CLINIQUE ET SYMPTOMES	34
2.5.3 ASPECTS MOLECULAIRES	48
2.5.4 TRAITEMENTS	54
<u>3 PROPRIETES ELASTIQUES DE LA PAROI ARTERIELLE PAR L'ETUDE LA VITESSE DE L'ONDE DE POULS</u>	61
3.1 VOP ET RIGIDITE ARTERIELLE	62
3.2 MESURE DE LA VOP REGIONALE	63
3.3 ÉVALUATION DE LA RIGIDITE ARTERIELLE LOCALE EN IMAGERIE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE	65
3.4 ÉVALUATION DE LA RIGIDITE ARTERIELLE LOCALE PAR INTENSITE D'ONDE	66
3.5 ÉVALUATION DE LA RIGIDITE ARTERIELLE LOCALE PAR ECHOTRACKING.	66
3.6 ÉVALUATION DE LA VOP LOCALE PAR ECHOGRAPHIE ULTRARAPIDE	70
3.7 PERSPECTIVES	73
<u>4 OBJECTIF GENERAL DE LA THESE</u>	74
<u>5 ARTICLE 1 PUBLIE : ASSOCIATION DES VARIANTS DU GENE COL3A1 AVEC LE PHENOTYPE ET LA SEVERITE DU SYNDROME D'EHLERS-DANLOS VASCULAIRE.</u>	76
5.1 OBJECTIFS DU TRAVAIL	76
5.2 ARTICLE	77
5.3 DISCUSSION	94

6 ARTICLE 2 PUBLIE : MODIFICATION DE LA RIGIDITE CAROTIDIENNE AU COURS DU CYCLE CARDIAQUE PAR ULTRAFASTECHO CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN ET DANS LE SYNDROME D'EHLERS-DANLOS VASCULAIRE. **99**

6.1	OBJECTIFS DU TRAVAIL	99
6.1.1	OBJECTIF PRINCIPAL	100
6.1.2	OBJECTIFS SECONDAIRES	100
6.1.3	TYPE D'ETUDE - PLAN EXPERIMENTAL	100
6.2	ARTICLE	100
6.3	DISCUSSION	107

7 ARTICLE 3 SOUMIS : ULTRAFASTECHO OFFRE UN NOUVEL APERÇU DU PHENOTYPE VASCULAIRE DES SOURIS HAPLOINSUFFISANTES POUR LE COLLAGENE DE TYPE III. **111**

7.1	OBJECTIFS DE TRAVAIL	111
7.2	ARTICLE	112
7.3	DISCUSSION	113

8 TRAVAUX : MODELE PRE-CLINIQUE DE SEDV PAR LIGNEES ISOGENIQUES HUMAINES DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES **117**

8.1	OBJECTIFS DE TRAVAIL	117
8.2	ETAPES	120
8.2.1	ÉTAPE 1: SEQUENÇAGE GENOMIQUE ADN DES LIGNEES DE TRAVAIL	120
8.2.2	ÉTAPE 2: CONCEPTION DES TALENS, CONSTRUCTION ET SEQUENÇAGE	120
8.2.3	ÉTAPE 3: VALIDATION DE L'EFFICACITE DES TALENS	121
8.2.4	ÉTAPE 4: CONSTRUCTION DES PLASMIDES CONTROLES POUR LA DDPCR	123
8.2.5	ÉTAPE 5: QUANTIFICATION DES VARIANTS GENETIQUES RARES A L'AIDE DE LA DDPCR (BIORAD®)	123
8.2.6	ÉTAPE 6: TRANSFECTION DES CELLULES IPS AVEC LES PAIRES DE TALENS ET L'ADN DONNEUR	125
8.2.7	ÉTAPE 7: CULTURE ET ENRICHISSEMENT DES CELLULES IPS PORTEUSES DE LA MUTATION	126
8.3	DISCUSSION	128

9 CONCLUSIONS **133**

10 REFERENCES **136**

Introduction

La structure et la fonction des vaisseaux sanguins du système circulatoire pulsatile des vertébrés, ont présenté des modifications adaptatrices avec l'émergence d'un régime à haute pression. Les vaisseaux sanguins ne sont pas de simples tubes dont la seule fonction serait de canaliser le sang de la pompe cardiaque. Dans ce système circulatoire fermé, les artères, notamment celles de gros calibre, sont un élément important de la physiologie cardiovasculaire en servant de réservoirs élastiques, permettant d'absorber d'importants changements de volume, sans grand changement de pression. Sans vaisseaux élastiques, le pic de pression engendré par le sang éjecté des ventricules empêcherait ces derniers de remplir leur rôle de pompe intermittente (par augmentation de la post-charge). Dans un second temps, la chute de la pression dans des vaisseaux inélastiques serait si rapide et profonde que le cœur ne pourrait plus se remplir (par diminution de la pré-charge). Ainsi l'élasticité de la paroi artérielle confère à celle-ci une capacité de tampon. Cette énergie mécanique stockée lors de la distension de la paroi artérielle lorsque le sang est poussé par le cœur en systole est restituée sous forme d'énergie cinétique lorsque la paroi artérielle se contracte, permettant de déplacer la colonne de sang plus en aval. Le changement qui a conduit à cette étape critique dans l'évolution des organismes supérieurs a été l'émergence d'une paroi vasculaire contenant des cellules spécialisées dans la production et l'organisation d'une matrice extracellulaire (MEC) conférant à l'artère ses propriétés élastiques.

La paroi des artères de gros calibre comprend trois compartiments histologiques:

- l'intima, constituée d'une monocouche de cellules endothéliales accolées les unes aux autres et reposant sur la limitante élastique interne;
- la média, située entre la limitante élastique interne et la limitante élastique externe, est constituée de couches concentriques de cellules musculaires lisses enchâssées dans des feuillets d'élastine (les lames élastiques) de la MEC;

- l'adventice, située à la périphérie de la limitante élastique externe, est composée de fibroblastes qui produisent les protéines de la MEC et principalement les fibres de collagène.

Au sein de la média, les fibres de collagène et d'élastine sont agencées pour former un système biphasique. Les fibres de collagène se déforment peu et ont une résistance élevée. Elles supportent la majeure partie de la force au-dessus de la pression artérielle physiologique empêchant la paroi du vaisseau de rompre. L'élastine est extensible et a une faible résistance à la traction. Elle fonctionne principalement comme un réservoir élastique et répartie la force uniformément tout au long de la paroi et sur les fibres de collagène (Berry and Greenwald 1976; Wolinsky and Glagov 1964). Le nombre d'unités lamellaires (la lame élastique et les cellules musculaires lisses adjacentes) dans un segment vasculaire est corrélé aux forces de pression qui s'exercent contre la paroi, avec le plus grand nombre d'unités lamellaires dans la paroi des vaisseaux les plus proches du cœur, et de plus grand calibre, c'est à dire ceux qui subissent un stress de la paroi le plus élevé (Wolinsky and Glagov 1967). Par ailleurs, la tension relativement constante par unité lamellaire et l'uniformité de leur composition, parmi de nombreuses espèces de mammifère, indiquent que la proportion de collagène, d'élastine, et de cellules musculaires lisses dans la média est optimale pour les sollicitations auxquelles l'aorte est soumise (Wolinsky and Glagov 1967).

Ainsi, toute altération des propriétés des protéines de la MEC est susceptible d'engendrer une altération des propriétés biomécaniques de la paroi artérielle et une fragilité artérielle se manifestant chez l'homme sous forme de dilatation (anévrisme), de clivage de la paroi (dissection), de rétrécissement (sténose) ou de rupture artérielle.

Plusieurs protéines composent les lames élastiques, la majoritaire étant l'élastine, un polymère de chaînes de tropoélastines. Des mutations du gène ELN codant pour la tropoélastine sont responsables de 3 syndromes cliniques chez l'homme : la sténose aortique supra-avalvulaire (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) #185500), le syndrome de Williams et Beuren (OMIM #194050) associant

une sténose aortique supravalvulaire, un retard mental et des traits faciaux caractéristiques dits « elfiques », et le cutis laxa autosomique dominant (OMIM #123700). D'autres protéines composent les lames élastiques, formant des microfibrilles, avec notamment des protéines associées aux microfibrilles : les protéines liées au tumor growth factor bêta (TGF β): LTBP1–4 ; les glycoprotéines liées aux microfibrilles (MAGP-1 et MAGP-2), la famille des fibulines 1–5, et les fibrillines 1 et 2, dont les mutations de leur gènes sont responsables du syndrome de Marfan (OMIM #154700) associant anévrisme et dissection de l'aorte, subluxation du cristallin, troubles musculo-squelettiques et arachnodactylie.

Les fibres de collagène sont ubiquitaires dans le corps humain et plus de 20 collagènes différents sont répertoriés parmi les protéines des MEC. Les collagènes majoritaires de la paroi vasculaire sont les collagènes de type I ; III et IV. Les mutations des gènes codant pour le collagène de type I s'expriment sous forme de troubles musculo-squelettiques et non vasculaires : c'est le cas de l'ostéogénèse imparfaite (OMIM#166200 ;166210 ;166220 ;259420) et du syndrome d'Ehlers–Danlos arthrocholasique (ancien type VIIA et VIIB) (OMIM#130060) associant : hyperlaxité articulaire, et dysplasie congénitale de hanche. Les mutations du gène COL3A1 codant pour le collagène de type III sont responsables en revanche d'une maladie vasculaire grave et bruyante, le syndrome de d'Ehlers–Danlos vasculaire (SEDv) (ancien type IV) (OMIM#130050).

Bien que d'autres collagènes soient présents dans la paroi artérielle (type IV, V, VI) l'objet de cette thèse restera focalisé sur le collagène de type III et les conséquences du gène COL3A1.

1 Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères représentant 25 à 30% de la masse protéique. La superfamille des collagènes comporte 28 types de collagène numérotés en chiffres romains de I à XXVIII. La caractéristique commune des collagènes est la structure en triple hélice qui peut représenter 10% (collagène de type XII) à 96% (collagène de type I) de la protéine. D'autres protéines possèdent un domaine en triple hélice sans appartenir à la superfamille des collagènes. C'est le cas de la fraction C1q du complément, de la Mannose-binding protein C, des ficolines 1, 2 et 3, des protéines A1, A2 et D associées au surfactant pulmonaire, de la gliomédine, des émilines 1 et 2 entre autres.

1.1 Diversité au sein de la superfamille des collagènes

Les collagènes sont formés de 3 chaînes polypeptidiques appelées chaînes alpha (α) et numérotées en chiffres arabes. Ainsi aux 28 différents types de collagène s'ajoute un niveau de complexité avec la possibilité d'isoformes pour un même type de collagène (collagène de type IV ou VI par exemple), ou isoformes hybrides par la combinaison de 2 types de collagène (type V et type XI par exemple). Par exemple, le collagène de type XI est habituellement composé de 3 chaînes α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) assemblées sous forme d'hétérotrimère. Mais dans le vitrée (Mayne et al. 1993) et le cartilage (Wu et al. 2009), des chaînes α (XI) s'assemblent à la chaîne $\alpha 1$ (V) pour former un collagène hybride V/XI. La diversité s'accroît encore par la possibilité de former différentes isoformes par la présence de promoteurs alternatifs (chaînes $\alpha 1$ (XI) et α (XVIII)), ou l'existence d'épissages alternatifs (chaînes $\alpha 1$ (II), $\alpha 2$ (VI), $\alpha 3$ (VI), $\alpha 1$ (VII), $\alpha 1$ (XII), $\alpha 1$ (XIII), $\alpha 1$ (XIV), $\alpha 1$ (XIX), $\alpha 1$ (XXV), $\alpha 1$ (XXVIII)). Les variants d'épissage peuvent moduler les capacités fonctionnelles du collagène au cours du développement, ou selon le type de tissu dans lequel il est sécrété. Par ailleurs, les collagènes (IX, XII, XIV, XV, XVIII) portent des chaînes

glycosaminoglycanes et sont donc considérés comme des protéoglycanes dont les modifications post-traductionnelles peuvent également moduler leurs capacités fonctionnelles.

Enfin, le clivage protéolytique de plusieurs types de collagènes libère des composés doués d'activité biologique intrinsèque offrant ainsi d'autres moyens d'action des collagènes. Il en est de même des contraintes conformationnelles induites par les interactions avec les glycosaminoglycanes, la multimérisation, ou des forces mécaniques, faisant découvrir des sites de liaison cachés (Ricard-Blum and Ballut 2011). Par exemple, les collagènes membranaires existent sous forme transmembranaire et sous forme soluble, libérée par fragmentation de la précédente. Ce collagène devenu soluble peut réguler le comportement de la cellule, de la membrane de laquelle il faisait partie (Franzke et al. 2005).

1.2 La triple hélice

Les chaînes α de collagène comportent entre 662 ($\alpha 1$ (X)) et 3152 acides aminés ($\alpha 3$ (VI)) (Gordon and Hahn 2010; Ricard-Blum et al. 2000). Les trois chaînes α peuvent être identiques (collagène de type II, de type III) on parle d'homotrimères, ou différentes (collagène de type IX) on parle d'hétéotrimères. Les 3 chaînes α formant les collagènes fibrillaires sont 3 chaînes d'hélice de proline de type II, tournant à main gauche, c'est à dire suivant le sens des doigts d'une main pouce vers le haut, équivalent au sens horaire pour la main gauche. En effet la proline est un acide aminé dont l'azote alpha fait partie d'un cycle pyrrolidone. Pour cette raison, la chaîne latérale de la proline, au lieu de s'étirer perpendiculairement à la chaîne principale du polypeptide, revient se coller dessus comme une anse de tasse. Cette structure ne se prête pas à une structure en hélice alpha ou en feuillet bêta, pouvant engendrer une distorsion (un coude dans une hélice alpha, par exemple), mais permet par contre d'autres types de structures: les hélices de proline. Une répétition de prolines en *cis* donne une hélice de polyproline de type I, qui tourne à droite. Une répétition de prolines en *trans* donne une hélice de polyproline de type II qui tourne à gauche. La chaîne α des collagènes s'apparente à l'hélice de

polyproline de type II, formée d'une répétition de triplets Gly-X-Y dont Gly est une glycine et X et Y, sont respectivement une proline et une 4-hydroxyproline le plus fréquemment (Figure 1-1) (Myllyharju 2003). La participation de résidus de 3-hydroxyproline dans la formation d'assemblages supramoléculaires a également été identifiée dans les collagènes de type I, II, III et V/XI (Weis et al. 2010).

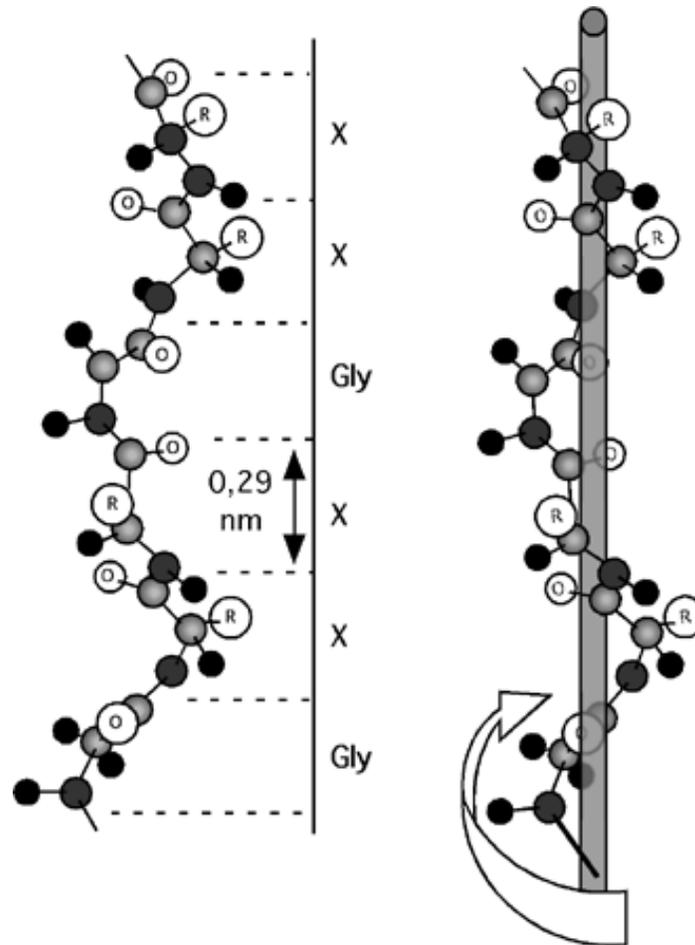


Figure 1-1: Hélice de collagène. Cette hélice est de pas gauche (elle tourne en montant dans le sens des aiguilles d'une montre). Tous les 3 acides aminés reviennent une glycine; les autres résidus X sont le plus souvent une proline ou une hydroxyproline. L'hélice de collagène s'élève de 0,29 nm par résidu et elle compte un peu moins de trois résidus par tour.
In <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/3f.html>

La molécule de collagène est constituée de trois chaînes α torsadées en une microfibrille orientée dans le sens de la main droite, équivalent au sens anti-horaire (Figure 1-2). La triple hélice est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les chaînes et par des forces électrostatiques impliquant des résidus lysine, aspartate et d'hydroxyprolines (Fallas et al. 2009; Persikov et al. 2005). Ce dernier résidu

est capital car en l'absence d'hydroxyprolines la triple hélice ne se forme pratiquement pas à la température du corps. Au cours des modifications post-traductionnelles du collagène, les résidus proline sont hydroxylés au niveau du réticulum endoplasmique par la prolyl-hydroxylase, enzyme dont l'acide ascorbique est un cofacteur. Une carence en vitamine C conduit à une synthèse défectueuse de collagène, ce qui engendre une fragilité des vaisseaux sanguins, des tendons, et de la peau —symptômes caractéristiques du scorbut. A l'issue de ces modifications post-traductionnelles, la fibrille de collagène en triple hélice longue d'environ 300nm, s'appelle tropocollagène (Figure 1-2).

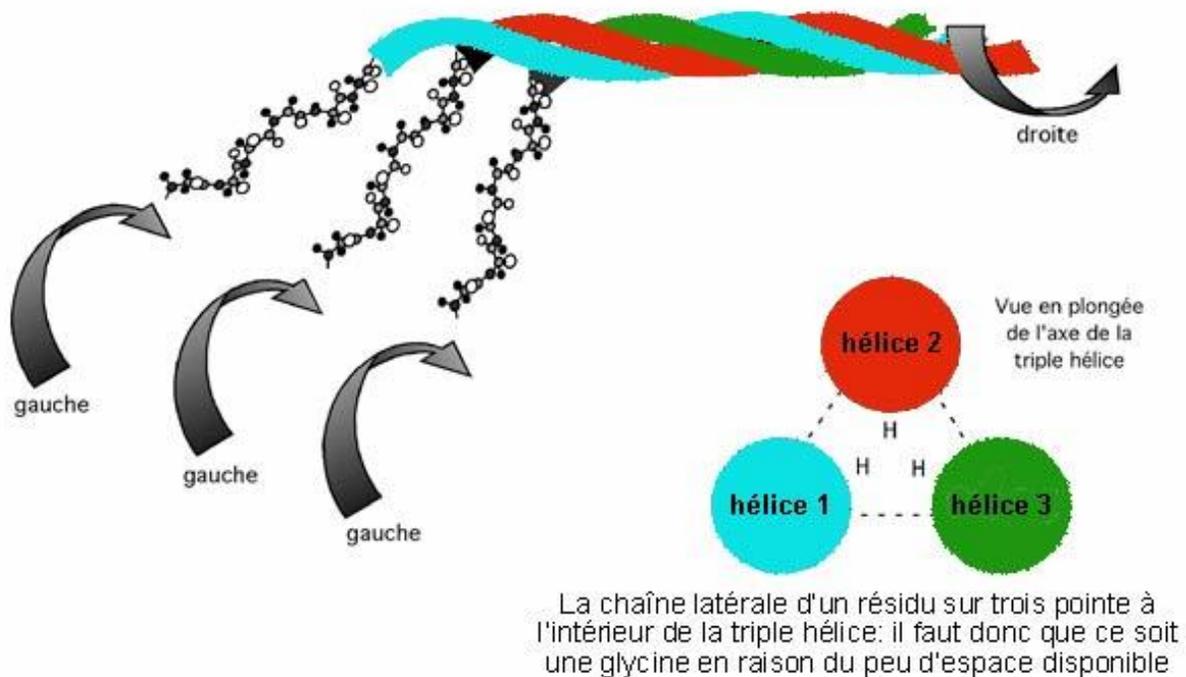


Figure 1-2: Formation du tropocollagène à partir de 3 chaînes α .
In <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/3f.html>

1.3 Les différentes classes de collagènes

Les 28 types de collagène sont regroupés en sept classes différentes en fonction de leur fonction et de leur organisation (Ricard-Blum 2011). On distingue les collagènes fibrillaires (collagène de type I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII) qui s'assemblent en fibrilles puis en fibres, et les collagènes non-fibrillaires (de type IV, XI à X et XII à XXVIII) (Figure 1-3). Parmi les collagènes non-fibrillaires, on trouve :

- des collagènes localisés à la surface des fibrilles et appelés les « fibril-associated collagens with interrupted triple-helices »: FACIT (collagènes de type IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII et XXVI) ;
- des collagènes formant des réseaux hexagonaux (collagènes de type IV, VIII et X) ;
- des collagènes microfibrillaires (collagène de type VI) ;
- des collagènes formant des fibrilles d'ancrage (collagène de type VII) ;
- des collagènes contenant un domaine transmembranaire (collagènes de type XIII, XVII, XXIII et XXV) ;
- les multiplexines contenant de multiples domaines en triple-hélice et qui s'associent aux membranes basales (collagène de type XV et XVIII).

La découverte du collagène IX, premier collagène FACIT a été une avancée importante, démontrant que des collagènes pouvaient être composés de domaines en triple hélice entrecoupés d'autres domaines (Shaw and Olsen 1991). On parle depuis de protéines multidomaines. Ces domaines dits « non-collagène » participent à la structure tridimensionnelle des collagènes et aux interactions protéine-protéine. Les domaines fibronectine III, Kunitz, thrombospondine-1 et Willebrand sont les domaines non-collagènes les plus fréquemment rencontrés.

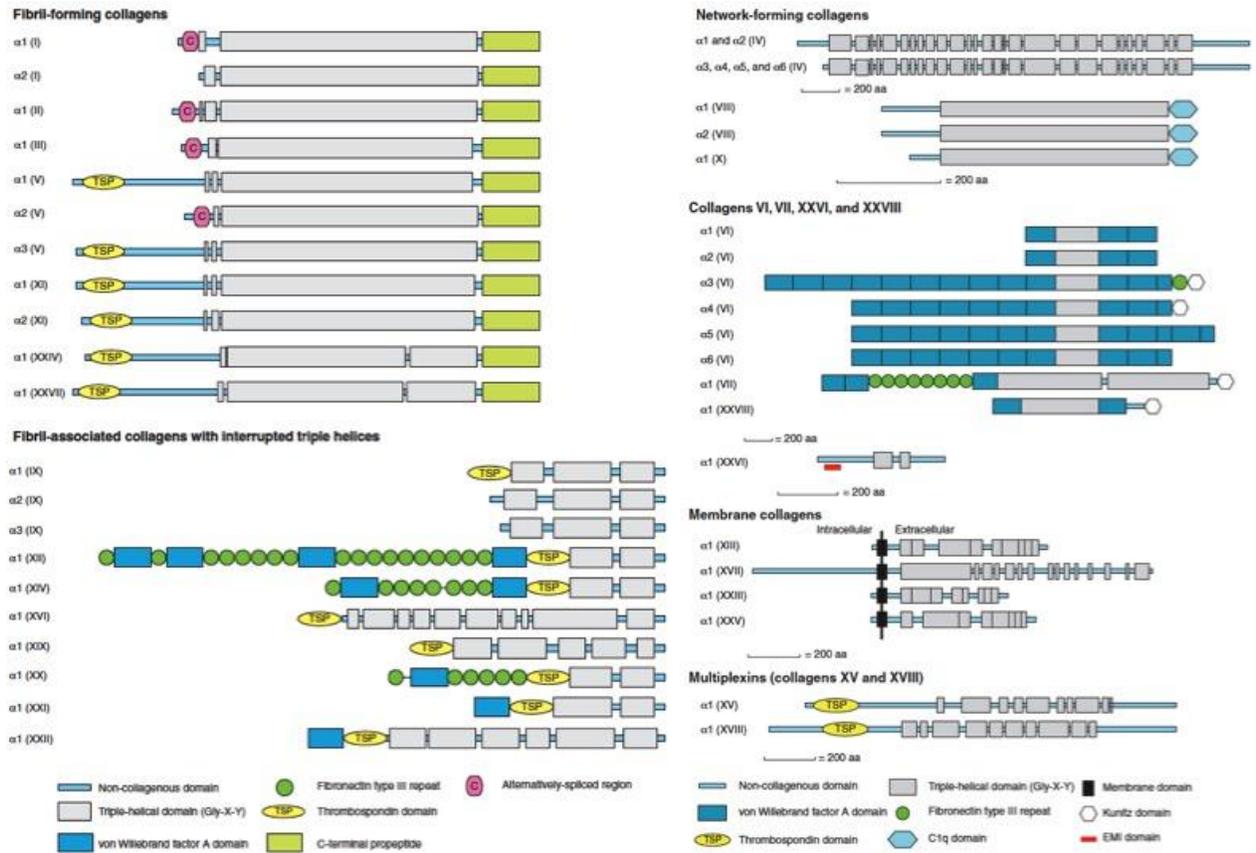


Figure 1-3: Organisation structurelle des différents types de collagène. In (Ricard-Blum 2011)

1.4 Les collagènes fibrillaires

Les collagènes fibrillaires se trouvent en abondance dans le corps humain, en particulier dans les tissus tels que la peau, des os, des tendons, et de la cornée. Ces collagènes ont des structures que l'on peut comparer à de longues cordelettes qui n'ont pas d'interruption dans le domaine de leur triple hélice. Ils s'organisent régulièrement pour former une structure caractéristique en bandes. Chaque unité est appelée "D" et a une période de 67 nm telle qu'observée en microscopie électronique (Figure 1-4).

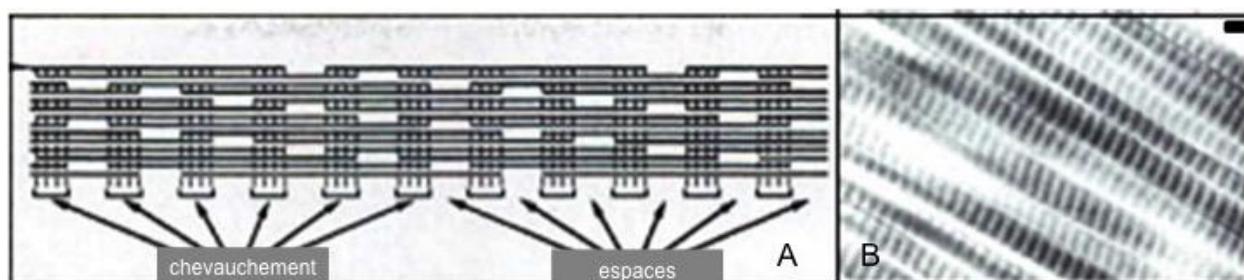


Figure 1-4: Collagène fibrillaire. A) arrangements réguliers et continus des collagènes, formant des chevauchements à leurs extrémités N et C-terminales. B) visualisation en microscopie électronique. Echelle: 100nm. D'après (Garrone 1986)

Le diamètre des fibrilles de collagène varie entre 50 et 500 nm en fonction du tissu. Les collagènes formant des fibrilles sont stabilisés par des liaisons transversales covalentes qui impliquent des acides aminés, notamment les hydroxyprolines de la triple hélice. Ces liaisons sont la principale source de résistance à la traction dans la plupart des tissus à base de collagène. Les molécules de collagène homo ou hétérotrimères de chaînes α s'organisent en fibrilles, qui s'agrègent à leur tour en fibres de 0,25 à 100 μm de diamètre en fonction du tissu (Figure 1-5).

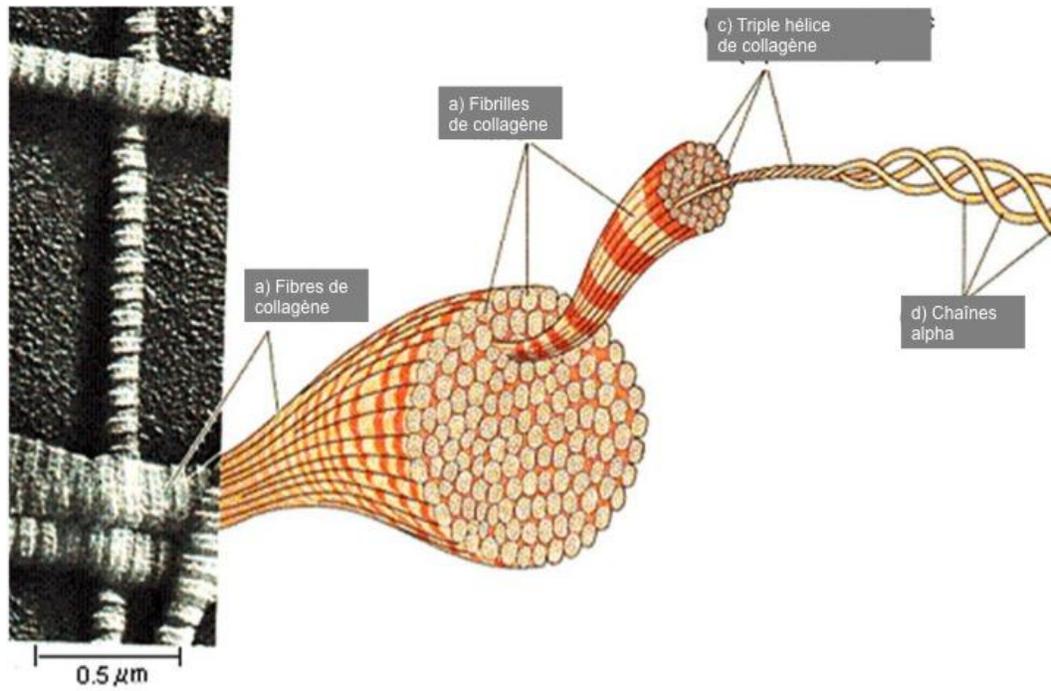


Figure 1-5: De la formation des protocollagènes à partir des trimères d'hélices alpha, à la formation des fibrilles puis des fibres. D'après (Garrone 1986)

1.5 Maladies associées à des atteintes d'un collagène

Les mutations affectant un gène codant pour un collagène sont rares du fait de l'importance de ces protéines de structure dans la résistance des tissus. Voici quelques exemples de pathologies en rapport avec des mutations des gènes codant pour un type de collagène (Myllyharju and Kivirikko 2001) (Tableau 1-1).

maladie	collagène atteint	symptômes
ostéogénèse imparfaite	collagène type I	fragilité osseuse, fractures, réduction de la masse osseuse, sclérotique bleue, perte de cheveux.
Ehlers-Danlos arthrochalasique	collagène de type I	hyperlaxité des articulations, luxations et subluxations répétitives
Ehlers-Danlos classique	collagène de type V	hyperextensibilité cutanée, hyperlaxité articulaire, ecchymoses faciles, cicatrices larges
Ehlers-Danlos vasculaire	collagène de type III	ruptures artérielles, digestives, utérines
Syndrome d'Alport	collagène de type IV	insuffisance rénale, surdité, lésions oculaires
Epidermolyse bulleuse	collagènes type VII et XVII	décollement de la peau et des muqueuses à la moindre agression cutanée
Myopathie de Bethlehem	collagène de type VI	déficit moteur, crampes, atteignant principalement les muscles des doigts, du poignet, du coude et de la cheville
syndrome de Stickler	collagène de type II et XI	myopie précoce, cataracte, surdité, fente labiale atteinte vertébrale, arthrose précoce

Tableau 1-1: Quelques exemples de pathologies liées à l'anomalie d'un collagène

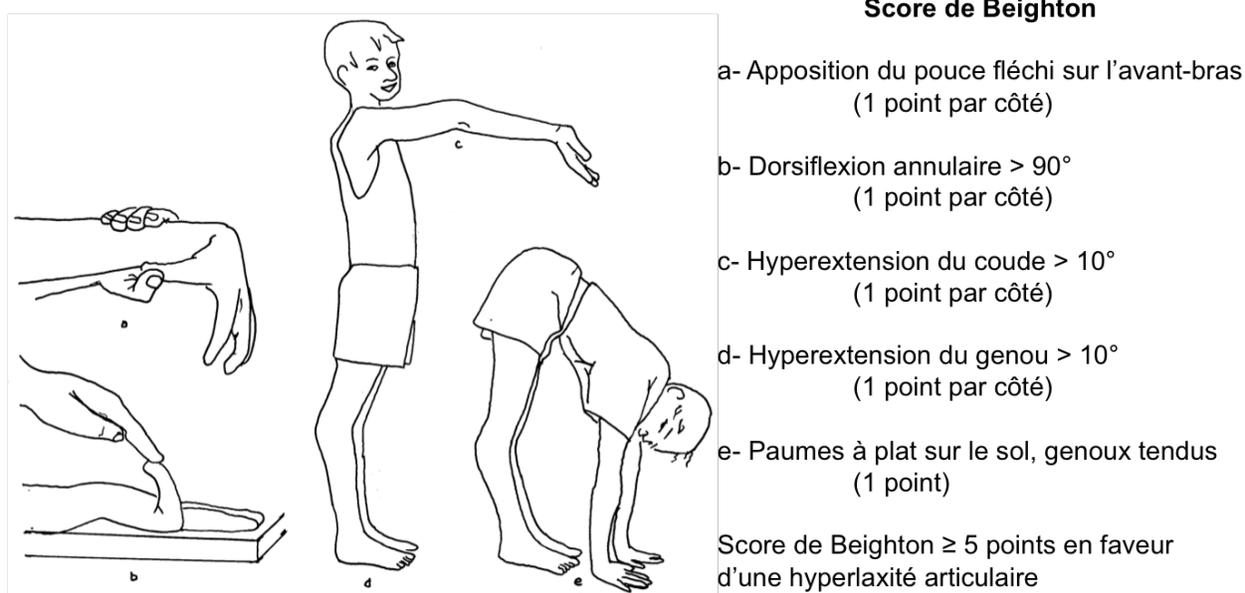
On remarque que les atteintes du squelette, des articulations et de la peau dominant en terme de symptômes révélant la distribution majoritaire du collagène dans ces tissus, mais d'autres organes sont également affectés en cas d'atteinte d'un type de collagène plus spécifique: reins, artères, colon, utérus, oreille, muscle...

2 Syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire

2.1 Les syndromes d'Ehlers-Danlos

Le syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire (SEDv) est un type de syndrome d'Ehlers-Danlos (SED), groupe nosologique hétérogène de maladies du tissu conjonctif réunies sur une base commune d'éléments syndromiques : l'hyperlaxité articulaire, l'hyperextensibilité cutanée, la fragilité tissulaire dont les témoins sont les ecchymoses, le retard de cicatrisation, les cicatrices papyracées (en feuille de papyrus).

L'hyperlaxité articulaire se manifeste au niveau des grandes et petites articulations. Elle est classiquement évaluée par le score de Beighton (Beighton et al. 1973) et confirmée si 5 ou plus de 5 points sur 9 possibles sont comptabilisés parmi les manœuvres suivantes (Figure 2-1):



Beighton P, Solomon L, Soskolne CL. Articular mobility in an African population. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1973;32:413-8

Figure 2-1 Score de Beighton. Figure d'après (Steinmann et al. 2003)

L'hyperextensibilité cutanée est évaluée en dehors des zones soumises aux flexions/extensions articulaires, et des zones cicatricielles. En tirant sur la face antérieure de l'avant-bras, par exemple, on note une extension anormale avant de ressentir une résistance. En relâchant, la peau revient à sa position.

Les cicatrices larges, papyracées se localisent aux zones de frottement : coude, genou, menton, front... et sur les voies d'abord chirurgicales. La peau est si fine et fragile, comme du « papier à cigarette », qu'elle se déchire pour un traumatisme même minime. Enfin, les ecchymoses sont le témoin de la fragilité cutanée et capillaire. Chez l'enfant, elles peuvent laisser penser à une maltraitance. A long terme, elles vont laisser des dépôts d'hémosidérine, responsables d'une pigmentation brune à type de dermite ocre, indélébile.

2.2 Historique

Les SED doivent leur nom à deux dermatologues. Edvard Lauritz Ehlers (1863-1937), dermatologue danois, décrit en 1901 un jeune homme avec une hyperlaxité articulaire responsable de luxations itératives des genoux, une hyperextensibilité cutanée, et des ecchymoses faciles (Ehlers 1901). En 1908, Henri-Alexandre Danlos (1844-1912), un dermatologue français, présente devant la société française de dermatologie le cas d'un jeune homme ainsi : « l'état spécial de la peau, d'une minceur anormale, d'une élasticité extraordinaire domine la situation et constitue avec la vulnérabilité excessive, la caractéristique de l'état morbide » (Danlos 1908). Mais la pathologie n'a pas émergée au début du XX^{ème} siècle. Aussi, dès – 400 avant Jésus-Christ, Hippocrate relate dans son traité *des airs, des eaux et des lieux* des individus nomades probablement atteints de ce syndrome avec une hyperlaxité articulaire et des cicatrices larges et multiples. Ces dernières avaient néanmoins peut-être été pratiquées au pourtour des articulations afin de les soutenir via l'atrophie cutanée engendrée. En 1657, le chirurgien hollandais Job Janszoon van Meek'ren rapporte l'observation d'un jeune garçon espagnol : George Albes, présentant une peau facilement étirable. Ainsi, en tirant la peau de son menton, il pouvait toucher sa poitrine ou se recouvrir les yeux. En 1892, Tschernogobow présente à la société de Vénérologie et de Dermatologie de Moscou, le cas d'un garçon de 17 ans, épileptique avec luxations articulaires à répétition, des nodules cutanés en regard des genoux et des coudes et une peau très extensible, fragile (Parapia and Jackson 2008). En 1933, Achille Miguet utilisait déjà la terminologie d'Ehlers-Danlos comme titre à sa thèse mais c'est en 1936 que Frederick Parkes Weber publie une série de cas ayant en commun : hyperextensibilité cutanée, hyperlaxité articulaire et fragilité tissulaire sous le nom de syndrome d'Ehlers-Danlos (Weber 1936). Depuis de nombreuses formes de ce syndrome ont été rapportées, démembrées et ont justifié la description d'une classification.

2.3 Classification des syndromes d'Ehlers-Danlos

Une première nomenclature des syndromes d'Ehlers-Danlos en 11 types a été établie à Berlin en 1986 (Beighton et al. 1988). Celle-ci fut révisée à Villefranche-sur-Mer en 1997, en une classification simplifiée en 6 types (Beighton et al. 1998) basée sur les éléments cliniques, l'héritabilité et les anomalies moléculaires connues à l'époque (Tableau 2-1).

Type (1997)	Ancien type (1986)	héritabilité	anomalie moléculaire
Classique	Gravis (type I)	AD	collagène type V :
	Mitis (type II)	AD	COL5A1, COL5A2
Hypermobile	hypermobile (type III)	AD	
Vasculaire	Artério-ecchymotique (type IV)	AD	collagène type III : COL3A1
Cyphoscoliotique	Oculo-scoliotique (type VI)	AR	lysyl hydroxylase : PLOD
Arthrochaliasique	Arthrochaliasie multiple congénitale (types VIIA et VIIB)	AD	collagène type I : COL1A1, COL1A2
Dermatopraxie	Dermatopraxie (type VIIC)	AR	collagène type I : ADAMTS-2
Autres	SED lié à l'X (type V)	XR	
	Périodontal (type VIII)	AD	
	Déficit en fibronectine (type X)	?	
	Sd d'hypermobilité familial (type XI)	AD	
	Progéroïde autres formes	? -	

Tableau 2-1 : Classification des syndromes d'Ehlers-Danlos (SED) selon la classification de Villefranche-sur-Mer 1997 (Beighton et al. 1998) rappel de l'ancienne classification de Berlin 1986 (Beighton et al. 1988) mode de transmission : autosomique dominant (AD), autosomique récessif (AR), récessif lié à l'X (XR) et anomalie moléculaire retrouvée à l'époque avec les gènes correspondants.

2.4 Syndrome d'Ehlers-Danlos de type vasculaire, critères de Villefrance-sur-Mer (1997)

Le SEDv est une entité à part, distincte moléculairement des autres formes de SED. Des complications vasculaires avaient été rapportées chez des patients souffrant de SED (André et al. 1965; Lynch et al. 1965; McFarland and Fuller 1964; McKusick 1966; Mories 1960) et en 1936 Sack décrivait sous le nom « status dysvascularis » un patient SED avec fragilité artérielle (Sack 1936). En 1967 Barabas distingue 3 groupes de SED parmi 27 patients dont un type vasculaire. Quinze patients ont une hyperextensibilité cutanée et une hyperlaxité articulaire prononcées, 10 patients présentent les mêmes symptômes mais un peu plus atténués et des varices, 2 patientes présentent des ruptures artérielles, une peau peu extensible et des articulations peu laxes. Ainsi écrit-il, bien que ces 2 patients présentent les éléments diagnostiques d'un SED, elles diffèrent par d'importants aspects : ecchymoses faciles, transparence cutanée, moindre hyperextensibilité cutanée, moindre hyperlaxité articulaire et des douleurs abdominales intenses (Barabas 1967). Ce type de SED artériel-ecchymotique, un temps appelé syndrome de Sacks-Barabas est désormais dénommé SEDv.

Le SEDv représente moins de 4% des SED. (Barabas 1972). L'hypothèse que le SEDv puisse être due à l'absence de collagène de type III a été évoquée en 1975 par Pope et al. (Pope et al. 1975). Son équipe observe une diminution du contenu en collagène de l'aorte et la peau de leur patient atteint du syndrome de Sacks-Barabas, et n'y détecte pas d'antigène du collagène de type III. En effet, les fibroblastes de ce patient et de 3 autres ne sécrètent pas de collagène de type III dans le milieu de culture, et le marquage en immunofluorescence contre le collagène de type III est négatif sur les fibroblastes. Pope et al. pensent avoir identifié l'anomalie biochimique responsable du SEDv : l'absence de synthèse du collagène de type III. Nous verrons plus loin qu'il s'agit en fait plus d'anomalies qualitatives post-traductionnelles lors de la sécrétion du collagène que l'absence complète de synthèse, mais il faut reconnaître à l'équipe de Pope et al. d'avoir découvert le type de collagène impliqué dans cette maladie. Quelques années plus tard, Byers et al. confirment l'implication du collagène de type III

dans le SEDv mais retrouve une sécrétion réduite à 10-15% dans le milieu de culture de fibroblastes issus de biopsies cutanées par rapport aux contrôles (Byers et al. 1981). Par ailleurs, ils montrent également que le cytoplasme des fibroblastes de sujets atteints présentent une accumulation intracellulaire de procollagène de type III d'un poids moléculaire plus élevé qu'habituellement, témoignant probablement de modifications post-traductionnelles importantes (Byers et al. 1981; Byers et al. 1979). C'est en 1988, que la première mutation du gène COL3A1 a été mise en évidence et reconnue comme responsable d'un SEDv (Superti-Furga and Steinmann 1988).

Seule la mise en évidence d'une mutation du gène COL3A1 codant pour le collagène de type III apporte la certitude du diagnostic. Cependant un SEDv est suspecté devant la présence d'au moins 2 critères majeurs conduisant à la réalisation du test génétique (Tableau 2-2).

CRITERES MAJEURS	CRITERES MINEURS
Peau fine, translucide	Acrogérie
Ecchymoses extensives	Hyperlaxité des petites articulations
Morphotype facial caractéristique	Rupture tendineuse ou musculaire
Rupture ou fragilité artérielle, digestive ou utérine	Pied-bot
	Varices précoces
	Fistule artério-veineuse carotido-caverneuse
	Pneumothorax et hémopneumothorax
	Rétraction gingivale
	Cas ou mort subite inexplicée chez les apparentés

Tableau 2-2 Critères diagnostiques du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire. D'après la classification de Villefranche-sur-Mer (Beighton et al. 1998).

D'autres points spécifiques au SEDv ont été explicités lors de la conférence de Villefranche-sur-Mer :

- i) L'apparence faciale chez certains patients se caractérise par une diminution du tissu adipeux sous-cutané, en particulier du visage et des membres.
- ii) L'hyperlaxité articulaire est généralement limitée aux doigts.
- iii) Les ruptures artérielles spontanées ont un pic d'incidence dans la troisième ou quatrième décennie de la vie, mais peuvent survenir plus tôt. Les artères de moyen calibre sont le plus souvent impliquées. La cause la plus fréquente de mort subite est la rupture artérielle.

- iv) Un tableau douloureux abdominal aigu est une présentation fréquente devant faire évoquer une rupture artérielle ou digestive.
- v) La circulation veineuse sous-cutanée du haut du thorax et sur l'abdomen est facilement visible.
- vi) En cas d'ecchymoses faciles il convient d'éliminer une maladie hématologique ou une maltraitance. Dans le contexte d'ecchymoses chroniques, de cicatrisation pathologique, il convient de distinguer le SED de type vasculaire du type classique.
- vii) En l'absence d'histoire familiale, le diagnostic de SEDv est difficile à évoquer chez l'enfant.
- viii) Les grossesses des patientes SEDv peuvent se compliquer de rupture utérine, d'hémorragie en per- ou peri-partum, et de déchirures périnéales lors de l'accouchement.
- ix) La chirurgie est à risque de complications graves et fréquentes, per- ou post-procédure par lâchage des sutures.

Au sein des SED, le type vasculaire est le seul à voir survenir des complications artérielles et des ruptures d'organes creux qui font toute la sévérité de la maladie et rendent son pronostic sombre.

2.5 Caractéristiques du SEDv

2.5.1 Épidémiologie

La prévalence du SEDv est difficile à mesurer du fait de sa rareté, de la variabilité du phénotype qui n'oriente pas toujours vers un test génétique et à cause de la mortalité élevée des complications, situation durant laquelle le prélèvement génétique est souvent manquant. Ainsi la prévalence est estimée entre 1/90 000 et 1/300 000 (Bergqvist et al. 2013; Frank et al. 2015a; Pepin et al. 2014), voire même 1/25 000 sur des projections par comparaison à la prévalence des mutations du collagène de type I (Pepin et al. 2014). En l'absence de traitement curatif, le dépistage familial pourrait apparaître sans intérêt. Toutefois la connaissance de son statut vis à vis du gène COL3A1 a toute son importance dans la prévention des complications. Informés de son risque artériel, digestif, et utérin, le patient dépisté peut bénéficier d'une prévention par l'instauration d'un traitement bêtabloquant diminuant la survenue des complications (Ong et al. 2010) et par l'éviction si possible des actes invasifs à risque : ponction artérielle, coloscopie...

Le pronostic de cette maladie est dramatique avec un âge de survenue d'une première complication majeure entre 29 et 31 ans (Frank et al. 2015a; Pepin et al. 2014), et 80% des patients à 40 ans ont déjà présenté une complication grave. Cette première complication est une fois sur deux vasculaire et chaque complication est grevée d'une mortalité autour de 10% (Frank et al. 2015a; Oderich et al. 2005; Pepin et al. 2000; Pepin et al. 2014). Dans la première publication de leur cohorte en 2000, Pepin et al. rapportent que 92% des décès des 220 cas index sont d'origine vasculaire. Dans leur seconde publication en 2014, 22 % des complications vasculaires sont des anévrismes, dissections ou ruptures aortiques, conduisant au décès dans 68 % des cas (Pepin et al. 2014). Ceci explique que la première cause de décès est la rupture artérielle (79%) et que la médiane de survie est de 51 ans soit 35 ans inférieure à celle de la population générale (Pepin et al. 2014). L'atteinte suivant le sexe est variable en fonction des séries de la littérature : variant entre 36% et 55% d'hommes (Frank et al. 2015a; Oderich et

al. 2005; Pepin et al. 2014; Shalhub et al. 2014; Watanabe and Shimada 2008). Il existe possiblement une mortalité supérieure chez les hommes comparativement aux femmes : médiane de survie de 46 ans versus 54 ans par excès de mortalité des jeunes hommes. Parmi les hommes, 18% des décès, tous d'origine vasculaire, surviennent avant l'âge de 20 ans, comparativement à 7% des décès féminins (Pepin et al. 2014). Le SEDv est une maladie grave et contrairement à d'autres maladies génétiques vasculaires, comme la maladie de Marfan, les complications surviennent sur des vaisseaux qui ne sont pas morphologiquement dilatés et la topologie et le moment de survenue d'une rupture artérielle (ou digestive) sont totalement imprévisibles (Karkos et al. 2000). Cette épée de Damoclès est responsable également de conséquences psychologiques importantes à considérer lors de la prise en charge de ces patients.

2.5.2 Clinique et symptômes

Le SEDv se distingue des autres formes de SED par des symptômes cardinaux : hyperlaxité articulaire, hyperextensibilité cutanée moins marquées, alors que la fragilité tissulaire est au premier plan avec des complications d'organe : vaisseau, utérus, colon qui font toute la gravité de la maladie (Tableau 2-5).

2.5.2.1 Acrogérie, morphotype facial

Les patients atteints de SEDv présente un morphotype facial assez caractéristique avec un visage fin en « madone », avec des pommettes saillantes, des joues creuses, des yeux globuleux et enfoncés, une légère pigmentation au pourtour et de fines télangiectasies des paupières, un nez fin et pincé, des lèvres horizontales et peu ourlées. Au niveau des oreilles, le pavillon est fin, étroit et ferme au toucher, et le lobe de l'oreille est peu développé voire absent (Figure 2-2). Il existe par ailleurs une tendance à l'alopecie. Enfin, on remarque facilement l'aspect de vieillissement prématuré du dos, des mains et des pieds avec un lacis veineux sous-cutané bien visible, une peau ridée, fine moulant les reliefs osseux, d'où le terme acrogérie (Germain 2007; Pepin et al. 2000; Watanabe et al. 2007; Watanabe and Shimada 2008).

2.5.2.2 Atteinte cutanée

L'atteinte cutanée se traduit par une peau lisse, douce et veloutée au toucher, fine, translucide, avec présence d'hématomes ou de dépôts pigmentés séquellaires. L'hyperélasticité est absente ou discrète à la différence des SED classique ou hypermobile (Germain 1995). Ainsi, Catala-Pétavy et al. ont analysé différents paramètres biométriques cutanés et n'ont pas en évidence d'hyperextensibilité dans le SEDv à la différence des autres SED, mais en revanche une moindre épaisseur 0,95 mm chez les patients avec SEDv contre 1,10mm chez les sujets contrôles (Catala-Pétavy et al. 2009). La transparence cutanée excessive laisse transparaître une circulation veineuse sous-cutanée à la partie haute du thorax et sur la paroi de l'abdomen. Moindre que dans le SED classique, la fragilité cutanée est responsable de plaies

pour des traumatismes minimes dont la cicatrisation est lente, avec des cicatrices larges d'aspect papyracé qui s'élargissent au fil du temps (Figure 2-2).

L' « elastosis perforans serpiginosa » n'est pas rare dans le SEDv et se présente sous la forme de papules à centre clair affaissé et plan, localisées au cou et aux plis de flexion (Ahmadi and Choi 2011). Ces lésions cutanées témoignent de la fragmentation des fibres élastiques, éliminées à travers l'épiderme. Des hématomes spontanés ou consécutifs à des légers coups sont également le témoin de cette fragilité et finesse cutanées.

Ces ecchymoses « faciles » sont souvent un motif de consultation ; conduisant à la réalisation d'explorations biologiques à la recherche d'un trouble de l'hémostase primaire ou de la coagulation. Ces résultats reviennent systématiquement négatifs. Anstey et al. ont pratiqué des tests de coagulation et d'agrégation plaquettaire sur 51 patients atteints de SED. Parmi les 7 SEDv, tous avaient des tests de coagulation et des taux plaquettaire normaux. Aux tests d'agrégation plaquettaire seul un patient présentait un défaut de sécrétion, et 3 des réponses diminuées au test à la ristocétine (Anstey et al. 1991). Chez l'enfant, la présence des ecchymoses doit faire éliminer une pathologie de l'hémostase primaire ou secondaire, puis le diagnostic de maltraitance ce qui met en porte-à-faux les parents d'enfants atteints de SEDv (De Paepe and Malfait 2004).

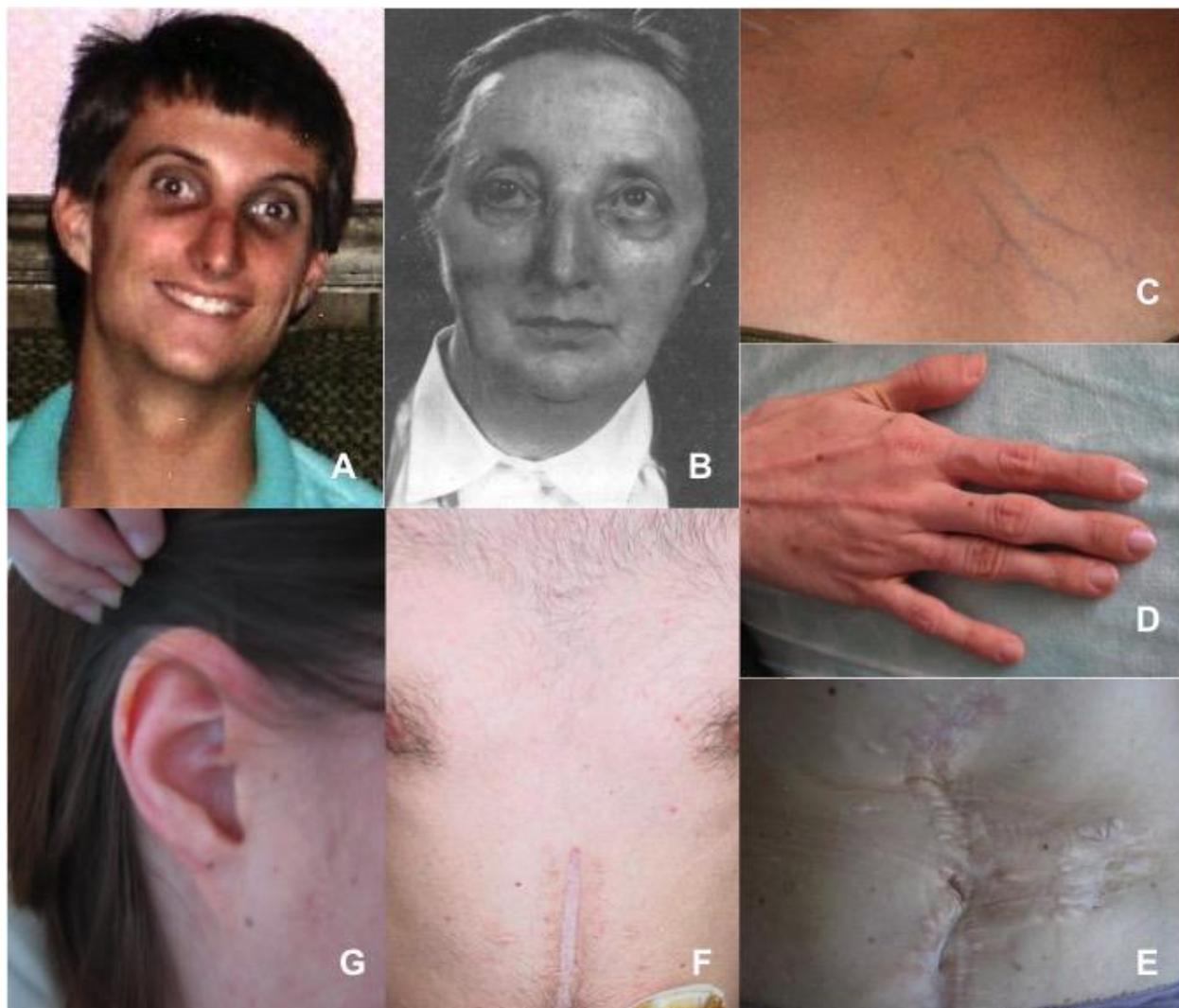


Figure 2-2: Caractéristiques cutanées : A (<http://www.tadcoalition.org/tad/4771/Josh>) & B (in (Nuytinck et al. 1992): morphotype facial ; C: transparence cutanée; D : acrogérie; E & F !n (Germain 2002) : cicatrices papyracées; G : hypolobulation de l'oreille.

2.5.2.3 Atteinte articulaire

L'atteinte articulaire est au second plan. On retrouve une hyperlaxité articulaire des petites articulations (phalangiennes et métacarpophalangiennes), mais pas des grosses articulations comme dans les autres types de SED bien que quelques unes soient parfois retrouvées à l'interrogatoire (Germain 2007; Steinmann et al. 2003). On retrouve également des dysplasies congénitales de hanche (1%) et des pieds bots (8%), plus fréquemment que dans la population générale (Pepin et al. 2014).

2.5.2.4 Atteinte buccale

La rétraction gingivale est un critère mineur défini lors de la conférence de Villefranche-sur-Mer en 1997 classiquement rapporté dans le SEDv (Beighton et al. 1998; Steinmann et al. 2003). L'étude de 17 patients de notre centre, atteints de SEDv moléculairement prouvé, comparés à 46 témoins, a retrouvé une rétraction gingivale moins fréquente dans le SEDv (41,2%) que chez les contrôles (67,3%) alors que d'autres signes dentaires étaient plus spécifiques (Ferré et al. 2012). La gencive et la muqueuse buccales étaient plus fines et transparentes dans le SEDv, laissant plus facilement apparaître la vascularisation sous-jacente. Il était d'ailleurs retrouvé une plus grande fragilité gingivale avec saignement facile lors de l'examen buccal. Par ailleurs, une douleur de l'articulation temporo-mandibulaire était présente chez 41% des SEDv contre 6,5% des contrôles. Un remaniement prématuré des surfaces articulaires de l'articulation temporo-mandibulaire était très fréquemment retrouvé chez les SEDv (43,8%) contre 4,3% des sujets témoins. Sur un cliché panoramique dentaire, un trouble de l'articulé temporo-mandibulaire, des fusions des racines des molaires, une augmentation de la longueur des racines, une réduction du volume pulpaire étaient des caractéristiques des patients atteints de SEDv (Ferré et al. 2012).

A noter que 5 des 17 patients n'avaient pas de frein labial inférieur. L'absence de frein labial inférieur a en effet été évoqué comme signe spécifique des SED classiques et hypermobiles (sensibilité de 100%, spécificité de 99,4%) (De Felice et al. 2001). Néanmoins une enquête britannique auprès de 371 patients atteints de SED y a retrouvé une prévalence de 11 % d'absence de frein labial inférieur contre 8 % chez des témoins, différence non significative (Shankar et al. 2006).

2.5.2.5 Atteinte pulmonaire

Pneumothorax, hémithorax, hémoptysies sont des complications qui peuvent révéler la maladie (Herman and McAlister 1994; Selim et al. 2010; Yost et al. 1995). L'imagerie met en évidence des bulles ou blebs sous pleuraux (Figure 2-3) et une série de 9 cas avec analyse histologique des prélèvements pulmonaires et pleuraux a retrouvé différentes caractéristiques : dilacérations du tissu pulmonaire responsable d'un saignement et de bulles, cavité et fibrose autour de l'hématome, puis formation d'un nodule dense après rétraction du tissu et de l'hématome (Kawabata et al. 2010).

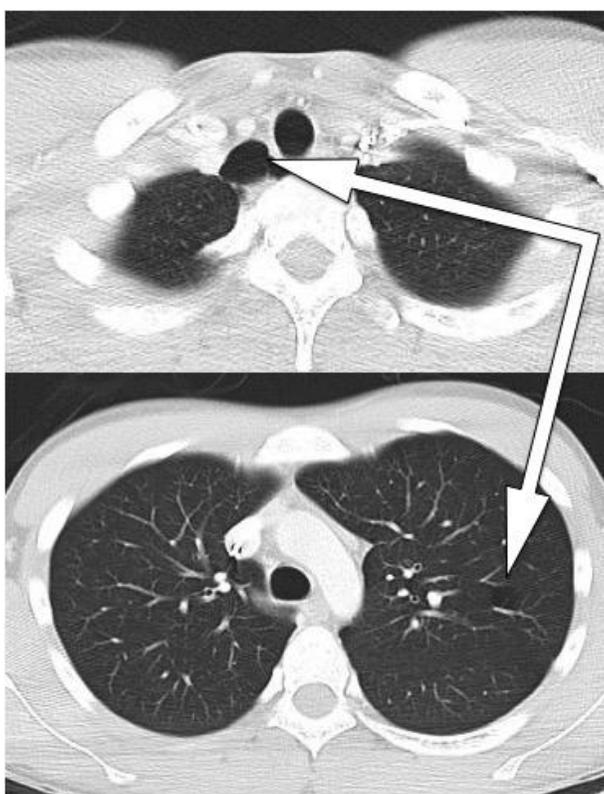


Figure 2-3: Tomodensitométrie thoracique mettant en évidence des bulles: sous-pleurale (supra), intra-parenchymateuse (infra) chez un homme de 17 ans atteint de SEDv

2.5.2.6 Atteinte vasculaire

L'atteinte vasculaire domine le tableau clinique comme exposé plus haut. Elle se manifeste par des dissections compliquées ou non d'anévrisme (48%), des ruptures d'artères (38%) de moyen calibre le plus souvent mais également de l'aorte, des anévrismes fusiformes (14%) (Oderich et al. 2005) (Figure 2-4). Les symptômes sont variés : mort subite ; hématome : mollet, rétropéritonéal, intrabdominal ; hémothorax ; hémoptysie ; hématomèse ; accident vasculaire cérébral (Cikrit et al. 2002; Cikrit et al. 1987; Freeman et al. 1996; Mattar et al. 1994).

Les artères le plus souvent atteintes dans les complications vasculaires du SEDV sont les branches de l'aorte abdominale comme le montre le Tableau 2-3: artères rénales, artères hépatique et splénique mais également les iliaques (Bergqvist 1996; Cikrit et al. 1987; Germain 2002; Habib et al. 2001; Oderich et al. 2005; Pepin et al. 2014; Shalhub et al. 2014).

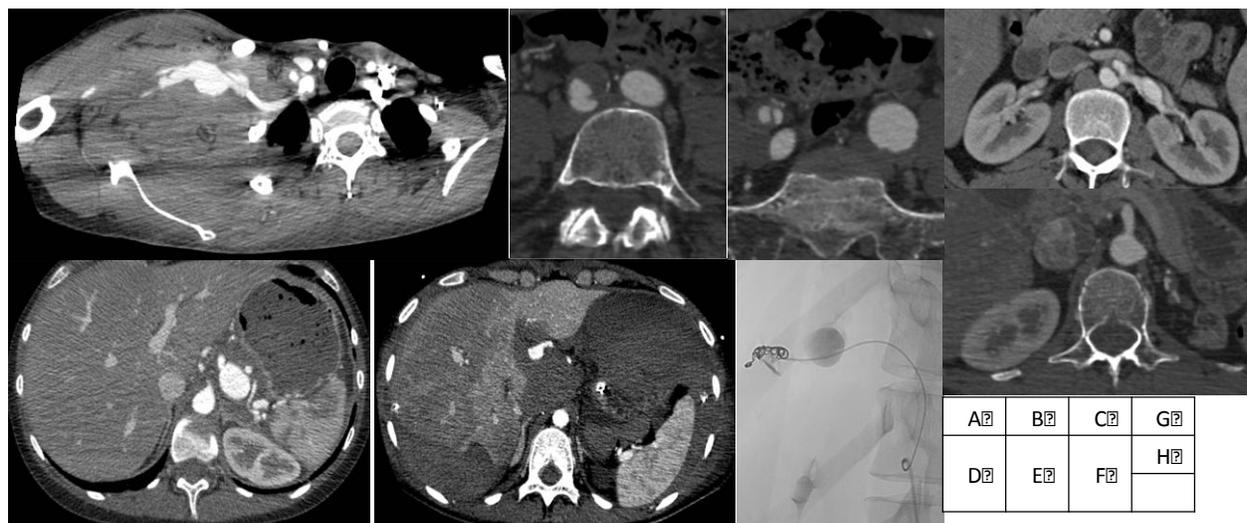


Figure 2-4: Complications artérielles du SEDV. A: rupture de l'artère sous-clavière droite. B: faux anévrisme de l'artère iliaque primitive droite. C: dissection de l'artère iliaque externe droite et anévrisme de l'artère iliaque primitive gauche. D: anévrisme de l'artère splénique. E: rupture de l'artère hépatique gauche. F: embolisation de la rupture de l'artère hépatique gauche présentée en E. G: dissection de l'aorte abdominale et l'artère rénale gauche. H: 6 mois après la dissection présentée en G, artère rénale disséquée, atrophie rénale gauche.

Des dissections coronaires peuvent également survenir et engendrer un syndrome coronaire aigu (Oderich et al. 2005; Pepin et al. 2014). Dans la cohorte nord-américaine, Pepin et al. rapporte 25 cas (9 hommes, 16 femmes) d'âge moyen 31 ans (hommes 25 ans, femmes 34 ans) (Pepin et al. 2014). La mortalité était de 33%, 42% ont survécu après chirurgie, 17% ont survécu sans chirurgie.

Une manifestation classique, entre 4 et 24% selon les séries est la fistule carotido-caverneuse responsable d'acouphènes, d'un souffle orbitaire, d'une exophtalmie (Bergqvist 1996; Oderich et al. 2005; Pepin et al. 2014; Shalhub et al. 2014) (Tableau 2-3). La fistule carotido-caverneuse peut être traitée avec succès par embolisation dans des mains expertes avec toutes les précautions requises chez ce type de patient et une surveillance étroite du point de ponction artériel (Chuman et al. 2002; Desal et al. 2005). Pepin et al. rapportent 27 cas de fistule carotido-caverneuse (5 hommes, 22 femmes) d'âge moyen 31 ans (idem entre hommes et femmes). La survie était de 100%, avec 17 embolisations, et complications per- ou post-procédure pour 7 d'entre-elles (41%) (Pepin et al. 2014). La survenue spontanée d'une fistule carotido-caverneuse, chez un patient jeune, doit d'emblée faire évoquer un diagnostic de SEDv (Figure 2-5).

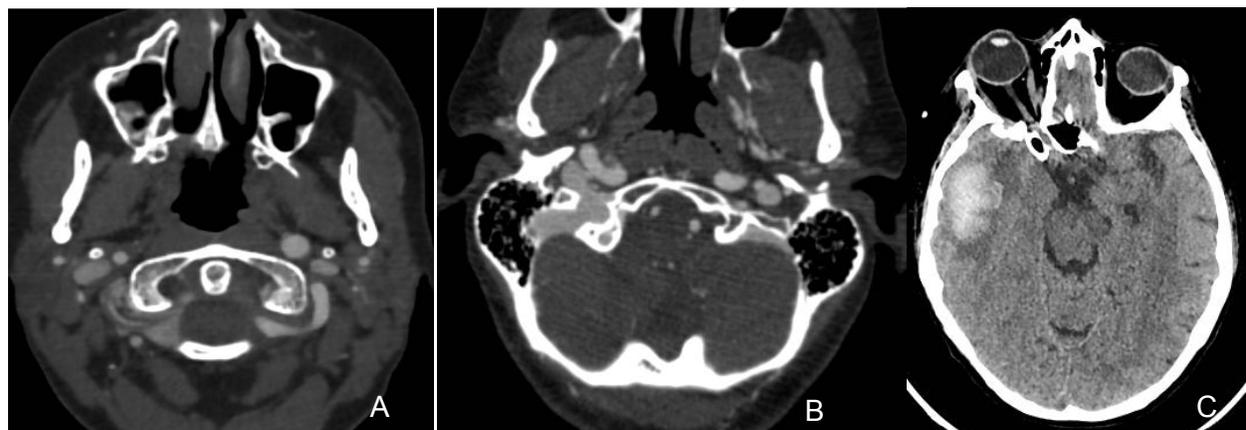


Figure 2-5: Complications artérielles cérébrales dans le SEDv. A : dissection de l'artère vertébrale droite à son entrée dans la boîte crânienne. B : Fistule carotido-caverneuse droite. C : compliquée d'un saignement intraparenchymateux secondaire à l'hyperpression veineuse du sinus latéral droit.

L'atteinte des artères intracrâniennes est sévère, grevée d'une mortalité de 39% et les dissections carotidiennes sont moins sévères mais ont tout de même une mortalité de 14% (Pepin et al.

2014). Les dissections carotidiennes ou vertébrales sont assez fréquentes dans le SEDv (North et al. 1995; Schievink 2004; Schievink et al. 1990) (Figure 2-5). Néanmoins, les données de la cohorte CADISP montrent que la prévalence du SEDv dans les dissections des artères cervicales reste exceptionnelle: 2 patients sur une cohorte de 1934 patients (Debette et al. 2014). Néanmoins cette étude met en évidence de manière intéressante des particularités dans les formes familiales de dissections cervicales (1% des cas): notamment une atteinte de l'artère carotide (90%) plus fréquente que dans les formes non-familiales (68%). Enfin, il est à noter qu'en plus des 2 patients avec SEDv, un patient était diagnostiqué SED classique, un SED hypermobile, un avec ostéogénèse imparfaite, un syndrome de Marfan, témoignant de l'impact des protéines de la MEC dans le maintien de l'intégrité de la paroi artérielle. Enfin dans plusieurs séries de dissections cervicales totalisant 53 patients (Kuivaniemi et al. 1993; Martin et al. 2006; Pein et al. 2002; van den Berg et al. 1998), le séquençage systématique du gène COL3A1 à la recherche de mutations n'a permis de retrouver que 2 apparentés avec une mutation responsable d'une substitution glycine de la triple hélice (Martin et al. 2006), mais dont la clinique n'était pas évocatrice de SEDv laissant supposer une pénétrance incomplète de la mutation rapportée.

	Oderich et al. 2005	Shalhub et al. 2014	Pepin et al. 2014	
	Fréquence	Fréquence	Fréquence	taux de mortalité
Tête et cou	25%		17%	
fistule carotido-caverneuse		6%	4%	0%
carotide	8%	20%		
vertébral	2%	12%	8%	14%
sous-clavier	12%	12%		
intracrânien	3%		5%	39%
Thorax	23%	14%	32%	
aorte thoracique	15%		5%	59%
aorte abdominale	7%		4%	53%
aorte		14%	13%	75%
cardiaque			2%	85%
thorax			5%	37%
coronaire			4%	31%
Abdomen	39%		34%	
renal	8%	26%	5%	34%
hepatique ou splénique				
tronc coeliaque	4%	21%	7%	46%
hépatique	4%	12%		
splénique	5%	27%		
artère mésentérique supérieure	6%	4%		
iliaque	8%	40%	8%	26%
abdominal	2%		14%	25%
Membres	17%		17%	
membres	17%		7%	4%
anévrismes multiples			4%	20%
vasculaire			6%	52%

Tableau 2-3: Répartition des atteintes artérielles au cours du SEDv d'après trois grandes séries de la littérature

Enfin, l'apparition précoce de varices des membres inférieurs est fréquente au cours du SEDv. L'éveinage des veines saphènes est classiquement contre-indiqué car exposant au risque de déchirure de la veine d'abouchement, la veine fémorale commune ou la veine poplitée lors de la procédure. L'insuffisance veineuse secondaire aux varices représente une gêne pour les patients pas uniquement esthétique mais également douloureuse avec tous les signes cliniques d'insuffisance veineuse chronique des membres inférieurs (Frank et al. 2015b).

2.5.2.7 Atteinte vasculaire asymptomatique

La surveillance par imagerie est controversée car l'attitude thérapeutique est le plus souvent conservatrice alors que la connaissance de lésions artérielles asymptomatique est anxiogène (Bergqvist et al. 2013). Oderich et al. ont retrouvé chez 24 patients explorés 52% de lésions vasculaires asymptomatiques notamment par des explorations non invasives avec une sensibilité de 76% (Oderich et al. 2005). De plus, comme évoqué plus haut, des complications aiguës peuvent survenir dans un lit artériel apparaissant indemne de lésions préalables.

2.5.2.8 Atteinte cardiaque

Aux explorations échocardiographiques, des insuffisances valvulaires aortique, mitrale ou tricuspide ont été rapportées (Dill-Russell and Jones 2001; Jiang et al. 2012; Oderich et al. 2005). Jaffe et al. ont exploré par échocardiographie une série de 10 individus d'une même famille dont le diagnostic de SEDv était porté à partir de l'examen clinique et de la diminution de production du collagène de type III par analyse biochimique des cultures de fibroblastes cutanés. Les 8 patients atteints de SEDv avaient tous un prolapsus valvulaire mitral (Jaffe et al. 1981). Toutefois cette surreprésentation du prolapsus valvulaire mitral semble inconstante dans d'autres séries, retrouvant une prévalence de 6,1% versus 7% chez les sujets contrôles (Dolan et al. 1997). D'ailleurs, une étude systématique des gènes codant pour les collagènes fibrillaires de type I et III n'a pas permis de ségréger les cas familiaux de prolapsus valvulaire mitral des cas sporadiques (Wordsworth et al. 1989).

2.5.2.9 Atteinte digestive

L'atteinte digestive est elle aussi responsable de tableaux cliniques sévères et bien souvent dramatiques. La complication la plus fréquente est la rupture colique responsable d'une douleur abdominale avec abdomen chirurgical et péritonite (Frank et al. 2015a; Oderich et al. 2005; Pepin et al. 2000; Pepin et al. 2014). Les ruptures spontanées digestives affectent dans 80% des cas le colon sigmoïde (Freeman et al. 1996; Pepin et al. 2000). L'hyperpression lors du passage des selles pourrait induire des contraintes pariétales à l'origine de ces perforations (Perdu et al. 2006). La prévalence de la diverticulose sigmoïdienne est élevée dans le SEDv (Beighton and Horan 1969) tout comme la constipation facteur de risque de diverticulose (Demirogullari et al. 2006; Sentongo et al. 1998). Ces diverticules sont assez fréquents chez les enfants atteints de SEDv (Beighton and Horan 1969; Habib et al. 2001; Sykes 1984) et peuvent se compliquer de perforations sigmoïdiennes dès l'enfance (Naclerio et al. 1990; Shi et al. 1989) voire même in utéro (Sykes 1984). Une autre hypothèse physiopathologique serait la survenue de micro-saignements dans la paroi colique, responsable d'une nécrose locale et secondairement d'une perforation (Aldridge 1967). Les cas de saignements du tractus gastro-intestinal, d'hématémèses, d'hématomes intra-muraux au scanner ou en endoscopie viennent étayer cette hypothèse (Aldridge 1967; Beighton et al. 1969; LAPAYOWKER 1960). Toutefois, plusieurs auteurs rapportent des perforations coliques survenant sur un côlon d'apparence macroscopiquement saine (Aldridge 1967; Bedda et al. 2005). L'analyse histologique des prélèvements tissulaires au niveau des perforations coliques met en évidence une rupture de la muqueuse musculaire, des plages de nécrose et surtout une infiltration inflammatoire aspécifique (Ng and Cheong 2011).

Les récurrences de perforation sont fréquentes, jusqu'à 50% pour certains, justifiant une colectomie totale dès la première perforation (Berney et al. 1994; Freeman et al. 1996; Fuchs and Fishman 2004; Stillman et al. 1991).

Des ruptures spontanées de l'œsophage (Reis et al. 1998), de l'estomac (Massé et al. 1967), de l'intestin grêle (André et al. 1965; Gómez Sugrañes et al. 1995; Pflumio et al. 2000), de la rate ou du foie sont également rapportées (Germain 2002; Harris et al. 1985; Solomon et al. 1996).

2.5.2.10 Atteinte obstétricale

Enfin, les femmes sont à risque de complications obstétricales : rupture utérine, déchirure vaginale...responsables de 15 à 25% de décès dans le peri-partum selon les séries (Lurie et al. 1998; Pepin et al. 2000; Rudd et al. 1983). Rudd et al rapportent 5 décès sur 10 femmes, pour 20 grossesses (Rudd et al. 1983). Pepin et al rapportent 12 décès sur 81 femmes, pour 167 accouchements à terme parmi 183 grossesses soit une mortalité de 6,6% par rapport au nombre de grossesses (Pepin et al. 2000). Parmi les 17 femmes décédées en peri-partum, 7 sont décédées de rupture utérine pendant le travail, 3 de rupture vasculaire à l'accouchement, 7 de rupture vasculaire après l'accouchement (Pepin et al. 2000; Rudd et al. 1983). Du fait de cette mortalité élevée la césarienne systématique dans le SEDv est souvent préconisée sur l'argumentaire que les accouchements par voie basse se compliquent de déchirures larges et sévères du périnée et d'hématome et de ruptures utérines liées aux efforts de poussée, alors que les césariennes préservent la filière vaginale et permettent plus facilement un contrôle de l'hémostase en cas de saignement. Néanmoins, on ne sait pas si la césarienne préviennent des ruptures artérielles, et elles n'offrent pas de supériorité pour contrôler cette complication par rapport à l'accouchement par voie basse et peu de données soutiennent cette recommandation de césarienne systématique (Brighthouse and Guard 1992; Lind and Wallenburg 2002; Lurie et al. 1998). Par ailleurs, les chiffres de mortalité maternelle sont probablement surestimés et pessimistes par sous-déclaration des grossesses menées sans complication. Ainsi, sur 72 grossesses chez 36 patientes suivies dans notre centre, 67% ont été menées à terme, 21% étaient des fausses-couches spontanées, 11% des interruptions volontaires de grossesse et une était extra-utérine. L'âge moyen était de 28 ± 5 ans à la première grossesse et le terme 38 ± 2 semaines. Les poids et taille des nouveau-nés étaient dans les

normes par rapport au terme. Alors que la majorité des accouchements (75%) s'est compliqué, 1 patiente est décédée soit une mortalité maternelle de 3,8% et un taux de mortalité de 1,4%, par rapport au nombre de grossesses, bien loin des 12-25% classiquement rapportés (Frank et al. 2011). Le décès est survenu sur une rupture aortique. Une autre complication artérielle est à rapporter : une dissection vertébrale. Les complications se répartissent en déchirures périnéales lors de 24 (50%) d'accouchement par voie basse dont 9 déchirures complètes, et 15% d'hémorragies lors de césariennes, nécessitant dans 5 cas des transfusions sanguines pour choc hémorragique et la réalisation d'une hystérectomie d'hémostase. D'autres complications sont survenues : une rupture colique, une perforation vésicale et une rupture de pilier mitral. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Gilchrist et al. qui ne rapportent aucun décès sur 37 grossesses chez 8 femmes d'une même famille ayant au niveau moléculaire la substitution d'une glycine par une sérine en position 571 (Gilchrist et al. 1999). Parmi les 37 grossesses, 29 ont été menées à terme, 1 accouchement était prématuré à 26 semaines, 6 se sont arrêtées précocement en raison de fausses couches spontanées, et une était extra-utérine.

Le tableau 2-5 rassemble les données cliniques des grandes séries publiées, permettant d'apprécier la prévalence des critères majeurs et des critères mineurs ainsi que celles des complications dans le SEDv. Quand l'information est disponible, on peut noter que l'âge de diagnostic est plus tardif pour les cas apparentés ainsi que le tableau clinique plus frustré par comparaison aux cas index.

	Pepin et al. 2000		Oderich et al. 2005		Watanabe et al. 2008		Shalhub et al. 2014		Frank et al. 2015	
	cas	cas	cas	cas	cas	cas	cas	cas	cas	
	index	apparentés	index	apparentés	index	apparentés	index	apparentés	index	apparentés
	<i>N</i> =220	<i>N</i> =199	<i>N</i> =31		<i>N</i> =9		<i>N</i> =67		<i>N</i> =146	<i>N</i> =69
homme	55%	48%	48%				44%		39%	36%
âge (ans)	25 (12-37)	33 (17-49)	29 (18-40)		26		41 (8-70)		33 (24-43)	38 (19-49)
faciès caractéristique			29%				61%		82%	66%
peau fine translucide			77%		87%		57%		90%	87%
ecchymoses faciles			97%				76%		78%	68%
complication artérielle	46%		45%		87%		100%		80%	55%
complication digestive	19%		23%		44%		12%		36%	16%
complication utérine		—15%—	16%				3%		25%	17%
acrogérie									67%	48%
rétraction gingivale									15%	9%
hyperlaxité articulaire			58%				43%		38%	33%
rupture tendineuse/musculaire			13%				9%		11%	5%
pied bot			3%				9%		18%	8%
varices précoces			6%				13%		29%	22%
fistule carotido-caverneuse			3%				6%		10%	2%
Pneumothorax-hémithorax			16%		77%		22%		10%	5%
histoire familiale	38%		58%		44%		64%		28%	—

Tableau 2-4: Caractéristiques cliniques des grandes séries rapportées dans la littérature, de patients atteints de SEDv. L'âge est exprimé en médiane (25^{ème}-75^{ème} percentiles)

2.5.3 Aspects moléculaires

Le collagène de type III, tout comme les collagènes I, II, V et XI, est un collagène fibrillaire, classe des collagènes la plus abondante et la plus répandue dans le corps humain. Ces collagènes forment de longues fibrilles ordonnées dans les tissus de soutien. Le précurseur du collagène de type III, le procollagène de type III est formé d'un homotrimère de chaînes pro-alpha1 (III) de 300 nm de long (1467 acides aminés dont 1029 pour le domaine central) comportant un domaine central en triple hélice et des domaines globulaires N et C terminaux. Ces domaines sont ensuite clivés pour constituer le collagène de type III, élément de base des faisceaux de fibres de collagène (Figure 2-6).

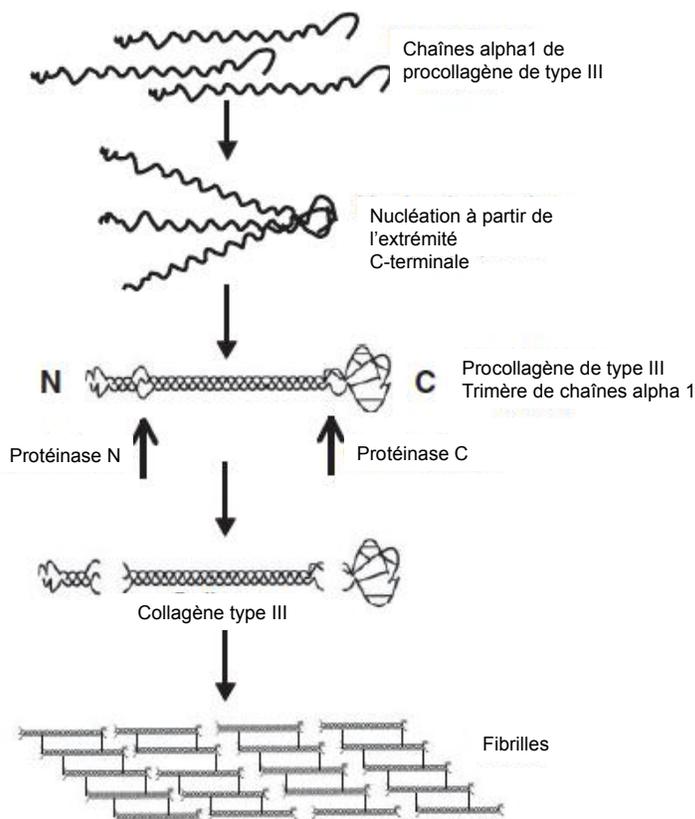


Figure 2-6 Résumé des étapes de synthèse du collagène de type III par les fibroblastes.

Les chaînes de procollagène sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Trois chaînes s'enroulent sur elles-mêmes pour former une triple hélice, à partir de leurs extrémités C-terminales. Dans le réticulum endoplasmique ont lieu toutes les modifications post-traductionnelles non représentées ici. Après le transport dans l'appareil de Golgi, et une fois sécrété en dehors de la cellule, le procollagène de type III voit ses extrémités N- et C-terminales clivées et le collagène ainsi formé, s'assemble avec le collagène de type I pour former des fibrilles consolidées par des liaisons covalentes entre les fibres. D'après (Canty and Kadler 2005)

2.5.3.1 Génétique

La stabilité de la triple hélice est étroitement liée à la conservation de sa structure primaire répétitive constituée de triplets d'acides aminés le premier étant invariablement une glycine —le plus petit des acides aminés— et les 2 suivants une proline, une hydroxyproline ou une lysine (motif Gly-X-Y) (Myllyharju and Kivirikko 2004). La chaîne pro-alpha1 (III) est codée par le gène COL3A1 situé sur le bras long du chromosome 2 en 2q24.3-q31 (Emanuel et al. 1985). Ce gène contient 51 exons répartis sur 44 kb d'ADN génomique. La plupart des mutations délétères 62% sont des mutations faux sens des résidus glycine qui empêchent la formation correcte de la triple hélice (Frank et al. 2015a; Pepin et al. 2000; Pepin et al. 2014).

Les mutations du gène COL3A1 les plus fréquemment rencontrées sont les mutations responsables d'une substitution d'une glycine du domaine de la triple hélice par un autre acide aminé (Frank et al. 2015a; Pepin et al. 2014). Dans le cas de substitution glycine, la formation de la triple-hélice avec une, deux, ou trois chaînes avec mutation est retardée à cause de l'encombrement stérique, comme démontré dans des fibroblastes de patients avec ostéogénèse imparfaite pour le collagène de type I (Vogel et al. 1988), et suspecté pour le collagène de type III dans des cellules de patients avec SEDV (Byers 1990; Tromp et al. 1995; Tromp et al. 1989a; Tromp et al. 1989b). Le collagène de type III anormal subit des modifications post-traductionnelles importantes et est sécrété plus lentement voir pas du tout, étant dégradé en intracellulaire (Byers et al. 1979; Byers et al. 1981; Superti-Furga and Steinmann 1988).

La première mutation du gène COL3A1 rapportée, concernait un patient de 22 ans portant une délétion hétérozygote de 3 kb, n'affectant pas la transcription d'où la production équivalente d'ARNm mutés et non mutés. Ils ont montré que cette délétion n'empêchait pas la transcription mais diminuait la sécrétion du procollagène de type III (Superti-Furga et al. 1988; Superti-Furga and Steinmann 1988). Les exons étant répétitifs, en phase, leur délétion peut conserver le cadre de lecture et donc la transcription traduction en protéine. Les mutations d'un site d'épissage conduisent ainsi le plus souvent à la

production d'une chaîne α tronquée avec un effet dominant négatif et non à une haploinsuffisance. Il y a alors une sécrétion d'homotrimères normaux et anormaux, car plus courts, qui vont se déposer dans la MEC. Schwarze et al. ont retrouvé seulement 2 patients avec mutations affectant le site accepteur d'épissage contre 28 pour le site donneur alors que Pope et al. en retrouvait 2 sur 5, et Giunta et Steinmann 1 sur 4 (Giunta and Steinmann 2000; Pope et al. 1996; Schwarze et al. 1997). La sous-représentation des mutations du site accepteur d'épissage suggère que par sélection d'un autre site d'épissage accepteur, avec décalage du cadre de lecture et la survenue d'un codon Stop prématuré, la conséquence en serait une haploinsuffisance.

Les mutations avec décalage du cadre de lecture, aboutissant à un codon Stop prématuré et donc à un défaut quantitatif du collagène de type III, appelé haploinsuffisance, ne sont pas prédominantes dans le SEDv (Frank et al. 2015a; Pepin et al. 2014). Le collagène de type III est dans cette situation qualitativement normal, mais produit en quantité insuffisante à partir de l'allèle sauvage restant (Leistriz et al. 2011; Schwarze et al. 2001). Le phénotype clinique n'en est pas moins sévère et même comparable aux patients avec SEDv, avec une forte prévalence des complications vasculaires (Schwarze et al. 2001).

2.5.3.2 Biochimie

La présence d'une chaîne mutée de procollagène au sein d'une triple hélice induit des anomalies conformationnelles sévères altérant le collagène de type III. La probabilité d'obtenir un homotrimère de chaînes alpha1 non-mutées est égale à $(\frac{1}{2})^3$ soit $\frac{1}{8}$. Les majorités des mutations hétérozygotes de COL3A1 ont donc un effet dominant négatif. Les patients atteints de SEDv présentent un collagène de type III altéré conduisant à une accumulation intracytoplasmique, une sécrétion diminuée, une stabilité moindre du trimère sécrété. Ces mutations sont responsables d'anomalies qualitatives du collagène de type III qui n'est plus sécrété mais s'accumule dans le réticulum endoplasmique granuleux du fibroblaste (Holbrook and Byers 1981).

Ainsi dans le cadre de saut d'exon sans décalage du cadre de lecture, il a été démontré chez un patient avec saut d'exon 25, que la production de collagène de type III se normalisait pour des températures inférieures à 37°C, à cause d'une diminution de la contrainte thermique sur la formation de la triple hélice (Lee et al. 1991) comme démontré chez un autre patient (Wu et al. 1993). Des délétions plus longues, sans décalage du cadre de lecture peuvent conduire à la production de 2 populations de collagène de type III, comme pour la délétion de 9.0 kb responsable d'un saut entre l'intron 33 et l'exon 48 et d'une perte de 413 acides aminés dans la séquence de la protéine (Vissing et al. 1991). Ainsi les molécules de procollagène de type III avec homotrimères de chaînes alpha normales, et celles avec homotrimères de chaînes alpha mutées étaient décrites comme thermostables et sécrétées, à la différence des homotrimères mixant les 2 types de chaîne (Vissing et al. 1991).

Les études biochimiques s'effectuent à partir de l'extraction du collagène radiomarqué soit extracellulaire, sécrété dans le milieu de culture, soit intracellulaire de cultures de fibroblastes cutanés de patients. La migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide-SDS (sodium dodécyl sulfate) (Figure 2-7) permet de mettre en évidence un défaut quantitatif (quantité moindre en cas

d'haploinsuffisance), et un défaut qualitatif (migration perturbée par augmentation des modifications post-traductionnelles) (de Paepe 1994; Mizuno et al. 2013; Pope et al. 1996).

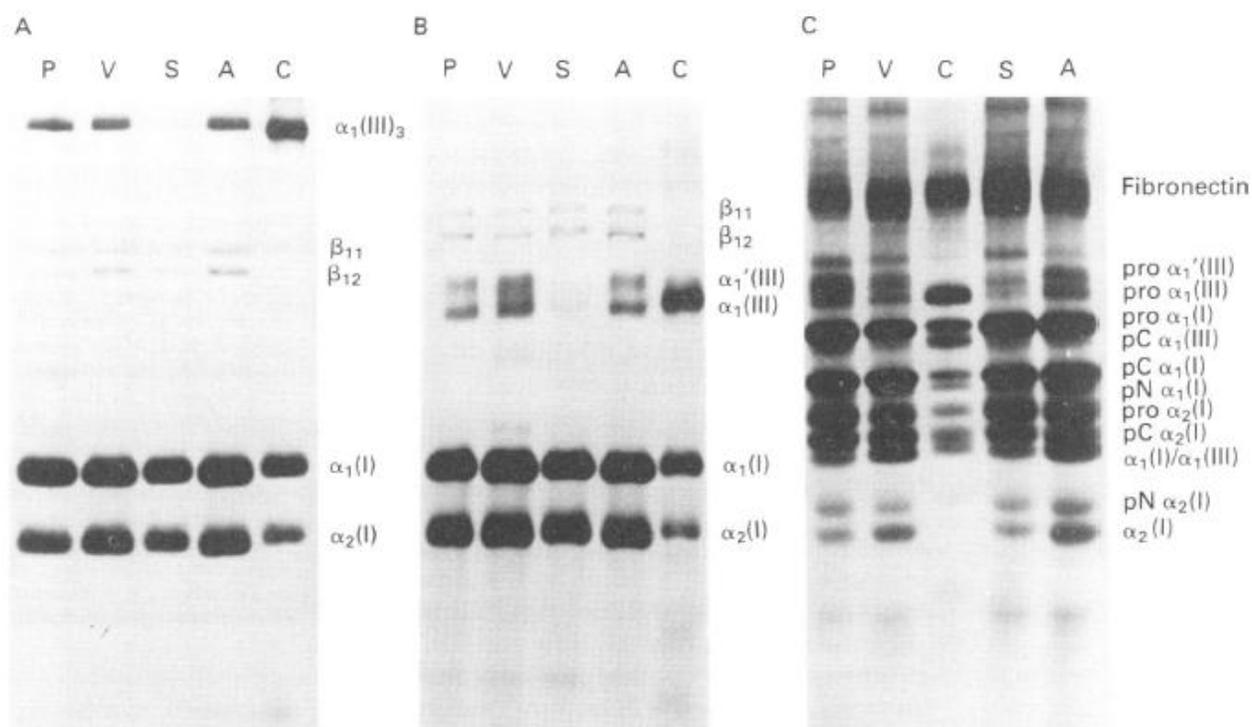


Figure 2-7: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide sodium dodécyl sulfate, des collagènes et procollagènes des cellules d'un patient atteint de SEDv (P: péritoine, V: vein, S: skin: peau, A: artère) et de cellules de peau d'un sujet contrôlé (C: contrôle). D'après (Nuytinck et al. 1992)

A: séparation des collagènes non réduits, traités par pepsine. La bande $\alpha_1(\text{III})$ trimère est moins intense, surtout dans la peau du patient SEDv que la bande contrôle.

B: Après lente réduction, les chaînes $\alpha_1(\text{III})$ migrent comme monomères. Tous les tissus du patients SEDv donnent un aspect de double bande $\alpha_1(\text{III})$ et $\alpha'_1(\text{III})$ alors que le témoin ne donne qu'une seule entité.

C: Séparation des procollagènes sécrétés dans le milieu par les cellules du patient SEDv montrant toujours les deux bandes $\alpha_1(\text{III})$ et $\alpha'_1(\text{III})$ alors que le témoin ne donne qu'une seule entité. Le procollagène (I) est comparable entre le patient SEDv et le contrôle.

Bien que le collagène de type III ne représente que 10 à 22% du collagène total de la peau normale, chez les patients atteints de SEDv sa réduction est responsable d'une amincissement de la peau jusqu'au $\frac{1}{4}$ de la normale et d'une déstructuration architecturale. Smith et al ont analysé des échantillons de peau dont l'épaisseur variait entre 0,66 et 1,54 mm pour 22 patients avec mutation du gène COL3A1 contre $1,25 \pm 0,25$ mm chez 14 témoins (Smith et al. 1997). Les fibres élastiques étaient plus nombreuses, les fibres de collagène plus fines et plus éparses et dispersées en cas de SEDv (Figure 2-8). Par ailleurs, les substitutions glycines proches de l'extrémité C-terminale étaient associés à une accumulation intense du collagène dans le réticulum endoplasmique granuleux, et une réduction plus prononcée du diamètre des

fibrilles de collagène : 65–80 nm contre 95–110 nm chez les échantillons contrôles et 80–90nm chez les patients avec substitutions glycine et sauts d'exon dans le domaine de la triple hélice et 85–120 en cas de substitutions glycine ou sauts d'exon proches de l'extrémité N-terminale. Chez ces derniers, l'accumulation protéique du réticulum était moins marquée (Smith et al. 1997).

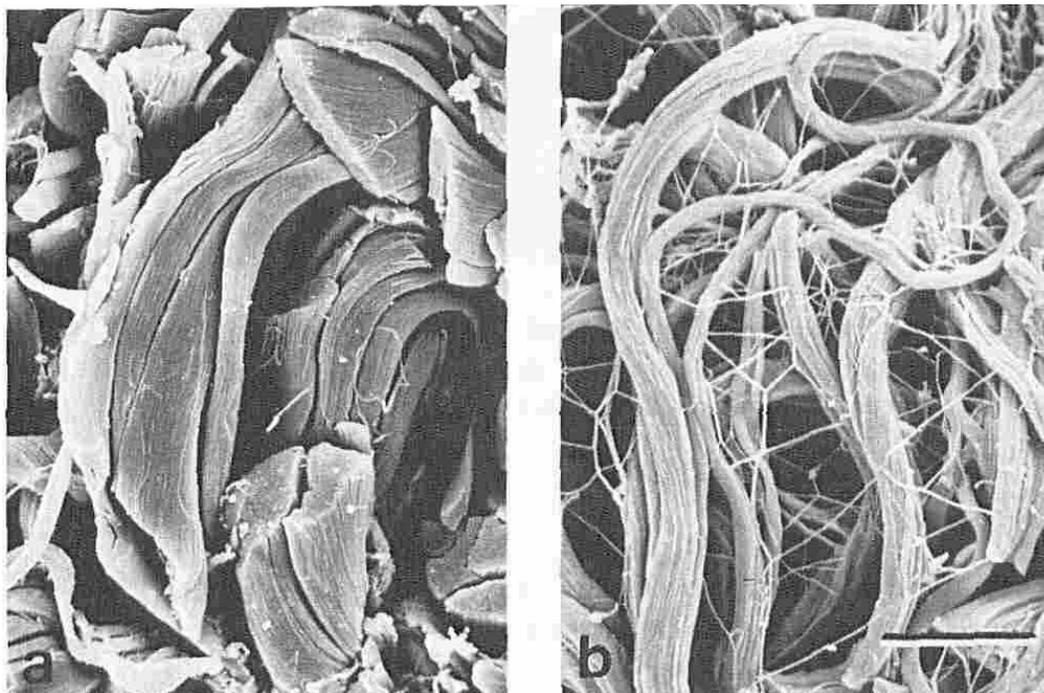


Figure 2-8: Imagerie en microscopie électronique de fibres de collagène d'une biopsie de peau d'un témoin (a) et d'un patient atteint de SEDv (b). L'échelle représente 10µM. in (Smith et al. 1997)

En histologie, les fibrilles de collagène sont petites, et de diamètres très variables. Les fibres élastiques apparaissent relativement abondantes du fait de la diminution de la quantité de collagène.

En microscopie optique et en microscopie électronique, l'étude des fibroblastes cutanés retrouve un agencement des fibres de collagènes altérées (Figure 2-8) aux diamètres d'une trop grande variabilité, des fibres élastiques fractionnées et réticulum endoplasmique dilaté témoignant d'une rétention protéique (Masuno et al. 2012; Ong et al. 2012). L'histologie artérielle retrouve elle une paroi vasculaire amincie, une diminution quantitative en collagène, et une déstructuration du réseau fibrillaire de la MEC (Germain 2002).

2.5.4 Traitements

Le traitement des complications artérielles en dehors de l'urgence vitales est conservateur. Les gestes invasifs et notamment les ponctions artérielles sont contre-indiqués.

2.5.4.1 Prévention

La prévention des complications artérielles occupe une place importante dans la prise en charge des patients avec SEDv. On recommande d'éviter les sports de contact et/ou sources de traumatismes, les médicaments vasopresseurs, les efforts à glotte fermée et, notamment le port de charges lourdes. De par le risque de rupture artérielle spontanée, de perforation digestive, de rupture utérine, Il existe une carte de soins d'urgence « Syndrome d'Ehlers-Danlos Vasculaire », éditée par la direction générale de la santé dans le cadre du plan national des maladies rares, destinée à améliorer la coordination des soins et la circulation des informations médicales (Figure 2-9). Des recommandations en cas d'anesthésie, de chirurgie existent préconisant d'éviter procédures invasives en dehors de l'urgence, les prélèvements artériels, les poussées hypertensives par manipulation d'agents vasopresseurs (Figure 2-9).



Gestes responsables de iatrogénie qu'il faut éviter dans le SEDv.

1. Gazométrie artérielle, artériographie, coronarographie

Le risque est celui d'une dissection ou rupture au point de ponction.

- Leur morbidité est évaluée de 17 % à 37 % selon les séries.
- Leur mortalité est évaluée de 6 % à 20 % selon les séries.

2. Coloscopie et lavement baryté

Le risque est celui d'une rupture colique liée à l'insufflation.

3. Hystéroggraphie, hystéroscopie, dispositifs et gestes endo-utérins

Le risque est celui d'une rupture utérine.

4. Médicaments

• Médicaments vasopresseurs (risque vasculaire) :

- médicaments utilisés dans le traitement de la crise migraineuse, dérivés de l'ergot de seigle,
- médicaments utilisés dans le traitement des rhinites (oxymétazoline type Aturgyl®, pseudoéphédrine type Actifed®) y compris ceux délivrables sans ordonnance.

• Médicaments responsables d'un ralentissement du transit (risque digestif) :

- morphiniques,
- psychotropes à effets secondaires atropiniques,
- vérapamil (Isoptine®).

Figure 2-9: Carte de soins et d'urgence éditée par la direction générale de la santé et gestes à risque de complication au cours du SEDv. D'après (Frank 2009; Messas et al. 2009).

2.5.4.2 Traitement médicamenteux

Il n'y a pas de traitement curatif. Les traitements symptomatiques visent à diminuer les épisodes de toux en prévention des complications pulmonaires et à lutter contre la constipation qui expose au risque de perforation colique.

En revanche, le bénéfice d'un traitement diminuant la contrainte pariétale sur la diminution des complications artérielles a été démontrée par l'étude BBEST (Beta-Blockers in Ehlers-Danlos Syndrome Treatment) (Ong et al. 2010). Le traitement à l'étude était le céliprolol, un bêtabloquant β_1 antagoniste et β_2 agoniste partiel avec effet vasodilatateur périphérique chez 25 patients avec SEDv comparés à 28 patients SEDv sous placebo. A la posologie de 400mg par jour le céliprolol a permis de diminuer de 69% le risque de dissection ou rupture artérielle comparativement au placebo (Ong et al. 2010). L'essai a été interrompu précocement en raison de la supériorité du groupe traité et de la futilité à poursuivre l'essai. Lors de la conception de l'essai thérapeutique en 2000, les critères d'inclusion avaient été choisis sur le diagnostic de SEDv selon les critères de Villefrance-sur-Mer de 1997 (Beighton et al. 1998). L'analyse a posteriori des génotypes des patients inclus a retrouvé 33 patients avec mutation du gène COL3A1 : 13 dans le groupe céliprolol et 20 dans le groupe placebo. Néanmoins, le bénéfice était toujours supérieur pour le céliprolol dans l'analyse en sous-groupe des patients avec mutation (Figure 2-10).

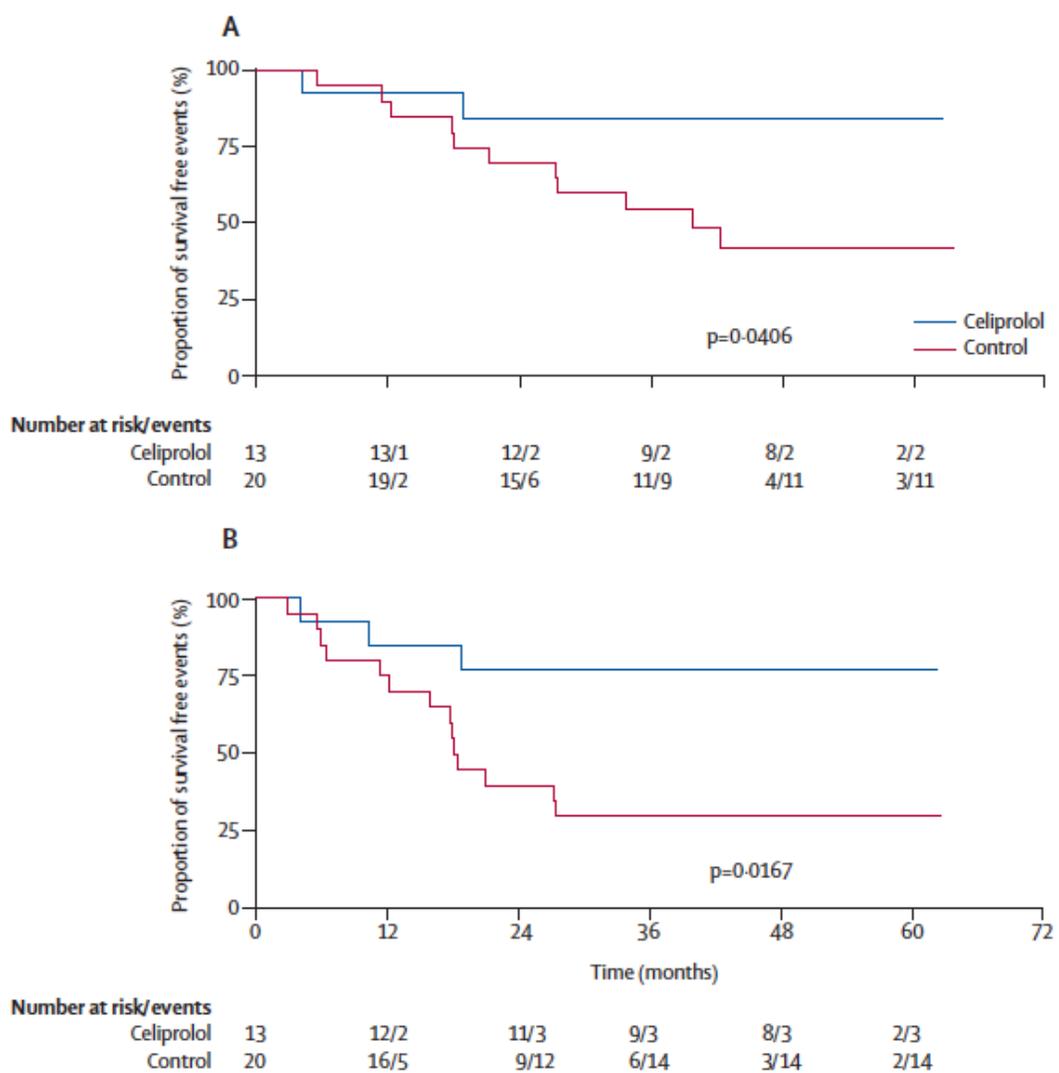


Figure 2-10: Courbe de survie chez 33 patients SEDv moléculairement prouvés, avec ou sans Celiprolol (A) sans évènement cardiaque ou artériel (dissection ou rupture) ; (B) sans évènement digestif (rupture), utérin (rupture) ou tout évènement relié au SEDv. In (Ong et al. 2010)

2.5.4.3 Traitements chirurgicaux et endovasculaires des complications artérielles

Sur 15 patients rapportés par Oderich et al. (Oderich et al. 2005) 30 gestes opératoires ont été effectués : 70% des interventions en urgence : rupture artérielle avec saignement actif : 47%, anévrisme de grande taille (33%), extension rapide de l'anévrisme (7%). La moitié des gestes chirurgicaux ont consisté en pontage ou remplacement prothétique et une néphrectomie d'hémostase, l'autre moitié en procédures endovasculaires. Quatorze procédures se sont compliquées : saignements abondants (37%), nécessitant une reprise chirurgicale dans 20% des cas, complications pulmonaires (20%), insuffisance rénale (10%), un arrêt cardiaque récupéré et 3 décès intra-hospitaliers. A plus long terme, après un suivi médian de 7,7 ans, 40% de complications de ces gestes chirurgicaux avec évolution anévrismale des anastomoses, rupture d'anastomose, thrombose de pontage, nécessitant toutes une reprise chirurgicale.

Sur les 32 cas rapportés par Pepin et al. de chirurgie aortique la mortalité s'élevait à 39% (Pepin et al. 2014). Enfin, Brooke et al. rapportent les gestes vasculaires effectués chez 9 patients avec SEDv (Brooke et al. 2010). Des embolisations artérielles ont été pratiquées pour 3 d'entre eux, dont une en urgence, sans nécessité transfusions sanguines, sans mortalité per procédure ou durant le séjour hospitalier de 1 à 6 jours. Les abords fémoraux étaient chirurgicaux, permettant d'exposer l'artère et d'effectuer une suture en U à la fin de la procédure associée à un renforcement de la paroi par un lacet circonférentiel. Une récurrence d'anévrisme artériel à 2 ans ½ de la première procédure (embolisation d'anévrisme splénique) est rapportée. Neuf chirurgies à ciel ouvert ont été pratiquées : 5 pour anévrisme de l'aorte thoracique, 4 pour anévrisme de l'aorte abdominale. Les recours transfusionnels étaient de 4 à 26 concentrés érythrocytaires, 1 à 4 concentrés plaquettaires et 4 à 19 plasmas frais congelés, ressources plus importantes que pour les autres types de SED opérés témoignant du risque hémorragique supérieur du SEDv et de procédures plus complexes. La mortalité était de 22% : 1 patient per-procédure, 1 patient durant son séjour intrahospitalier, et 3 patients ont présenté des complications dont un hématome sternal nécessitant un drainage et une plaie du canal thoracique traitée médicalement.

De nombreux cas cliniques de traitement endovasculaire ont été décrits : cure d'anévrisme aortique sous-rénal par endoprothèse (Bade et al. 2007), embolisation de faux anévrisme d'artère hépatique (Naidu et al. 2007), de rupture d'artère sous-clavière (Iida et al. 2009), stenting couvert d'une rupture d'artère et veine sous-clavière (Raval et al. 2012), d'un anévrisme iliaque (Tonnessen et al. 2007), d'un anévrisme d'artère hépatique (Dalainas 2008).

Après artériographie, des hématomes au point de ponction (Figure 2-11), une rupture carotidienne lors d'une procédure d'embolisation d'une fistule carotido-caverneuse soit un taux de complication de 23% sont survenus (Oderich et al. 2005; Slingenber 1980).

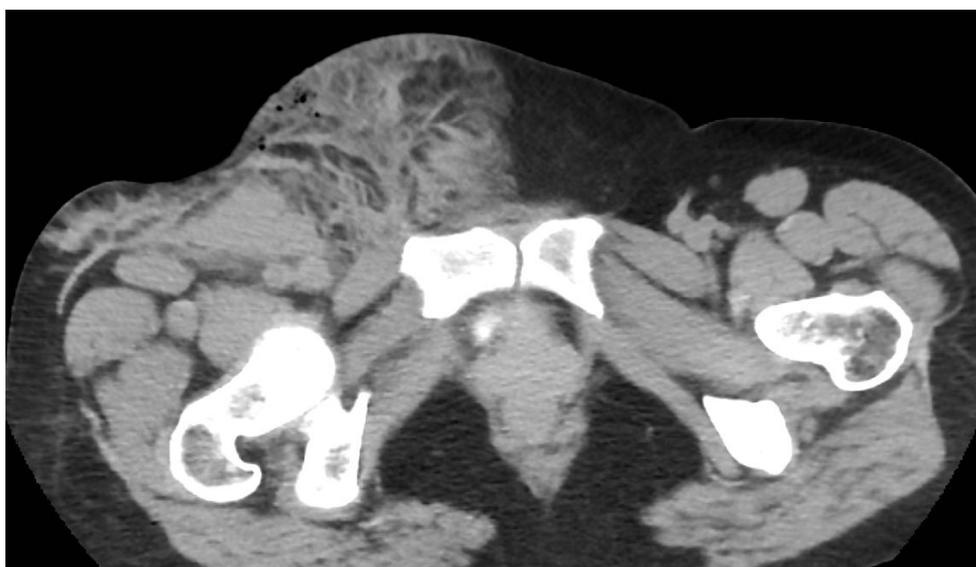


Figure 2-11: Hématome au point de ponction fémorale d'une artériographie chez une patiente atteinte de SEDv

Dans notre centre de référence, entre Janvier 2000 et Septembre 2012, 84 patients (100%) sur un total de 154 familles avec SEDv moléculairement prouvé, ont eu des évaluations vasculaires régulières, dont 35 (42%) ont eu un accident artériel aigu nécessitant une hospitalisation (Okada et al. 2014). Parmi eux, 5 patients (6%) ont été traités par voie endovasculaire en raison d'une rupture artérielle engageant le pronostic vital. L'âge moyen de ces patients était de 29,8 (24-36) ans et le ratio homme-femme de 1:4. Toutes les procédures ont permis d'arrêter le saignement, parfois après une seconde tentative pour 2 patients. Parmi les cinq patients traités, un seul décès est survenu; les 4 autres patients étaient encore

en vie après un suivi moyen de 19,4 (1-74,7) mois. Le taux de survie en face d'une rupture artérielle menaçant le pronostic vital était de 80% une fois traitée par embolisation. Des complications sont survenues au cours de 3 procédures (43%). Une dissection artérielle en aval du site de largage du coil, ne nécessitant pas d'embolisation supplémentaire, et pour 2 patients, une rupture de l'artère lors l'embolisation par coil de son lit d'aval, nécessitant de la colle pour traiter la fuite et emboliser l'artère proximale. Grâce aux précautions prises lors des procédures, par une équipe expérimentée, une seule (14%) complication au point de ponction a été observée. Un pseudo-anévrisme de l'artère fémorale commune droite a évolué spontanément vers la thrombose après un suivi de 18 mois. Un nouvel événement artériel est survenu dans le mois suivant 3 procédures. Pour un patient, l'artère embolisée a présenté un nouvel anévrisme nécessitant une nouvelle procédure, alors que pour les 2 autres patients, les anévrismes sont apparus sur des artères indemnes de lésion auparavant, et aucun guide, ou cathéter n'y avaient été introduits lors de la procédure initiale. Ils ont été traités médicalement avec succès.

2.5.4.4 Approche conservative des complications artérielles

Quarante-deux lésions artérielles chez 15 patients ont été surveillées pendant une médiane de 8,6 ans (Oderich et al. 2005). On retrouve 4 décès (27%) dont 2 de complications vasculaires sans lésions préexistantes. Six des 42 lésions connues se sont compliquées : 3 ruptures (dont 2 fatales), 3 extensions de la dissection, 2 évolutions anévrismales. Cinq patients enfin ont développé un total de 31 nouvelles lésions vasculaires.

2.5.4.5 Traitements chirurgicaux des complications digestives

Les patients pris en charge précocement sont opérés pour une colectomie partielle ou totale et vivent avec une stomie. La fréquence des récives (28-50%) sur le colon restant, certaines équipes recommandent la colectomie totale dès la première perforation (Freeman et al. 1996; Pepin et al. 2000; Stillman et al. 1991). Le rétablissement de la continuité est compliqué et craint du chirurgien du fait de la fragilité du tissu et du risque de lâchage des sutures (Fuchs and Fishman 2004; Yoneda et al. 2014).

Néanmoins, dans la série de 52 cas de rupture du sigmoïde de Pepin et al. 9 (17%) patients décèdent et 25 (48%) ont un rétablissement de la continuité après plusieurs mois (Pepin et al. 2014).

3 Propriétés élastiques de la paroi artérielle par l'étude la vitesse de l'onde de pouls

La vitesse de l'onde de pouls (VOP) est largement utilisée pour déterminer la rigidité artérielle, qui est considérée comme un marqueur précoce des lésions vasculaires et un facteur pronostique du risque cardiovasculaire (van Bortel et al. 2012). La VOP est directement liée au module de Young, et donc à l'élasticité de la paroi artérielle. La rigidité artérielle est le plus souvent évaluée soit par mesure de la VOP (Davies and Struthers 2003; O'Rourke et al. 2001; Rajzer et al. 2008), soit par l'analyse des variations locales de la pression locale et du volume (Brands et al. 1999; Brands et al. 1998; Hoeks et al. 1999). À ce jour, les techniques de référence pour l'évaluation de la rigidité de la paroi artérielle sont respectivement des méthodes qui soit mesurent la VOP régionale, comme le Complior® (Alam medical, Vincennes, France) ou le SphygmoCor® (ArtCor medical, West Ryde, Australie)(Rajzer et al. 2008), soit mesurent les variations du diamètre des artères et de la pression artérielle et produit une mesure locale de la rigidité artérielle, appelé, écho-tracking, qui est réalisée en utilisant le système d'échographie Artlab® (Esaote, Italie) (Brands et al. 1998; Brands et al. 1999; Hoeks et al. 1999). Une nouvelle technologie actuellement en développement est l'échographie ultrarapide UltrafastEcho ou Ultrafast Ultrasound Imaging sur le système d'échographie Aixplorer® (SuperSonic Imagine, Aix-en-Provence, France) qui permet de visualiser en direct et de mesurer la VOP localement (Couade et al. 2011; Montaldo et al. 2009).

3.1 VOP et rigidité artérielle

L'ouverture de la valve aortique lors de la contraction myocardique, engendre une onde de pression se propageant le long des artères et propulsant le sang avec, il s'agit de l'onde de pouls (Davies and Struthers 2003). La vitesse de propagation de l'onde de pouls le long de la paroi artérielle peut être estimée par le temps (T) que met l'onde à parcourir la distance (D) entre un point A et un point B de l'arbre artériel.

$$V \left(\frac{\text{m}}{\text{s}} \right) = \frac{D \text{ (m)}}{T \text{ (s)}} = \frac{x_B - x_A}{t_B - t_A}$$

La résolution temporelle est nécessairement élevée, de l'ordre de la milliseconde, pour capturer l'onde de pouls se propageant le long de la paroi artérielle. En effet la vitesse de celle-ci est de plusieurs mètres à quelques dizaines de mètres par seconde (selon l'âge, le sexe, la pathologie sous-jacente...). En admettant qu'une artère est un tube élastique, linéaire, isotrope, et que la perturbation mécanique est lente, on peut démontrer que la vitesse de propagation (c), dans ce tube, est directement dépendante de l'épaisseur de la paroi artérielle (h), du rayon de l'artère (R), de la densité du contenu (ρ) et de l'élasticité ou module de Young (E) de la paroi artérielle le long de laquelle l'onde progresse

$$c = \sqrt{\frac{Eh}{2\rho R}}$$

Cette formule, formule de Moens et Korteweg, montre que (c) est un indicateur de la rigidité artérielle puisque (c) est directement relié à (E) le module de Young. La formule de Moens et Korteweg rappelle également la relation de la vitesse de propagation avec le diamètre de l'artère et l'épaisseur de sa paroi.

3.2 Mesure de la VOP régionale

La VOP carotido-fémorale est habituellement acceptée comme le standard pour mesurer la rigidité aortique (Safar et al. 2002). C'est une mesure de l'élasticité sur le modèle de propagation de l'onde entre 2 points de mesure. Le résultat est une vitesse moyenne entre l'artère carotide et l'artère fémorale, et représente la rigidité de l'aorte. On parle de VOP régionale puisque cette VOP intègre l'ensemble des VOP locales de l'arbre artériel entre la sortie du cœur et la bifurcation aortique vers les jambes. Cette VOP offre également un aperçu de la rigidité aortique contre laquelle le ventricule gauche doit lutter pendant l'éjection systolique, c'est la post-charge. La pression résultante de l'éjection systolique et de la rigidité aortique s'applique ensuite directement aux organes cibles (cœur, reins, cerveau). Ainsi la rigidité aortique est responsable de phénomènes physiopathologiques qui finissent par provoquer des complications cardio-vasculaires. C'est la raison pour laquelle la VOP carotido-fémorale, à elle seule, a été validée comme facteur de risque indépendant d'événements cardiovasculaires. La VOP est généralement mesurée à partir du « pied » de l'enregistrement de l'onde de pression artérielle, détectée par flux Doppler, ou par la vague de distension de la paroi. En effet, au passage de l'onde de pouls, l'artère se dilate, son diamètre augmente. Les enregistrements simultanés en carotidien et en fémoral permettent de mesurer le décalage temporel entre ces 2 sites. La distance entre les deux sites d'enregistrement est habituellement mesurée avec une règle. Certains chercheurs recommandent de mesurer la distance entre la carotide et des sites fémoraux; d'autres conseillent de mesurer entre la fourchette sternale et le site fémoral. Des publications récentes portent spécifiquement sur la technique de mesure de la VOP (Laurent et al. 2006; Paini et al. 2006; van Bortel et al. 2012). Les dernières recommandations européennes 2013 de l'European society of Hypertension (ESH) réaffirment le bien fondé d'une recherche d'atteinte asymptomatique d'organe secondaire à l'hypertension par la mesure de l'épaisseur intima media et l'évaluation de la rigidité artérielle (ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension 2013). Cependant, il faut se rappeler que les recommandations

2007 soulignaient déjà la mauvaise diffusion des appareils d'évaluation de la rigidité artérielle (SphygmoCor® ou Complior®) et donc probablement l'absence de véritable impact du marqueur en termes de santé publique (Laurent et al. 2006). La VOP carotido-fémorale ou VOP aortique a été largement étudiée comme marqueur de substitution de la présence et l'évolution de maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose (Meaume et al. 2001). Elle est reconnue comme facteur de risque indépendant d'événement cardiovasculaire tel qu'un syndrome coronaire aigu ou un accident vasculaire cérébral (Cavalcante et al. 2011; Laurent et al. 2001; Laurent et al. 2003). Ainsi dans l'évaluation du risque cardiovasculaire global d'un patient, un seuil de VOP supérieur ou égal à 10 m/s a été retenu pour classer les patients à haut risque (van Bortel et al. 2012). Cette valeur est basée sur la mesure de la VOP carotido-fémorale. La faisabilité de cette technique est proche de 100% et la reproductibilité est bonne avec une variation de $\pm 0,5$ m/s (van Bortel et al. 2012).

Il faut toutefois relever plusieurs limitations à cette technique :

- i) la mesure de la VOP reste d'usage confidentiel étant donné la nécessité de s'équiper d'un matériel particulier, dédié à cette mesure.
- ii) cet examen n'est pas remboursé par la sécurité sociale en France.
- iii) cette technique ne permet pas de mesurer une VOP locale, et donc de détecter des différences selon les territoires.
- iv) elle fait donc l'hypothèse que la rigidité artérielle est constante tout le long du trajet de l'onde de pouls,
- v) et qu'elle ne varie au cours du cycle cardiaque.
- vi) certaines situations peuvent fausser la mesure, notamment en cas d'obésité, de méga-dolicho-artères, de distension thoracique, faussant la distance entre les points étudiés (Laurent et al. 2006).

C'est pourquoi, durant ces dernières décennies, la VOP locale a été de plus en plus utilisée et étudiée à l'aide de différentes techniques.

3.3 Évaluation de la rigidité artérielle locale en imagerie par résonance magnétique

A la différence de la VOP carotido-fémoral, l'évaluation de la rigidité artérielle en imagerie par résonance magnétique (IRM) permet notamment l'étude d'un segment aortique plus localisé. L'IRM comporte plusieurs avantages sur l'échographie-Doppler. En effet, en IRM le vaisseau étudié est imagé dans les 3 plans de l'espace, permettant de construire un plan parfaitement perpendiculaire à l'axe du vaisseau pour l'analyse des variations des diamètres aortiques au cours du cycle cardiaque, utiles au calcul des compliance et distensibilité aortiques. Les séquences utilisées sont en écho de spin ou écho de gradient avec un asservissement au tracé électrocardiographique (Metafratzi et al. 2002). Ainsi, dès 1989, Mohiaddin et al. rapportaient dans une étude par IRM sur 70 témoins, 13 athlètes et 17 patients coronariens, une diminution de la compliance aortique chez les patients coronariens contre une augmentation chez les athlètes comparativement aux témoins (Mohiaddin et al. 1989). Grotenhuis et al. ont également mis en évidence une diminution de la distensibilité aortique des patients avec bicuspidie aortique comparés à des sujets témoins (Grotenhuis et al. 2007). Par ailleurs, 2 sites aortiques distants, peuvent être étudiés simultanément lors d'une seule acquisition en contraste de phase, la distance entre ces 2 sites étant mesurable précisément. Ceci permet de déterminer avec fiabilité la VOP aortique entre les 2 sites d'analyse (Bolster et al. 1998; Hardy et al. 1994; Rogers et al. 2001). Redheuil et al. ont quant à eux utilisé à la fois la distensibilité de l'aorte ascendante mais également la VOP de l'arche aortique (Redheuil et al. 2010). Avec l'âge la distensibilité diminue de $13,6 \text{ kPa}^{-1} \times 10^{-3}$ alors que la VOP augmente d'1,6 m/s par décennie, et l'IRM offre une meilleure corrélation comparée à la VOP carotido-fémorale chez les mêmes sujets.

L'IRM présente comme avantage d'être une technique d'imagerie non irradiante, tridimensionnelle, évaluant distensibilité et VOP aortique, mais elle nécessite un temps d'analyse assez long, réduisant sa disponibilité, et a un coût élevé comparativement aux autres techniques (Cavalcante et al. 2011).

3.4 Évaluation de la rigidité artérielle locale par intensité d'onde

La méthode de la boucle pression-vitesse du flux : PU-loop method en anglais où (P) est la pression et (U) la vitesse du flux, est une technique où ces 2 paramètres sont simultanément enregistrés sur un même site. En début de systole, un segment de cette boucle est linéaire et sa pente est égale à ρc , où ρ est la densité du sang et c la VOP locale (Khir et al. 2001). Afin de s'affranchir de la mesure invasive de la pression locale, une approximation est effectuée, basée sur la variation du diamètre de l'artère étudiée. Les résultats de cette technique de calcul ont été extrapolés à partir des données recueillies sur les 1174 sujets de l'étude Asklepios (Rietzschel et al. 2007). Les résultats sont encourageants, mais la technique reste encore expérimentale et les acquisitions des variations de diamètre et de vitesse du flux au cours du cycle cardiaque sont séparées (Borlotti et al. 2012).

3.5 Évaluation de la rigidité artérielle locale par échotracking.

L'échotracking était jusqu'à peu l'unique outil capable d'évaluer localement le module de Young d'une artère, la relation entre l'épaisseur intima-média, les propriétés viscoélastiques du sang, et l'influence du remodelage concentrique ou excentrique de la paroi artérielle (Brands et al. 1998; Brands et al. 1999; Hoeks et al. 1999). Cette technique s'appuie sur le calcul de la rigidité artérielle locale via les variations de pression et de volume locales. L'échotracking mesure :

- le diamètre diastolique (D) de l'artère pour en déduire la surface de la lumière de l'artère (A);
- la variation de ce diamètre au cours du cycle cardiaque, afin de calculer la variation systolo-diastolique de la lumière de l'artère (ΔA);

- l'épaisseur de la paroi artérielle (h);
- la variation systolo-diastolique de la pression artérielle, localement, (ΔP).

Les propriétés mécanique du vaisseau telles que distensibilité (DC), compliance (CC), et module de Young (Y), sont déduits selon l'équation suivante à partir des paramètres mesurés (Brands et al. 1999):

$$A = \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2; \quad DC = \frac{\Delta A}{\Delta P}; \quad CC = \frac{\Delta A}{\Delta P}; \quad Y = \frac{D}{h} \times \frac{1}{DC}$$

Toutefois deux assumptions sont faites :

- les distensibilité (DC) et compliance (CC) de la paroi de l'artère étudiée sont constantes sur la plage de pression s'étendant de la pression diastolique à la pression systolique, au cours du cycle cardiaque,
- la longueur du segment artériel étudié est constante au cours du cycle cardiaque.

En pratique, la résolution spatiale des appareils commerciaux d'échographie est insuffisante et ne peut précisément évaluer la variation des diamètres de l'artère entre la diastole et la systole. Elle est d'environ $100\mu\text{m}$ (taille d'un pixel de l'image vidéo) alors qu'il faudrait quelques microns. De même la résolution temporelle est de quelques dizaines de millisecondes (balayage maximal de 100 Hz) alors qu'il serait nécessaire d'échantillonner toutes les quelques millisecondes. La technique échotracking a donc été développée afin d'offrir des résolutions tant spatiale que temporelle accrues (Brands et al. 1999; Meinders et al. 2001). Par l'intermédiaire des cristaux piezo-électriques de la sonde d'échographie, le signal acoustique est transformé en signal électrique. C'est directement ce signal radiofréquence qui est analysé permettant d'accroître la résolution spatiale de 6 à 10 fois et celle temporelle de 10 fois par rapport aux appareils d'échographie conventionnels. En effet, la résolution de ces derniers est limitée par la vitesse de calcul afin de générer le pixel vidéo à partir du signal acoustique. L'échotracking permet aussi une mesure fiable et précise de l'épaisseur intima-média nécessaire pour le calcul du module de

Young. Ainsi les performances de l'échotracking permettent de calculer une rigidité locale via la mesure de la distensibilité de l'artère et du régime de pression auquel elle est soumise.

Mais cette technique présente également des limitations rendant difficiles son application en routine :

- i) l'acquisition en echotracking est beaucoup plus longue que la mesure de la VOP, ce qui explique probablement son absence parmi les grandes études épidémiologiques et dans les services cliniques
- ii) une limitation majeure est la capacité d'évaluation de la pression locale, i.e. là où les paramètres biométriques sont mesurés, et sa variation au cours du cycle cardiaque (ΔP). La variation locale de pression artérielle peut être étudiée par un tonomètre d'applanation. Toutefois cette technique a recours à une fonction de transfert pour donner les valeurs en mmHg (Hoeks et al. 1990). La pression artérielle mesurée à l'artère brachiale, lorsque le segment artériel étudié est la carotide commune, reste une approximation bien que les valeurs de pression artérielle varient d'un site à l'autre. Cette approximation semble valable d'après les travaux de Reneman (Reneman et al. 1992). C'est tout de même l'imprécision de la mesure de la pression intra-artérielle locale qui restreint l'utilisation de cette technique en pratique clinique;
- iii) L'évaluation de la VOP locale est limitée aux artères assez superficielles comme la carotide commune (Laurent et al. 2001). La carotide est réputée être la sentinelle de l'aorte dans la progression des lésions d'athérosclérose ce qui justifie le choix de ce site d'étude. D'autres équipes ont cherché à évaluer la VOP locale au niveau de l'aorte elle-même par l'utilisation d'imagerie par résonance magnétique et de séquences dédiées (Bolster et al. 1998; Li et al. 2010). Cependant, la technique reste limitée par les résolutions spatiale et temporelle requises pour étudier le phénomène, et par son coût, expliquant que la majorité des études

épidémiologiques et pharmacologiques sont restées sur les techniques conventionnelles de mesure de la VOP.

3.6 Évaluation de la VOP locale par échographie ultrarapide

L'échographie est la modalité d'imagerie la plus utilisée en clinique. Cette méthode ultrasonore est temps réel, non-invasive, rapide et peu coûteuse. Pour faire une image échographique avec un appareil « classique » on focalise en émission une onde ultrasonore avec des retards de telle sorte que les ondes se rencontrent sur une ligne de l'image. Les hétérogénéités du milieu, le long de la ligne, réfléchissent l'onde focalisée et on enregistre les signaux rétrodiffusés. L'image de cette ligne est reconstruite en adaptant les lois de retard en réception. A chaque ligne de l'image l'opération de focalisation-réception est répétée soit une centaine de fois pour reconstruire l'image en entier (Figure 4-1). Avec cette méthode de tirs focalisés, on peut acquérir une image en temps réel à 50-100 images par seconde.

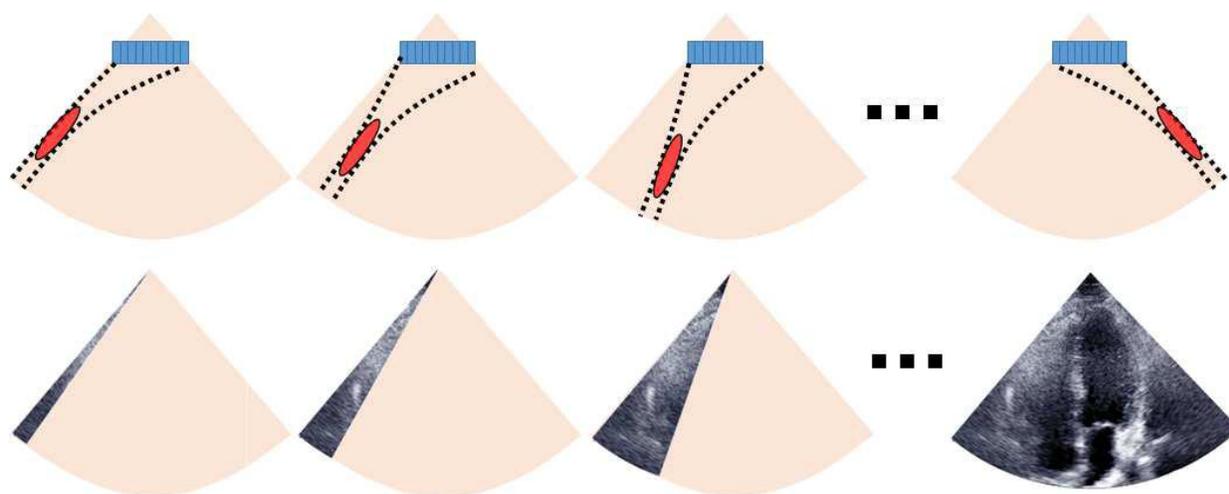


Figure 3-1 : Principe de la formation d'une image en imagerie ultrasonore classique (ici en échocardiographie). Une première onde est focalisée le long d'une ligne du milieu en ajustant la loi de retard à l'émission. Les signaux rétrodiffusés permettent de reconstruire une ligne de l'image en appliquant une focalisation dynamique en réception. Ensuite, une deuxième onde est focalisée sur la ligne à côté. De la même manière, les signaux rétrodiffusés permettent de reconstruire la ligne de l'image en appliquant une focalisation dynamique en réception. En balayant le faisceau sur une centaine de lignes, une image complète est reconstruite.

Une nouvelle technique d'imagerie ultrarapide par ultrasons, appelé UltrafastEcho ou Ultrafast Ultrasound Imaging (Montaldo et al. 2009; Tanter and Fink 2014), a été récemment mise au point. Elle a été initialement développée pour l'analyse de la propagation des ondes de cisaillement dans l'imagerie par élastographie pour le cancer du sein et l'exploration de la thyroïde, mais est évaluée aujourd'hui

comme un nouvel outil de diagnostic dans les pathologies vasculaires. Cette technique a été développée par un laboratoire de recherche français, l'Institut Langevin de l'école supérieure de physique chimie industrielle de la ville de Paris (ESPCI). Sa principale innovation est l'imagerie à un cadencement extrêmement élevé, pouvant atteindre 10 000 images / s, soit 10 kHz, 100 fois plus rapide que les dispositifs classiques d'échographie diagnostique actuellement disponibles. Rappelons qu'en échographie « classique » le temps minimal pour former une ligne de l'image correspond au temps aller-retour des ultrasons focalisés. Le temps minimal pour former une image entière, composée de cent lignes, est donc de cent fois le temps aller-retour des ultrasons. Une méthode originale a été développée au laboratoire pour augmenter la cadence d'imagerie de manière drastique. Cette percée technologique est basée sur le principe d'envoi de quelques ondes planes d'angles différents en émission (par opposition à 128 lignes ciblées avec les systèmes d'échographie classique). Au lieu d'émettre 128 tirs focalisés selon 128 lignes de l'image, les cristaux piezzo-électriques émettent une seule onde plane de la taille de la barrette, qui va se propager dans tout le milieu. En enregistrant les signaux rétrodiffusés, on peut reformer une image entière à partir d'un seul tir d'onde plane. La cadence d'imagerie est alors démultipliée jusqu'à 100 et permet d'imager à des vitesses de plusieurs milliers d'images par secondes. La focalisation ayant lieu en réception, les signaux réfléchis sont ensuite traités en réception par un dispositif de traitement de signal acoustique qui permet à l'image d'être reconstruite très rapidement. La résolution spatiale de l'image reconstruite par le tir d'une seule onde plane est cependant moindre que celle obtenue partir des 100 tirs d'ondes focalisées.

Pour gagner en qualité, il est possible d'émettre plusieurs ondes planes successives mais avec un angle d'émission différent (Figure 4-2). La sommation cohérente d'ondes planes correspond au fait de les combiner a posteriori de manière cohérente pour recréer des taches focales synthétiques partout dans l'image comme si on avait focalisé les ondes en émission en chacun de ces points (Montaldo et al. 2009; Tanter and Fink 2014). Avec un petit nombre d'angles, l'amélioration de la qualité d'image est notable. Il

a été montré qu'avec environ 40 ondes planes angulées, la résolution spatiale obtenue est équivalente à celle obtenue par des appareils d'échographie classique. Avec la technologie UltrafastEcho la VOP d'un segment localisée de la paroi artérielle peut être mesurée en direct. L'imagerie ultra-rapide comprend les étapes suivantes. Le clinicien optimise l'image en mode B, de l'artère pour laquelle il souhaite mesurer une VOP. La mesure est prise le long de l'axe principal de l'artère à étudier (une bonne vue de l'intima-média indique généralement que la qualité d'image optimale a été atteinte). Une fois que l'image a été optimisée, la procédure d'acquisition du dispositif d'imagerie ultra-rapide est activée et le système est gelé pendant quelques secondes. Le système détecte automatiquement la paroi proximale et la paroi distale de l'artère et effectue une analyse en Doppler tissulaire des parois de l'artère. En effet, au passage de l'onde de pouls, l'artère se dilate, son diamètre augmente. Le déplacement de proche en proche de la paroi artérielle via le Doppler tissulaire permet de visualiser la propagation de l'onde de pouls. Les gradients de vitesse dans le mode spatio-temporel de l'image Doppler tissulaire sont affichés sur l'image. La VOP locale est dérivée des gradients et affichée.

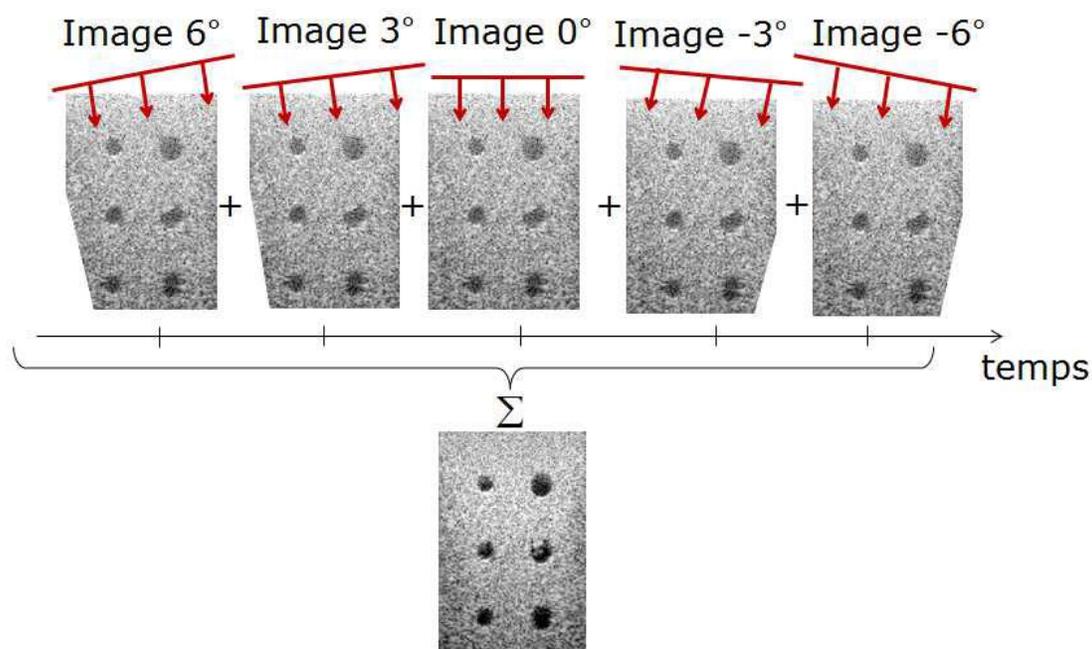


Figure 3-2 : Principe de la sommation cohérente d'ondes planes. Le milieu est imagé avec des ondes planes angulées, l'image reconstruite par chacune des ondes planes est une image de basse qualité. La sommation cohérente de ces images, crée une tache focale synthétique partout dans l'image et permet de reconstruire une image de haute qualité.

3.7 Perspectives

Les premières techniques élaborées pour évaluer la rigidité artérielle, utilisent des mesures indirectes telles que la vitesse de l'onde de pouls ou l'analyse des variations de la pression et du volume intra-artérielles pour estimer la rigidité artérielle. Les techniques basées sur des mesures globales d'onde de pouls manquent de précision car elles supposent que la rigidité artérielle est uniforme sur tout le trajet de propagation de l'onde de pouls, et qu'elle est constante tout au long du cycle cardiaque. Les techniques basées sur l'analyse des variations de pression et de volume ne permettent pas de mesurer la pression inter-artérielle, et utilisent donc une mesure indirecte. L'échographie ultrarapide est une nouvelle technique d'imagerie à ultrasons qui peut enregistrer jusqu'à 10 000 images par seconde. Cette haute résolution temporelle permet de mesurer la vitesse de l'onde de pouls locale. Il est possible en temps réel, en utilisant une sonde à ultrasons vasculaire traditionnel et un dispositif d'imagerie à ultrasons de diagnostic, d'effectuer une évaluation précise de la rigidité artérielle locale et de sa variation au cours du cycle cardiaque. Ce saut technologique devrait permettre d'améliorer l'évaluation du phénotype des patients souffrant de maladie vasculaire, d'évaluer plus efficacement le risque cardiovasculaire des patients pour la prévention primaire et secondaire, et de procéder à de larges études épidémiologiques sur le risque cardiovasculaire.

4 Objectif général de la thèse

Le SEDv est une maladie artérielle très rare certes, mais affectant des sujets jeunes, et dont la sévérité des complications, leur morbidité, leur mortalité, en l'absence de signes avant-coureurs amènent à mieux appréhender les conséquences des mutations du gène COL3A1, à préciser les mécanismes physiopathologiques en jeu dans cette pathologie du collagène de type III.

Nous aborderons dans le premier article publié les phénotypes de 215 patients atteints de SEDv corrélés aux mutations du gène COL3A1 présentes. Cette recherche d'une relation génotype/phénotype peut être source d'hypothèses physiopathologiques en fonction des domaines de la protéine altérés par la mutation d'une part, et de l'expression clinique d'autre part (Frank et al. 2015a).

Le second article publié vise à mieux caractériser les propriétés biomécaniques de la paroi artérielle dans le SEDv. Pour cela nous avons eu recours à une technologie ultrasonore innovante, permettant d'acquérir le signal échographique extrêmement rapidement. Ainsi des phénomènes très rapides, comme la vitesse de l'onde de pouls qui se propage le long de la paroi des artères après chaque battement cardiaque, peuvent être visualisés et mesurés en temps réel au niveau du segment artériel étudié (Mirault et al. 2015).

Dans le troisième article soumis et en cours de révision, nous avons appliqué cette technologie dans un modèle pré-clinique murin d'haploinsuffisance en collagène de type III, permettant l'étude de la rigidité artérielle au cours du cycle cardiaque face à l'augmentation de pression artérielle générée par la systole ventriculaire et la perfusion d'un vasoconstricteur périphérique.

Enfin, dans la dernière partie, sera abordé le développement d'un modèle cellulaire humain par l'obtention de lignées de cellules pluripotentes induites isogéniques : exprimant ou pas une mutation du gène COL3A1 responsable d'une substitution Glycine.

Ces travaux ont pour objectif d'essayer d'éclaircir les aspects physiopathologiques du SEDv, de révéler des caractéristiques entre le phénotype et le type de mutation du gène COL3A1 et des

différences de comportement de la paroi artérielle par rapport aux individus non atteints ; de définir des paramètres nouveaux d'évaluation de la rigidité artérielle ; d'aborder la problématique sur le versant cellulaire et non pas seulement matriciel. A terme cela pourrait permettre de développer des thérapeutiques visant à diminuer l'incidence des ruptures artérielles, digestives, ou utérines, et de mieux les traiter lorsqu'elles surviennent. Plus largement, le développement d'outils de caractérisation, d'approches innovantes, de modèles pré-cliniques dans une pathologie affectant la paroi artérielle offre l'opportunité d'une meilleure compréhension de la mécanique artérielle et de ses déterminants.

5 Article 1 publié : Association des variants du gène COL3A1 avec le phénotype et la sévérité du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire.

Cet article a été publié :

Frank M, Albuisson J, Ranque B, Golmard L, Mazzella J-M, Bal-Theoleyre L, Fauret A-L, [Mirault I](#), Denarié N, Mousseaux E, Boutouyrie P, Fiessinger J-N, emmerich J, Messas E, Jeunemaitre X. The type of variants at the COL3A1 gene associates with the phenotype and severity of vascular Ehlers-Danlos syndrome. Eur J Hum Genet 2015. doi :10.1038/ejhg.2015.32

5.1 Objectifs du travail

La variabilité du phénotype des patients avec SEDv tant sur les critères majeurs que mineurs, et la rareté de la maladie rend l'évocation du diagnostic difficile en pratique courante. En tant que centre national de référence du SEDv en France, nous sommes consultés pour le diagnostic et la prise en charge de patients suspects de SEDv. Ainsi, cette publication rassemble les données diagnostiques et de suivi quant à la survenue d'une complication artérielle, digestive, ou obstétricale de plus de 200 patients moléculairement prouvés. Lorsque l'on prend en charge ces patients, la grande variabilité phénotypique de la maladie pose question. Une relation génotype-phénotype a déjà été recherchée antérieurement, sans succès (Pepin et al. 2000). Déjà évoqué plus haut, seule l'haploinsuffisance en collagène de type III diffère des substitutions glycines classiques avec un âge au diagnostic supérieur mais des complications artérielles tout aussi fréquentes et aussi sévères que les substitutions glycines (Leistriz et al. 2011; Pepin et al. 2014; Schwarze et al. 2001).

L'ensemble des données cliniques a donc été analysé en correspondance avec les mutations du gène COL3A1 afin de mieux comprendre la physiopathologie et tenter de déterminer des groupes à risques. Dans une perspective d'essai thérapeutique, cette approche pourrait également permettre de

définir les patients les plus à risques pour telle complication et de mieux cibler la prophylaxie en fonction du bénéfice attendu du traitement administré lors d'un essai.

5.2 Article

Frank M, Albuissou J, Ranque B, Golmard L, Mazzella J-M, Bal-Theoleyre L, et al. The type of variants at the COL3A1 gene associates with the phenotype and severity of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2015 Dec;23(12):1657-64.

La publication au format pdf de cet article n'a pas été autorisée par l'éditeur pour la version électronique de cette thèse.

Vous pouvez retrouver cet article en ligne à

<http://www.nature.com/ejhg/journal/v23/n12/full/ejhg201532a.html>

SUPPLEMENTARY METHODS AND RESULTS

Supplementary method 1: Genetic analysis:

gDNA was isolated from blood leukocytes, using the QIAamp DNA kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands). cDNA was obtained by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) of total RNA extracted from cultured fibroblasts obtained by skin or gingival biopsy. PCR protocols were adapted from those described previously.^{6,9} The COL3A1 gene was amplified using 33 pairs of primers when gDNA was used (supplementary Table 1) or 10 pairs of primers for the cDNA analysis (supplementary Table 2) and genetic testing was performed by direct bidirectional Sanger sequencing using kits and run on a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems®, California, USA). DNA sequences were analyzed by the Sequencher® software (Gene Codes Corporation, Michigan, USA). Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA®) was performed with the SALSA MLPA P155 EDS kit according to the manufacturer's recommendations.

Supplementary method 2: Pathogenicity assessment of Unknown Variants:

All missense variants were analysed using Alamut software (interactivebiosoftware©) and bioinformatics predictions of pathogenicity were performed using SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) and Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) tools. Variants frequencies in European American populations were extracted from the Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

Supplementary results 1: Disease related complications

One hundred and fifty patients experienced at least one arterial event. These were predominantly dissections (52%) and aneurysms (52%), arterial ruptures (33%) and false-aneurysms (7%). A majority of these patients (79%) had multiple (≥ 2) locations, 20% of them having more than 5 different affected arterial sites. Renal, iliac and carotid lesions were the most frequently observed (respectively 30%, 50% and 50% of patients with vascular complications for each location).

Digestive complications were mainly spontaneous ruptures and perforations of the sigmoid colon (n=46, 73%). Rupture of the small bowel occurred in n=3 patients and a spontaneous gastric perforation was diagnosed in n= 1 patient. Recurrent non surgery-related rupture was observed in 43% of patients, and almost half of affected patients suffered at least one postoperative complication (occlusion, haemorrhage, fistula or evisceration). Solid organ rupture occurred in n=4 patients.

Amongst the n=132 women of the cohort, n=74 (56%) were at least pregnant once and totalled n=160 pregnancies. Maternal complications at delivery and in the post-partum period occurred in n=27 (36%) patients. Detailed obstetrical course of pregnancies was available for n=39 patients, totalling 82 pregnancies, of which 59 were term pregnancies. Maternal morbidity during delivery was characterized by a high incidence of haemorrhage (33%), especially during caesarean section. Vaginal delivery was associated with the occurrence of perineal tears (56%). Arterial accidents were diagnosed in n=3 parturients and uterine ruptures occurred in n=2 patients. Other major maternal morbidity consisted in n=1 colonic and n=1 bladder rupture/perforation (during c-section), n=1 mitral papillary muscle rupture requiring urgent cardiac surgery (previously reported).¹ Notably, diagnosis vEDS was known in only n=9 (24%) of patients at the time of delivery.

Supplementary results 2 : Arguments for pathogenicity of the groups 3 and 4 missense variants:

Group 3:

-The first variant, c.812G>A p.Arg271Gln in exon 11 was found in two index cases (AN_004765 and AN_002975). The first patient is a 45 years woman who suffered from isolated mesenteric artery

aneurysm revealed by chronic abdominal pain. No other typical feature suggestive of vEDS is associated to this aneurysm. The second patient is a 47 years old woman presenting with humeral artery thrombosis of unknown cause and dissection of common and internal right carotid artery. She does not have minor criteria. The variation lies in the X codon of the helical Gly-Xaa-Yaa repeat. Analysis of the variant showed arguments of moderate pathogenicity: i) bioinformatic prediction using four different tools yielded inconsistent results: Polyphen, SIFT, AGVGD predicted it as deleterious, as MutationTaster predicts it as a polymorphism; ii) phylogenetic and physical chemistry analysis revealed low nucleotide and mean amino acid conservation at that position, as well as a moderate Grantham distance (=43; 0-215) ; iii) this variant is present at low frequency in population databases such as EVS and 1000 Genomes (0.3%); iv) in a post-mortem analysis led by Pickup and colleagues, this variant was found in a patient deceased from posttraumatic subarachnoid hemorrhage.²

-The second variant, c.1165A>T p.Asn389Tyr was found in a woman (AN_004713) with familial history of possible classical Ehlers-Danlos syndrome. She had an isolated internal carotid dissection, like her mother who also had the variant. No minor criteria was present in those patients, and skin hyperelasticity segregated independently of the variant. This substitution is in the Y position of the helical Gly-Xaa-Yaa repeat of the pro α 3(I)-procollagen chain, and several arguments lead to consider it as moderately pathogenic: i) bioinformatic prediction using four different tools yielded inconsistent results: AGVGD predicted it as deleterious, as MutationTaster and SIFT predicted it as polymorphism; ii) the corresponding asparagine has a low level of interspecies conservation, but the aminoacid substitution is predicted to be damaging for the local structure as tyrosine is a negatively charged aminoacid, and the Grantham distance is high (=143; 0-215); iii) the variant is present at very low level in Caucasian population (EA frequency in EVS: .02%).

-The third variant, c.3245G>A in exon 44, p.Arg1082Gln is in the Y position of the helical Gly-Xaa-Yaa repeat of the pro α 3(I)-procollagen chain, and was evidenced in a 48 year old patient (AN_002927) who suffered from spontaneous dissection of a primitive iliac artery, associated with asymptomatic aneurysms of renal and digestive arteries. In addition to having been found in a subject with suggestive features of vEDS, several arguments favour the hypothesis of pathogenicity for this variant : i) arginine is strongly conserved among species and the change from R (basic residue) to Q (uncharged residue) was recurrently predicted as likely damaging; ii) infrequent R to C substitutions have been described in type I collagen to cause a spectrum of milder, unusual and site-specific phenotypes;³ iii) R to C substitutions in type I collagen have been shown to have a negative effect on procollagen secretion, collagen fibrillogenesis and stability;⁴ iv) the R residue at the Y position was also shown to have a stabilizing effect on the triple helical conformation of type I collagen, and to be important for interaction with HSP47, a collagen-specific molecular chaperone that facilitates normal procollagen biosynthesis.⁴ Further direct arguments should be obtained from the segregation of the phenotype and the variant within this family as well as from in vitro experiments.

-The fourth variant, c.3511G>A p.Glu1171Lys in exon 22 was found in a 22 years old man (AN_002971) suffering from a left femoral artery rupture, associated with voluminous hematomas after minor traumas. He also harboured a splenic and a renal aneurysm. The segregation analysis could, unfortunately, not be performed.

The Glu substitution is located in the X position of the helical Gly-Xaa-Yaa repeat of the pro α 3(I)-procollagen chain. Arguments for pathogenicity of this variant are based upon i) the very high

conservation at the nucleotide level and the amino acid level of the corresponding position; ii) the concordance of the three prediction tools for its pathogenicity (Mutation Taster, SIFT, AGVGD); iii) its absence in the population databases. The Grantham distance is low in this case (=56, 0-215), but this substitution brings important local charge alterations (from negative to positive amino acid).

Group 4:

We evidenced one missense variant in the N-terminal part of the protein (exon 2) and six non-Gly missense variants in the C-terminal propeptide of type III procollagen (all but one in the exon 48, the latter in the exon 49). The C-propeptide, referred to as the NC1 domain, is well conserved among the fibrillar collagens and its correct trimerisation is crucial for collagen assembly.^{5,6}

-The N-terminal variant c.130G>A p.Val44Ile was found in an Afro American 3 years old boy (AN_004701) who has hyperlaxity, characteristic facial appearance, and easy bruising. The variant was inherited from his father, presenting with the same phenotype.

This substitution, although present on population databases as rs79632685 (Caucasian population 0.02%; Afro American population 0.43%) is predicted to be deleterious by any of the three bioinformatic tools used. The Valine 44 is highly conserved in vertebrates, but the Grantham distance is low (=29,0-215). The pathogenicity of this variant is uncertain.

The first C-terminal variant, c.3607G>A p.Ala1203Thr (AN_004754), located in exon 48, was found in a woman presenting with a dissection of the hepatic artery at the age of 53 years old, joint hypermobility, skin fragility and hyperelasticity. We could not perform segregation analysis in her family. Arguments for pathogenicity are : i) the high level of conservation of the Alanine residue at position 1203, ii) the substitution from the non polar Alanine to the polar, “bulky” Threonine iii) bio-informatic predictions (AGVGD, SIFT and Mutation Taster) inconsistently in favour of a damaging effect (mutation taster predicting polymorphism), iiiii) The absence of the variant in public population databases.

-The second variant, c.3772C>T p.P1258S, (AN_002932) was evidenced in a 49 year old woman with signs of arterial fragility (procedural femoral artery dissection, spontaneous coronary artery dissection) and several minor diagnostic criteria for vEDS. Arguments for pathogenicity are : i) the conservation of the proline residue at position 1258 in species, ii) the change of charge from the hydrophobic proline to the uncharged serine and the loss of the peculiar structure of proline, iii) bio-informatic predictions (AGVGD, SIFT and Polyphen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) in favour of a damaging effect. High proline content is a major stability factor of the collagen triple-helix, and variations in the identity of the residue in the Y position of the (Gly-X-Y)ⁿ repeating sequence, as here, may have significant consequences on the assembly and binding of procollagen monomers.⁷

-The third variant c.3775G>A p.A1259T (AN_004753) was found in a 43 years old woman suffering from dissection of the right internal carotid artery. She had joint hypermobility, and family history of bilateral dissection of the internal carotid artery, dissection of the mesenteric artery, and sudden death. Segregation analysis is ongoing in the family. Arguments for pathogenicity are : i) the high level of conservation of the Alanine residue at position 1259, ii) the substitution from the non polar Alanine to the polar, “bulky” Threonine iii) Consistent pathogenicity predictions from the three bioinformatics tools (AGVGD, SIFT and Mutation Taster) iiiii) The absence of the variant in public population databases.

-The fourth variant c.3808C>A p.Pro1270Thr (AN_004752) was found in a young woman (17 yo) with skin fragility, easy bruising, joint hypermobility, severe menometrorrhagia. characteristic facial appearance, and no vascular complications. Segregation analysis is ongoing; This aminoacid substitution

leads to change from the nonpolar proline to bulky and polar threonine, but the Grantham distance is low (=38, 0-215). The proline 1270 is highly conserved in the protein amongst species, and all bioinformatics tools predicted this substitution to be pathogenic. It is not present in population databases.

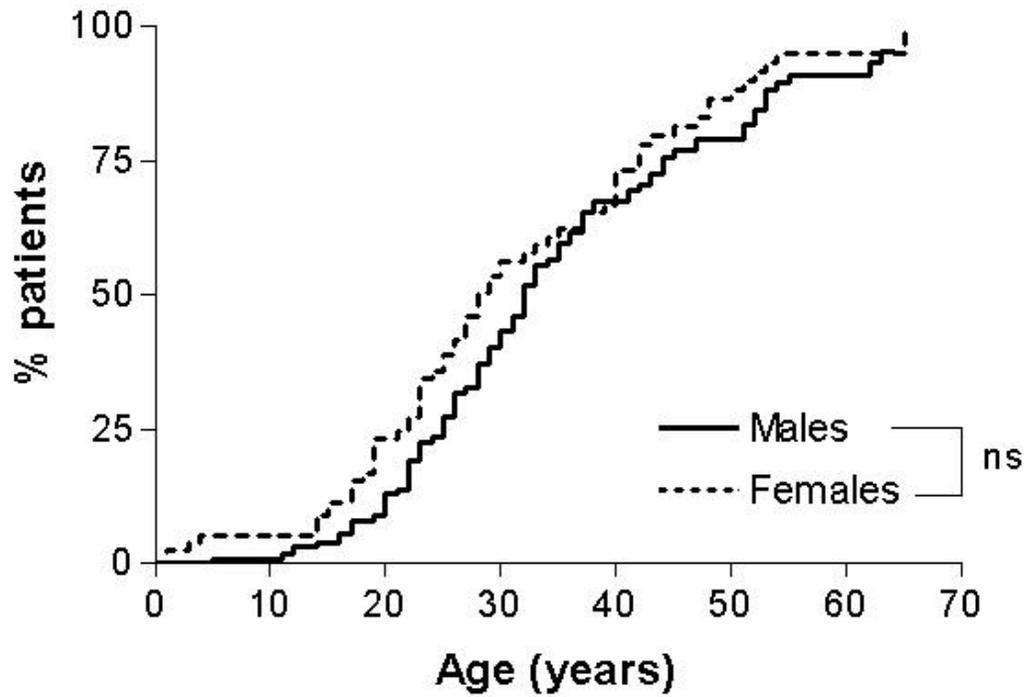
-The fifth variant was c.3818A>G, p.Lys1273Arg (AN_002920 and AN_002950), evidenced in two index cases: the first patient was a 45 years old woman suffering from bilateral carotid artery dissection and splenic aneurysms. The second index case presented with an iliac artery aneurysm and extensive bruising. The nucleotide and amino acid are strongly conserved among species but there is no change of polarity and bio-informatic tools predict it as benign. It is present at very low frequency in population databases (EVS: 0.03%), which does not exclude a possible pathogenic effect.

-The sixth C-terminal missense variant c 3938A>G p.(Lys1313Arg) (AN_004756), lying in exon 49, was found in a woman who had genetic investigation for uterine rupture and peripartum hemorrhage at the age of 38 years old. She had no symptomatic arterial lesion. Arguments for pathogenicity are : i) the high level of conservation of the lysine residue at position 1313, ii) the substitution from the non polar lysine to the polar arginine residue iii) Consistent pathogenicity predictions from the three bioinformatics tools (AGVGD, SIFT and Mutation Taster) . However, the pathogenicity might be uncertain due to the presence at relatively low frequency of the variant in the caucasian population (.26%). Segregation analysis is not informative in the family.

References

1. Seve P, Dubreuil O, Farhat F, Plauchu H, Touboul P, Broussolle C. Acute mitral regurgitation caused by papillary muscle rupture in the immediate postpartum period revealing Ehlers-Danlos syndrome type IV. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129: 680-681.
2. Pickup MJ, Pollanen MS. Traumatic subarachnoid hemorrhage and the COL3A1 gene: emergence of a potential causal link. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 7: 192-197.
3. Hoornaert KP, Dewinter C, Vereecke I, Beemer FA, Courtens W, Fryer A, Fryssira H, Lees M, Mullner-Eidenbock A, Rimoin DL, Siderius L, Superti-Furga A, Temple K, Willems PJ, Zankl A, Zweier C, De Paepe A, Coucke P, Mortier GR. The phenotypic spectrum in patients with arginine to cysteine mutations in the COL2A1 gene. *J Med Genet* 2006;43: 406-413.
4. Malfait F, Symoens S, De Backer J, Hermanns-Le T, Sakalihan N, Lapiere CM, Coucke P, De Paepe A. Three arginine to cysteine substitutions in the pro-alpha (I)-collagen chain cause Ehlers-Danlos syndrome with a propensity to arterial rupture in early adulthood. *Human Mutat* 2007; 28: 387-395.
5. Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)*. 2005;53: 430-442.
6. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci* 2007;120: 1955-1958.
7. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem* 2005; 70: 301-339.

Supplementary figure 1: Age of occurrence of the first major event in 215 index cases and relatives with vascular Ehlers-Danlos syndrome, depending on the sex of patients. Results are shown as Kaplan-Meier survival curves with Log-rank test



Supplementary Table 1: Primers used for the amplification and direct sequencing of the COL3A1 gene (reference sequence NG_007404.1).

Location	Primer Forward	Primer Reverse	Length (bp)	Annealing T (°C)
exon 1	5'-AAGTGAGGGAAGCCAAACTT-3'	5'-CAGTTCAACGTTTCACAATC-3'	391	53
exons 2-3	5'-GTTAATAGTCCTAACAGAGTAAC-3'	5'-TCTGTTGTTGGTGCCATTA-3'	705	53
exon 4	5'-ATGATTGTGAATCACCAGGA-3'	5'-GAGAACAGATACAAAGAACTC-3'	280	53
exon 5	5'-CTATTTGTCTCCTTGCCACA-3'	5'-CTTTTCCAACCTTAGTAGGG-3'	240	53
exons 6-7	5'-GTCATTGCTTTGAAGCATGG-3'	5'-AGAAAACAAAGGTAGGTTCC-3'	704	53
exon 8	5'-GTAAGTTGATATAATAGAGG-3'	5'-TGAGTCTTCTCCGCAGTCA-3'	472	50
exons 9-10	5'-TACATGAGCACCTACGTATT-3'	5'-GTTAGGCAAGTAAACATAGC-3'	364	50
exon 11	5'-CAGTATGAAATATCTTCAAC-3'	5'-ATATCTGAATTGGTTACCAT-3'	369	50
exons 12-13	5'-CCTCTTTTGAAAATAGTAAC-3'	5'-ATTTCTTTTAACTATAGCC-3'	438	50
exon 14	5'-CAACTCACTTGAGTCAGAATT-3'	5'-TGGTCAACAGAGATGCTAAT-3'	286	53
exon 15	5'-ATGTGCTCACTATTTACTAG-3'	5'-GAATAGGGCTTTAAAGACAT-3'	270	53
exon 16	5'-GCTAAGTGAGTAGAAGTGGT-3'	5'-AGCCATATTGAAGCACATGC-3'	254	53
exons 17-18	5'-CGAACTATTTGCATTACTAT-3'	5'-TGATGGAATTAACTATAACC-3'	399	50
exons 19-21	5'-CGAATCCTCCCTGTGTTCA-3'	5'-CCCATTTGTGGTGCTAGCATT-3'	651	53
exons 19-21i	5'-TTCAGGGTGAGGCTGGTATT-3'	5'-TAACCAGATCTGTTGCAGTA-3'	nd*	nd
exon 22	5'-GTTCAAATGACGTCCTCTCT-3'	5'-TGCTTGCCTTTCTTCTGTC-3'	253	50
exons 23-24	5'-ACCTAACAAGTACTTCTTT-3'	5'-TTTGACCATTTCTTACTCC-3'	481	50
exons 23-24i	5'-CATACTATATATATAGCATGC-3'	5'-TCAAGGATAGGCCAACAT-3'	nd	nd
exons 25-27	5'-GTTATTGCCCTTTGAGGATT-3'	5'-TGACAGTCAGATATGCCGTG-3'	679	50
exons 28-29	5'-CTATAAGCCATGTTTGAGGT-3'	5'-ATTGCTCTATAACCTGCTGA-3'	553	53
exons 30-31	5'-AACCAGACTAAGTATCCAAG-3'	5'-TGTTGCTTTAGGAATCCATCT-3'	565	53
exon 32	5'-GGCTGATTTTCACTGAAGAT-3'	5'-GACTGTCCCATATGACATAT-3'	166	53
exons 33-34	5'-GAGTTATCCCCAAGAGGCT-3'	5'-GCTACTGTCTGTATGGGGTT-3'	450	50
exon 35	5'-CTCTGCACATTTCTGCTTA-3'	5'-CCTATAGGGAATGAGCAGCT-3'	290	50
exon 36	5'-TCAACTCCTCCATCTGAAG-3'	5'-CCATTAGAACACTTAGGACT-3'	335	53
exons 37-38	5'-TCTCAGCACCAGCAATCTAA-3'	5'-GCTCTTCTGAAGTGTATGA-3'	552	53
exons 39-40	5'-GAGAACTTACACATTGCTAC-3'	5'-GTGATCTCTGAAGGCTACCA-3'	565	53
exon 41	5'-TTCCCATAGCAGGCATAGTT-3'	5'-AAGAAGTTTGTATGTGGCC-3'	370	53
exons 42-43	5'-AATTATATTGCCCTGCTGAG-3'	5'-GAAGGAAATAGACAAACAAG-3'	380	53
exon 44	5'-CTTCCAATAATTGCATGCATAC-3'	5'-TCCTACACTGTAGAATGAGT-3'	247	53
exons 45-47	5'-TGGGGGATTTTTAGCTGAT-3'	5'-AGTGGATGCATTGCGTCTCT-3'	869	50
exon 48	5'-CTTGGACTAGCAATGTATTCTT-3'	5'-CCCATTCTAATCTAAGCAGC-3'	441	53
exon 49	5'-GCAGACACATTAGCAGTCAA-3'	5'-GCATGCCATCACTTTCAGTA-3'	434	53
exon 50	5'-ACACATACTACATGAATCCC-3'	5'-ACATTCCTGCAATGAATCA-3'	480	53
exon 51	5'-CTTGTTAAGTCAGAGTTGTC-3'	5'-TACAATCTGTGTTTCTGACC-3'	653	53

Abbreviations: bp: base pairs; T: temperature; i: internal sequencing primer. * sequencing primers

Supplementary Table 2: Primers used for the amplification of the COL3A1 cDNA, according to the cDNA accession number NM_000090.3.

Amplicon	Primer F	Primer R	Length (bp)	Annealing T (°C)
1	5'- GGCAGGGAACAACCTTGATGGT -3'	5'- GGCATGATTCACAGATTCCAGG -3'	518	62°C
2	5'- GGAGAATGTTGTGCAGTTTGCC -3'	5'- TCCATCGAAGCCTCTGTGTCC -3'	566	62°C
3	5'- ACCTCCAGGTATCAAAGTCC -3'	5'- GCCTTTACCACCAGGACTACC -3'	451	62°C
4	5'- GGACAAAGAGGAGAACCTGGA -3'	5'- CTGGTCGACCACTTTCTCCTT -3'	595	62°C
5	5'- GGTCTGCTGGAGAGCGTGG -3'	5'- CCAGGGCCACCTCGTTTCTCC -3'	289	62°C
6	5'- GACCAGGAAGTGATGGGAAAC -3'	5'- CTCCTCTTTCTCCAGGCATTC -3'	569	62°C
7	5'- TGTGGACCTCTGGATTGGCA -3'	5'- ATCCTTGCTGGAGAACCGCT -3'	598	62°C
8	5'- AAAGGTGAACGTGGCAGTCCT -3'	5'- ACCAGGAGAGCCATTTTCACC -3'	544	62°C
9	5'- GCTGGTGAACCTGGAAGAGAT -3'	5'- GAGCCCTCAGATCCTCTTTCA -3'	511	62°C
10	5'- CAAAGATGGAACCAAGTGGACA -3'	5'- AAGTTCAGGATTGCCGTAGCT -3'	589	62°C
11	5'- AACATGCATAAGTGCCAATCC -3'	5'- GTCACCTGCACTGGTTGACAA -3'	589	62°C

Abbreviations: bp: base pairs; T: temperature.

Supplementary Table 3: Minor criteria according to patient status.

	All patients	Status		
		Index cases	Relatives	Index vs relatives
	N=215	N=148	N=67	Pp-value
Acrogeria	116 (61%)	88 (67%)	28 (48%)	*
Gingival recession	21 (14%)	17 (15%)	4 (9%)	ns
Chronic joint subluxation	71 (37%)	50 (38%)	21 (33%)	ns
Tendon/muscle rupture	18 (10%)	15 (11%)	3 (5%)	ns
Talipes equinovarus (clubfoot)	29 (15%)	24 (18%)	5 (8%)	ns
Early-onset varicose veins	52 (28%)	39 (29%)	13 (22%)	ns
Carotid cavernous fistula	15 (8%)	14 (10%)	1 (2%)	*
Pneumothorax	17 (9%)	14 (10%)	3 (5%)	ns
Familial sudden death ^a	NA	39 (28%)	NA	***
Median nb of minor criteria	2[1-3]	2[1-3]	1[0-2]	***

^a index-cases only, NA : not applicable; percentages were calculated on the basis of available data for each item , p-values stratified for index status:

* <.05; **<.01; ***<.001; percentages were calculated on the basis of available data for each item

Supplementary Table 4 : Clinical events of patients from the 5 groups. The variants are identified according to the reference sequence of the COL3A1 gene NG_007404.1.

Supplementary Table 4a : Clinical details of index patients presenting with Gly and splice/in/del variants

LOVD ID submission number	Sex	Group	c. Variation	p. Variation	Major Criteria						At least 1 Minor Criterion
					Vascular fragility	Digestive fragility	Uterine fragility	Thin Skin	Easy brsuires	Characteristic facial appearance	
AN_004703	M	1	c.530G>A	p.(Gly177Asp)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_002962	F	1	c.539G>A	p.(Gly180Asp)	+	+	+	+	+	+	+
AN_002926	F	1	c.547G>A	p.Gly183Ser	+	+	+	+	+	+	+
AN_002931	F	1	c.548G>A	p.(Gly183Asp)	+	+	-	+	+	+	+
AN_002945	F	1	c.556G>A	p.Gly186Ser	+	+	-	NA	NA	NA	+
Patient 3 Ferré et al	M	1	c.575G>A	p.(Gly192Asp)	-	+	NA	+	+	+	+
AN_004704	F	1	c.575G>A	p.(Gly192Asp)	+	-	-	+	+	+	+
AN_004702	M	2	c.582+5G>A	p.(?)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_002948	F	1	c.638G>A	p.(Gly213Asp)	+	-	-	+	+	+	+
AN_002921	F	1	c.647G>C	p.Gly216Ala	+	-	+	+	+	+	+
AN_002902	F	1	c.665G>A	p.Gly222Asp	+	+	+	+	+	+	+
AN_002912	M	2	c.690+1G>T	p.Pro214_Gly231del	+	+	NA	+	+	+	+
AN_002944	M	1	c.692G>A	p.Gly231Glu	+	-	NA	-	-	-	-
AN_004760	M	2	c.744+1G>A	p.(?)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_004762	F	1	c.755G>T	p.Gly252Val	+	-	+	+	+	+	+
AN_002936	F	1	c.755G>T	p.Gly252Val	+	+	+	+	+	+	+
AN_004707	F	1	c.755G>T	p.Gly252Val	+	-	-	+	+	NA	+
AN_004709	F	1	c.826G>A	p.(Gly276Ser)	+	+	-	+	-	+	+
AN_004710	F	1	c.826G>A	p.(Gly276Ser)	+	-	-	+	+	+	+
AN_002963	F	1	c.836G>A	p.(Gly279Asp)	+	+	-	+	+	+	+
AN_002917	F	1	c.836G>T	p.Gly279Val	+	+	-	+	+	+	+
Patient 15 Ferré et al	F	2	c.898-1G>C	p.(?)	+	+	-	+	+	+	+
AN_002955	M	1	c.926G>T	p.Gly309Val	NA	+	NA	+	-	+	+
AN_004761	M	2	c.951+1G>A	p.Pro301_Gly318del	+	-	NA	+	+	+	+
AN_002915	F	2	c.951+1G>A	p.Pro301_Gly318del	+	+	-	+	+	+	+
AN_002943	F	2	c.951+4A>G	p.Pro301_Gly318del	+	+	+	+	+	+	+
AN_002984	F	2	c.951+6T>C	p.(?)	+	+	-	+	-	+	+

Patient 11 Ferré et al	M	2	c.952-106_996 +45delinsGCTTAA	p.(?)	+	+	NA	+	+	+	+
AN_004711	F	1	c.970G>A	p.(Gly324Ser)	+	+	-	+	-	-	+
AN_002951	M	2	c.996+1G>A	p.Ala319_Gly333del	-	+	NA	+	-	+	-
AN_002966	M	2	c.996+5_996+8del	p.Ala319_Gly333del	-	+	NA	+	+	+	+
AN_002969	F	1	c.1106G>A	p.(Gly369Glu)	+	-	-	+	-	+	-
AN_002929	F	2	c.1149+1G>A	p.(?)	+	-	-	+	+	+	+
AN_002940	F	1	c.1187G>T	p.Gly396Val	+	-	+	+	+	+	+
AN_002909	M	2	c.1194+1G>A	p.(?)	+	+	NA	+	+	+	+
AN_002913	F	1	c.1241G>T	p.(Gly414Val)	+	-	-	+	+	+	+
AN_002946	F	2	c.1294-2A>G	p.(?)	+	+	-	+	+	+	+
AN_002956	M	1	c.1304G>A	p.Gly435Asp	+	-	NA	+	+	+	+
Patient 17 Ferré et al	M	1	c.1330G>A	p.(Gly444Arg)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_004714	F	2	c.1347+1G>A	p.(?)	+	-	-	+	+	+	+
AN_002901	F	2	c.1347+1G>A	p.(?)	+	-	+	+	+	+	+
AN_004758	M	2	c.1347+1G>A	p.(?)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_002939	F	1	c.1358G>A	p.(Gly453Asp)	-	+	-	+	+	-	+
AN_004715	M	1	c.1457G>T	p.(Gly486Val)	+	+	NA	+	+	+	+
AN_002911	F	1	c.1466G>A	p.Gly489Glu	+	NA	+	+	+	+	+
AN_002964	F	1	c.1511G>T	p.(Gly504Val)	+	-	-	+	+	+	+
AN_002916	M	2	c.1609-8_1619del	p.Met538_Gly555del	+	+	NA	+	+	+	+
AN_002906	M	1	c.1618G>A	p.Gly540Arg	+	+	NA	NA	+	-	-
AN_002919	M	1	c.1618G>A	p.Gly540Arg	+	-	NA	+	+	+	+
AN_002961	F	1	c.1654G>C	p.(Gly552Arg)	+	+	-	+	+	+	+
AN_004766	M	2	c.1662+1G>A	p.Met538_Gly555del	+	-	NA	-	+	-	+
AN_002937	F	2	c.1662+1G>A	p.Met538_Gly555del	+	-	-	+	+	NA	+
AN_002938	M	2	c.1662+1G>A	p.Met538_Gly555del	+	-	NA	+	+	+	+
AN_004767	F	2	c.1662+1G>A	p.Met538_Gly555del	NA	+	-	NA	NA	NA	NA
AN_002918	F	2	c.1662+1G>A	p.Met538_Gly555del	+	+	-	+	+	+	+
AN_004768	M	2	c.1662+1G>A	p.Met538_Gly555del	-	+	NA	+	+	+	+
AN_004759	M	2	c.1662+1G>A	p.Met538_Gly555del	-	+	NA	+	+	+	+
AN_002982	F	2	c.1662+1G>C	p.Met538_Gly555del	-	-	-	+	+	+	+
AN_002967	M	1	c.1672G>C	p.(Gly558Arg)	+	-	NA	+	+	+	+

AN_004718	F	1	c.1691G>A	p.(Gly564Asp)	+	-	-	-	+	+	+
AN_004716	F	1	c.1744G>A	p.(Gly582Ser)	+	-	+	+	+	+	-
AN_002903	M	2	c.1761+1G>A	p.(?)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_004717	F	2	c.1761+4A>T	p.(?)	-	-	-	+	+	+	+
AN_004720	M	1	c.1763G>T	p.(Gly588Val)	+	+	NA	+	-	+	-
AN_002954	F	1	c.1835G>A	p.(Gly612Asp)	+	-	-	-	-	+	-
AN_004721	F	1	c.1853G>T	p.(Gly618Val)	-	+	-	+	-	+	+
AN_004722	M	1	c.1916G>A	p.(Gly639Glu)	+	+	NA	+	+	-	+
AN_004763	M	2	c.1923+1G>A	p.Pro608_Pro625del	-	-	NA	+	+	-	-
AN_002959	M	1	c.1969G>C	p.Gly657Arg	+	+	NA	NA	-	NA	-
AN_004723	M	2	c.1977+5G>A	p.Leu643_Gly660del	-	-	NA	+	+	+	+
AN_002905	F	1	c.2042G>T	p.Gly681Val	+	-	-	+	+	+	+
AN_004725	F	1	c.2042G>T	p.Gly681Val	+	-	-	+	+	+	+
AN_002904	F	1	c.2095G>C	p.Gly699Arg	+	+	-	+	+	+	+
AN_004724	M	1	c.2104G>A	p.(Gly702Ser)	+	+	NA	+	+	+	+
AN_004726	F	2	c.2134_2160del	p.Pro712_Gly720del	+	+	-	+	+	+	+
Patient 14 Ferré et al	M	1	c.2150G>A	p.(Gly717Asp)	+	+	NA	+	+	+	+
AN_002928	F	1	c.2222G>A	p.Gly741Asp	+	+	-	+	+	+	+
AN_004727	F	1	c.2231G>A	p.Gly744Asp	-	-	-	+	+	+	+
AN_002923	F	1	c.2231G>T	p.Gly744Val	+	-	-	+	+	+	+
AN_004728	F	2	c.2283+5G>A	p.(?)	-	-	-	+	+	+	+
AN_004764	M	1	c.2285G>A	p.Gly762Asp	+	-	NA	NA	NA	NA	NA
AN_002930	F	1	c.2285G>A	p.Gly762Asp	+	-	-	+	+	+	+
AN_002947	F	1	c.2285G>T	p.Gly762Val	+	-	-	+	+	+	+
AN_004729	F	1	c.2285G>T	p.Gly762Val	+	+	+	NA	+	NA	+
AN_004731	F	1	c.2293G>C	p.(Gly765Arg)	+	-	-	+	+	-	+
AN_004730	M	2	c.2337+1G>A	p.(?)	-	-	NA	+	+	+	+
AN_004733	M	1	c.2438G>A	p.(Gly813Asp)	+	-	NA	-	-	-	-
AN_004736	F	2	c.2446-2A>G	p.(?)	+	-	-	+	+	+	+
AN_004735	F	1	c.2492G>A	p.(Gly831Asp)	+	-	-	+	+	+	+
AN_002922	F	2	c.2553+1G>A	p.Gln817_Gly852del	+	-	+	+	+	+	+
AN_002907	M	1	c.2671G>A	p.(Gly891Arg)	+	NA	NA	+	+	+	+
AN_002965	F	1	c.2690G>A	p.(Gly897Asp)	-	+	-	+	+	+	+

AN_002979	F	1	c.2735G>A	p.(Gly912Asp)	-	-	+	+	+	+	+
AN_002949	M	1	c.2735G>T	p.(Gly912Val)	+	+	NA	+	+	+	+
AN_002970	F	1	c.2753G>T	p.(Gly918Val)	+	-	-	-	+	-	+
AN_002910	M	1	c.2807G>A	p.Gly936Asp	+	+	NA	+	+	+	+
AN_004738	M	1	c.2869G>A	p.(Gly957Ser)	-	+	NA	+	+	+	+
AN_004737	M	1	c.2915G>A	p.(Gly972Asp)	+	+	NA	+	+	+	+
AN_002908	F	1	c.2924G>T	p.(Gly975Val)	-	-	-	+	+	+	-
AN_002983	F	2	c.2931+1G>T	p.(?)	-	-	-	+	+	+	+
AN_002924	M	2	c.2939_2947 delinsCGGTCT	p.Ser980_Pro983 delinsThrValSer	+	+	NA	NA	NA	NA	+
AN_002953	M	1	c.2951G>A	p.Gly984Glu	NA	+	NA	NA	NA	+	NA
AN_002941	M	1	c.2959G>A	p.Gly987Ser	+	-	NA	+	+	+	+
AN_004741	M	1	c.2959G>A	p.Gly987Ser	+	-	NA	+	-	+	-
AN_004740	M	1	c.2960G>A	p.(Gly987Asp)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_004739	M	2	c.3039+1G>A	p.(?)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_002957	M	2	c.3039+5G>A	p.(?)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_002935	F	1	c.3050G>A	p.Gly1017Glu	+	+	-	+	+	+	-
AN_002978	M	1	c.3113G>A	p.(Gly1038Asp)	+	-	NA	-	-	-	+
AN_002981	F	1	c.3122G>A	p.(Gly1041Asp)	+	-	-	+	+	+	+
AN_004743	M	1	c.3166G>A	p.(Gly1056Ser)	+	-	NA	-	-	-	-
AN_002942	F	2	c.3202-2A>G	p.(?)	+	-	-	+	+	-	+
AN_002960	F	2	c.3255+5G>A	p.(?)	-	-	+	+	+	+	+
AN_002925	F	2	c.3417+5G>A	p.Ala1124_Pro1141 del	-	+	+	+	+	+	+
AN_002933	M	2	c.3441_3485dup	p.(Lys1150_Gly1164dup)	+	-	NA	NA	+	+	+
AN_004746	F	1	c.3446G>A	p.(Gly1149Asp)	+	-	+	+	-	+	-
AN_002934	F	1	c.3482G>A	p.Gly1161Glu	-	-	-	+	-	+	+
AN_004745	M	2	c.3486_3489delinsT	p.(Pro1163del)	+	-	NA	+	+	+	+
AN_002968	F	1	c.3509G>A	p.(Gly1170Asp)	-	-	-	+	+	+	+
AN_004748	M	2	c.3533_3553del	p.Pro1178_Gly1185 delinsArg	+	-	NA	+	+	+	+
AN_004749	F	1	c.3544G>C	p.(Gly1182Arg)	+	-	+	+	+	+	+

According to Villefranche nosology : + Presence of diagnosis criterion - Absence of diagnosis criterion NA Not applicable

Supplementary Table 4b : Clinical events of patients presenting with haploinsufficiency (Group 3).

LOVD ID submission number	Age at 1st Work-Up	Status (IC / R)	Sex	c. Variation	p. Variation	Location	Brief Description of the phenotype
AN_004757	51	IC	M	–	–	Exons 1 to 51	Left internal carotid artery dissection, superior mesenteric artery dissection, bilateral dissection of the renal arteries
AN_004708	54	IC	F	c.811C>T	p.(Arg271*)	Exon 11	Thin skin, varicose veins, left internal carotid artery dissection at the age of 52 yrs old. Positive familial history.
AN_004719	53	IC	F	c.1786C>T	p.(Arg596*)	Exon 25	Thin skin, atrophic scars. Aortic dissection at the age of 54. Vascular complication of surgery. Positive familial history.
AN_004747	48	IC	M	c.3710C>A	p.Ser1237*	Exon 48	Abdominal aortic dissection at the age of 43 yrs old, bilateral dissection of the iliac arteries, diverticulitis, characteristic facial appearance.
–	19	R	F	c.3710C>A	p.Ser1237*	Exon 48	No vascular issue. Characteristic facial appearance. Serious ankle sprain at the age of 13 yrs old.
–	45	R	M	c.3710C>A	p.Ser1237*	Exon 48	Dissection of the right iliac artery. Easy bruises, characteristic facial appearance.
AN_004751	23	IC	F	c.3710C>A	p.Ser1237*	Exon 48	Thoracic aortic dissection at the age of 23, dissection of the right carotid and vertebral arteries, haemothorax, clubfoot. Positive familial history.
–	52	R	M	c.3710C>A	p.Ser1237*	Exon 48	Thoracic aortic dissection at the age of 52 years old. Easy bruises, characteristic facial appearance.
AN_002976	33	IC	F	c.3823+1G>C	p.(?)	Intron 48	Dissection of the right internal carotid artery at the age of 21. Suggestive minor criteria. Joint hypermobility.
–	60	R	F	c.3823+1G>C	p.(?)	Intron 48	Characteristic facial appearance. Skin fragility, easy bruises, double dissection of the coronary arteries at the age of 45.
AN_002972	41	IC	M	c.4011+1G>A	p.[Gly1275Valfs*2,Val1292_Gln1337del]	Intron 49	Aortic abdominal aneurysm at the age of 41years old, dissection of the celiac and iliac arteries. Suggestive minor criteria.
–	44	R	F	c.4011+1G>A	p.[Gly1275Valfs*2,Val1292_Gln1337del]	Intron 49	Aneurysms of the celiac and iliac arteries. First delivery complicated by perineal tear, second pregnancy by postpartum hemorrhage.
–	65	R	F	c.4011+1G>A	p.[Gly1275Valfs*2,Val1292_Gln1337del]	intron 49	Aneurysms of the celiac, splenic and renal arteries.
AN_002952	45	IC	F	c.4134C>A	p.(Tyr1378*)	Exon 50	Skin fragility. Easy bruises. Characteristic facial appearance. Rupture of the femoral artery.

Supplementary Table 4c : Clinical events of patients presenting with non-gly missense variants located in the triple helix (group 4).

LOVD ID submission number	Age at 1st Work-Up	Status (IC / R)	Sex	c. Variation	p. Variation	Bioinformatic prediction ^a	EA population frequency ^b	Location	Brief Description of the phenotype
AN_004765	45	IC	F	c.812G>A	p.(Arg271Gln)	Deleterious/ Polymorphism	0.04%	Exon 11	Isolated mesenteric artery aneurysm
AN_002975	47	IC	F	c.812G>A	p.(Arg271Gln)	Deleterious/ Polymorphism	0.04%	Exon 11	Humeral artery thrombosis, dissection of the right internal carotid artery at the age of 47 years old.
AN_004713	44	IC	F	c.1165A>T	p.(Asn389Tyr)	Tolerated/ Polymorphism	0.02%	Exon 17	Dissection of the left internal carotid artery at the age of 44 years old, skin hyperelasticity. Mother with an internal carotid artery dissection.
_	49	R	F	c.1165A>T	p.(Asn369Tyr)	Tolerated/ Polymorphism	0.02%	Exon 17	Skin fragility & hyperelasticity, easy bruises, atrophic scars. Joint hypermobility. Mother and sister with an internal carotid artery dissection.
_	70	R	F	c.1165A>T	p.(Asn369Tyr)	Tolerated/ Polymorphism	0.02%	Exon 17	Skin fragility & hyperelasticity, easy bruises. Joint hypermobility. Dissection of the internal carotid artery at the age of 53 years old. Positive familial history.
AN_002927	60	IC	M	c.3245G>A	p.Arg1082Gln	Deleterious/ Disease causing	0.01%	Exon 44	Dissection of the right iliac artery at 48 years of age, surgery for acute coronary syndrome at 6 years old, renal & splenic arteries aneurysms
AN_002971	22	IC	M	c.3511G>A	p.(Glu1171Lys)	Deleterious/ Disease causing	0%	Exon 47	Aneurysms of the splenic and renal arteries

^aBioinformatics predictions were applied using SIFT and Mutation Taster softwares; ^b frequency data for the European American population were extracted from Exome Sequencing Project.

Supplementary Table 4d : Clinical events of patients presenting with N-term variants (group 5, part 1).

LOVD ID submission number	Age at 1st Work-Up	Status (IC / R)	Sex	c. Variation	p. Variation	Bioinformatic prediction ^a	EA population frequency ^b	EA population frequency	Brief Description of the phenotype
AN_004701	2	IC	M	c.130G>A	p.(Val44Ile)	Exon 2	Deleterious/ Disease causing	0.02%	Skin fragility, easy bruises, atrophic scars, joint hypermobility. Patent ductus arteriosus.
AN_002958	58	IC	F	c.202_207delGACGAT	p.(Asp68_Asp69del)	Exon 2	-	0%	Myocardial infarction caused by a spontaneous coronary artery dissection (AIV branch) without other arterial lesion. Characteristic facial appearance.

^aBioinformatics predictions were applied using SIFT and Mutation Taster softwares; ^b frequency data for the European American population were extracted from Exome Sequencing Project.

Supplementary Table 4e : Clinical events of patients presenting with C-term Variants (group 5, part 2).

LOVD ID submission number	Age at 1st Work-Up	Status (IC / R)	Sex	c. Variation	p. Variation	Bioinformatic prediction ^a	EA population frequency ^b	EA population frequency	Brief Description of the phenotype
AN_004754	54	IC	F	c.3607G>A	p.(Ala1203Thr)	Exon 48	Deleterious/ polymorphism	0%	Dissection of the hepatic artery at the age of 53 years old. Joint hypermobility. Skin fragility & hyperelasticity.
AN_002932	51	IC	F	c.3772C>T	p.Pro1258Ser	Exon 48	Deleterious/ Disease causing	0%	Dissection of the iliac artery at the age of 42years old, myocardial infarction, right renal artery stenosis & lesions of the carotid and vertebral arteries. Suggestive minor criteria.
_	21	R	M	c.3772C>T	p.Pro1258Ser	Exon 48	Deleterious/ Disease causing	0%	Asymptomatic. No vascular investigation.
AN_004753	43	IC	F	c.3775G>A	p.(Ala1259Thr)	Exon 48	Deleterious/ Disease causing	0%	Dissection of the right internal carotid artery. Joint hypermobility. 1 st Cousin with bilateral dissection of the internal carotid artery, mother with dissection of the mesenteric artery, familial history of sudden death
AN_004752	17	IC	F	c.3808C>A	p.(Pro1270Thr)	Exon 48	Deleterious/ Disease causing	0%	Skin fragility, easy bruises, joint hypermobility, severe menometrorrhagia. Characteristic facial appearance.
_	45	R	F	c.3808C>A	p.(Pro1270Thr)	Exon 48	Deleterious/ Disease causing	0%	Joint hypermobility. No vascular investigation.
AN_002920	48	IC	F	c.3818 A>G	p.Lys1273Arg	Exon 48	Deleterious/ Disease causing	0.03%	Iliac artery dissection. Suggestive minor criteria.
_	55	R	F	c.3818 A>G	p.Lys1273Arg	Exon 48	Deleterious/ Disease causing	0.03%	Postpartum hemorrhage. No symptomatic arterial lesion.
AN_002950	45	IC	F	c.3818A>G	p.Lys1273Arg	Exon 48	Deleterious/ Disease causing	0.03%	Bilateral dissection of internal carotid arteries. Aneurysms of the splenic artery.
AN_004756	38	IC	F	c.3938A>G	p.(Lys1313Arg)	Exon 49	Deleterious/ Disease causing	0.26%	Uterine rupture and peripartum hemorrhage at the age of 38 years old. No symptomatic arterial lesion.

^aBioinformatics predictions were applied using SIFT and Mutation Taster softwares; ^b frequency data for the European American population were extracted from

Exome Sequencing Project.

Supplementary Table 5: Overall prevalence of minor diagnostic criteria according to the Villefranche nosology, and according to the type of variant.

	Gly missense N=127	Splice/ Ins/Del/Dup N=55	Haplo insufficiency N=14	Triple Helix VUS N=7	C/N terminal VUS N=12	Gly vs respectively: splice, haplo, TH, CN p-values
Acrogeria	73 (65%)	39 (78%)	3 (27%)	0 (0%)	1 (10%)	ns, *, **, ***
Gingival recession	7 (8%)	13 (33%)	1 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	***, ns, ns, ns
Chronic joint subluxation	37 (33%)	23 (45%)	3 (23%)	2 (33%)	6 (50%)	ns, ns, ns, ns
Tendon/muscle rupture	8 (7%)	8 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (18%)	ns, ns, ns, ns
Talipes equinovarus (clubfoot)	16 (14%)	11 (23%)	1 (10%)	0 (0%)	1 (10%)	ns, ns, ns, ns
Early-onset varicose veins	31 (27%)	19 (41%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	ns, ns, ns, ns
Carotido-cavernous fistula	11 (9%)	4 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	ns, ns, ns, ns
Pneumothorax	12 (10%)	5 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	ns, ns, ns, ns
Familial sudden death ^a	25 (34 %)	9 (22 %)	3 (38 %)	1 (20 %)	1 (13%)	ns, ns, ns, ns
Median number of minor criteria	2[1-3]	2[2-4]	1[1-2]	1[0-1]	1[0-2]	*, *, **, **

^a index-cases only only, p-values stratified for index status: * <.05; **<.01; ***<.001; percentages were calculated on the basis of available data for each item.

Supplementary Table 6 : Distribution of residues substituting a Glycine residue according to three classes reflecting their destabilizing effect on collagen**assembly****Supplementary Table 6a :****Observed and expected* distribution of substituting residues: index-cases only**

	Observed	Expected	p-value	Class
Ala	1	9.1	0.021	under
Ser	11	20.5	0.640	under
Cys	0	7	-	-
Arg	11	12.9	0.666	equal
Val	18	8.1	0.056	over
Glu	9	3.8	0.090	over
Asp	29	15.5	0.027	over
Trp	0	0.3	-	-
Stop	0	1.7	-	-
Total	79	79		

*calculated from the corrected expected numbers given in Persikov et al. 2004

Supplementary Table 6b :**Observed and expected* distribution of substituting residues: all patients**

	Observed	Expected	p-value	Class
Ala	2	14.6	0.003	under
Ser	23	32.9	0.178	under
Cys	0	11.3	-	-
Arg	19	20.8	0.890	equal
Val	27	13.0	0.025	over
Glu	15	6.2	0.077	over
Asp	41	24.9	<0.001	over
Trp	0	0.5	-	-
Stop	0	2.7	-	-
total	127	127		

*calculated from the corrected expected numbers given in Persikov et al. 2004

Supplementary Table 7 : Mean features of patients with Gly substitutions according to the substituting residues

	Asp/Val/Glu N=83	Arg N=19	Ser/Ala N=25	A/V/G vs S/A p-value
Index cases	56 (83%)	11 (57%)	12 (48%)	0.077
Male gender	28 (33%)	10 (52%)	11 (44%)	0.348
Caucasian ethnicity	79 (98%)	18 (95%)	25 (100%)	0.730
Median age at genetic diagnosis	34[24-45]	36[28-40]	37[32-41]	0.143
Median age at last follow-up visit	36[28-40]	39[27-48]	39[30-45]	0.687
Sudden death family history	32 (40%)	6 (35%)	14 (56%)	0.174
Characteristic facial appearance	67 (87%)	11 (73%)	14 (59%)	0.003
Thin translucent skin	69 (90%)	15 (100%)	18 (81%)	0.240
Acrogeria	49 (64%)	13 (92%)	11 (50%)	0.219
Extensive bruising	63 (78%)	12 (22%)	13 (16%)	0.012
≥1 major complication	42/48 (88%)	14 (75%)	9/9 (100%)	0.311
≥1 vascular complication	57 (71%)	14 (87%)	18 (75%)	0.497
≥1 digestive complication	29 (36%)	8 (47%)	7 (28%)	0.449
≥1 obstetrical complication†	10 (19%)	2 (25%)	4 (33%)	0.286
Median age of 1 st major complication	29[22-36]	29[22-36]	32[28-41]	0.272
Median number of major criteria	3[2-4]	3[2-4]	3[1-4]	0.257
Median number of minor criteria	2[1-3]	2[1-3]	2[1-2]	0.178

† females only, quantitative variables are given in medians [interquartile range]; percentages were

calculated on the basis of available data for each item.

5.3 Discussion

Cette publication rapporte les données de 215 patients atteints de SEDv moléculairement prouvé. Il s'agit de la plus large série européenne publiée (Tableau 3-1). Les données démographiques sont comparables à celles des cohortes nord-américaines (Pepin et al. 2014; Shalhub et al. 2014): 17% des patients avec SEDv ont présenté une complication avant l'âge de 20 ans et 71% avant l'âge de 40 ans, l'âge médian étant de 29 ans. En revanche les modalités d'inclusion des patients et l'exhaustivité des données cliniques diffèrent entre la cohorte nord-américaine et celle rapportée ici. Au vu des données démographiques : un âge moyen 6 ans plus jeune, et la proportion plus élevée de cas index sans complication majeure (30% versus 10% dans notre cohorte), les tests génétiques pour COL3A1 sont effectués plus précocement et plus fréquemment devant une histoire familiale compatible ou un examen clinique évocateur en Amérique du nord (Pepin et al. 2014). Sur les 630 cas index rapportés par Pepin et al. 572 présentent une mutation du gène COL3A1 et 58 un diagnostic biochimique (procollagène de type III anormal après culture de fibroblastes). Par ailleurs, parmi les 601 apparentés, 321 présentent une mutation du gène COL3A1 ou un diagnostic biochimique, et 280 une histoire clinique compatible : transmission obligatoire d'après l'arbre généalogique, ou complication majeure compatible avec un SEDv à type de rupture artérielle, dissection, ou anévrisme, perforation digestive, ou rupture d'organe creux. Enfin, les données cliniques, et de suivi, sont obtenues à partir du formulaire qui accompagne le prélèvement sanguin pour le test génétique. Dans notre centre, l'ensemble des cas index et des apparentés sont examinés cliniquement puis suivis régulièrement avec contrôle d'imagerie même en l'absence de symptôme. Les 215 patients (146 cas index et 69 apparentés) rapportés présentent tous une mutation dans la séquence du gène COL3A1. Ceci explique l'exhaustivité des données cliniques, tant chez les cas index que leurs apparentés et les fréquences plus élevées de complications majeures : artérielle, digestive ou obstétricales (Frank et al. 2015a).

Cinq groupes de mutations ont été définis : groupe 1 : les mutations responsables d'une substitution glycine de la triple hélice ; groupe 2 : les mutations des sites d'épissage, les insertions, les délétions sans décalage du cadre de lecture ; groupe 3 : les mutations responsables d'haploinsuffisance ; groupe 4 : les mutations responsables d'une substitution d'un autre acide aminé que la glycine au sein de la triple hélice ; groupe 5 : les mutations affectant les extrémités N et C terminales. Par rapport à la problématique de la relation génotype-phénotype, cette étude apporte des éclairages intéressants (Tableau 3-1).

Les complications digestives affectent 36% des patients du groupe 1 et 34% des patients du groupe 2. En revanche, aucun patient (âge médian 45 ans) des groupes 3, 4, et 5 ne présentent de complications digestives. Dans une série de 54 patients SEDv avec haploinsuffisance aucune complication digestive n'était rapportée également (Leistriz et al. 2011). En revanche Shalhub et al. ont retrouvé 2% de complications digestives en cas d'haploinsuffisance contre 14% pour toute autre mutation (Shalhub et al. 2014). Les collagènes I et III sont les collagènes majoritaires du colon mais leurs rôles respectifs semblent différents. Dans la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire du tube digestif, l'épaississement de la paroi et la fibrose de celle-ci est essentiellement due à l'augmentation du collagène de type III, et dans une moindre mesure des collagène de type V et I (Alexakis et al. 2004). En réaction à l'inflammation de la paroi colique, une augmentation de la synthèse du collagène de type III semble ainsi plus importante que celle des autres collagènes. En revanche dans les cancers coliques, la proportion de collagène de type III diminue à 53% de la somme des collagènes I et III, contre 65% dans le tissu colique sain. Par ailleurs, les « cross-link » du collagène de type I y sont fortement diminués (Bode et al. 2000). À l'inverse, dans les diverticules coliques, formations sacciformes de la paroi colique, une augmentation de la régénération du collagène de type III est retrouvée comparativement au tissu colique contrôle (Bode et al. 2000). Ces diverticules peuvent être observées dans la paroi colique des patients atteints de SEDv. Il semble donc que l'impact des mutations du groupe 1 et 2, qui engendrent

des anomalies qualitatives et quantitatives du collagène de type III, soit supérieur au niveau de la résistance de la colique que les conséquences des mutations des autres groupes et qui n'engendrent probablement que des anomalies quantitatives et non qualitatives, comme dans l'haploinsuffisance (groupe 3).

Concernant l'haploinsuffisance d'ailleurs, il est intéressant de noter que l'atteinte aortique (anévrisme, dissection, rupture) est plus précoce et plus fréquente, 50 % des patients du groupe 3, qu'au sein des autres groupes : 19% des patients du groupe 1, 13% des patients du groupe 2. Ceci est en accord avec les données de la littérature (Shalhub et al. 2014) et suggère que la diminution quantitative du collagène de type III dans la paroi aortique est probablement le mécanisme prépondérant de la fragilité vasculaire de ce tissu.

En revanche il n'a pas été mis en évidence de modification du phénotype en fonction de la position de la glycine substituée, en accord avec les données de la cohorte nord-américaine (Pepin et al. 2014) et en désaccord avec des données antérieures qui avaient retrouvé une sévérité supérieure à mesure que l'on se rapprochait de l'extrémité C-terminale (Pope et al. 1996).

Néanmoins, 10% des patients de la cohorte présentaient des mutations des groupes 4 et 5, c'est à dire des substitutions n'intéressant pas une glycine mais un autre acide aminé de la triple hélice ou des mutations, insertions, délétions des domaines N ou C terminaux. Le phénotype des patients est moins caractéristique, une moindre prévalence des complications artérielles, l'absence de complication digestives et moins de critères majeurs ou mineurs, à l'exception peut-être d'une hyperlaxité articulaire plus fréquente. Cette constatation a déjà rapporté dans une famille avec SED hypermobile qui présentait néanmoins une mutation de COL3A1 responsable d'une substitution au sein de l'extrémité N-terminale du collagène III. Les mutations rapportées dans ces groupes 4 et 5 sont plus que de simples polymorphismes au vu des prédictions informatiques de pathogénicité et du phénotype avec peau fine

et translucide pour plus de la moitié d'entre eux, des complications artérielles pour 63% des patients et, une hyperlaxité articulaire.

Un versant non étudié dans cette étude est la pénétrance incomplète et la variabilité phénotypique pour une même mutation. De fait, l'analyse de paramètre est difficile car la grande majorité des mutations sont privées et seulement 7 % des substitutions glycines sont récurrentes. Néanmoins, au sein d'une même famille il n'est pas rare d'observer des complications artérielles chez un membre, digestives chez l'autre membre et aucune complication chez le 3^{ème}. Gilchrist et al. ont pu étudier au sein d'une même famille sur 5 générations, les phénotypes de 15 patients atteints de SEDv avec substitution d'une glycine en position 571 par une sérine. Le seul critère partagé par tous les sujets était les ecchymoses faciles. Dans cette étude nous n'avons pris en compte que les apparentés du premier degré afin de ne pas biaiser les analyses par un poids trop important de certaines mutations du fait d'un nombre trop important apparentés dans certaines familles. L'étude des relations phénotypes en lien avec un seul génotype est en cours dans notre centre et pourrait déboucher sur de nouvelles voies physiopathologiques intéressant notamment les modifications post-traductionnelles du procollagène de type III (Myllyharju and Kivirikko 2004).

	Pope et al.1996		Leistriz et al. 2011	Shalhub et al. 2014		Frank et al. 2015				
	Gly substit.	Splice/Ins/Del	Haploinsuf.	MIN	Haploinsuf.	Gly substit.	Splice/Ins/Del	Haploinsuf.	non-Gly substit.	extrémités C/N
	N=14	N=11	N=54	N=58	N=9	N=127	N=55	N=14	N=7	N=12
homme	36%	18%	46%	30%	78%	39%	45%	36%	29%	17%
âge (ans)	24 (10-38)	32 (14-50)	44 (5-83)	40 (8-70)	48 (26-62)	34 (27-42)	25 (18-33)	46 (38-52)	45 (44-48)	45 (38-49)
faciès caractéristique	79%	73%	14%	66%	33%	80%	94%	64%	14%	30%
peau fine translucide	86%	100%	16%	62%	12%	90%	98%	92%	67%	56%
ecchymoses faciles	36%	18%		79%	56%	76%	94%	64%	43%	20%
complication artérielle	64%	55%	52%	100%	100%	74%	68%	93%	71%	55%
complication digestive	7%	0%		14%	2%	36%	34%	0%	0%	0%
complication utérine	7%	0%		1	0	22%	24%	22%	25%	25%
acrogérie	86%	0%	2%			65%	78%	27%	0%	10%
rétraction gingivale						8%	33%	11%	0%	0%
hyperlaxité articulaire	21%	18%	12%	48%	11%	33%	45%	23%	33%	50%
rupture tendineuse/musculaire				10%	0%	7%	16%	0%	0%	18%
pied bot	14%	0%		10%	0%	14%	23%	10%	0%	10%
varices précoces	0%	9%		16%	0%	27%	41%	20%	0%	0%
fistule carotido-caverneuse	7%	0%		7%	0%	9%	8%	0%	0%	0%
pneumothorax-hémithorax	14%	9%	4%	24%	11%	10%	10%	0%	0%	0%
histoire familiale	36%	45%		60%	89%	34%	22%	38%	20%	13%

Tableau 5-1: Caractéristiques cliniques des patients atteints de SEDv en fonction du type d'altération génique COL3A1.

Gly substit. : substitution d'une glycine du domaine de la triple hélice pour un autre acide aminé ; Splice/Ins/Del : mutation du site d'épissage, insertion, délétion ; Haploinsuf. : haploinsuffisance ; MIN : toute altération génique responsable d'une production mineure de la protéine collagène type III en opposition à l'haploinsuffisance (Shalhub et al. 2014); non-Gly substit. : substitution au sein du domaine de la triple hélice affectant un autre acide aminé qu'une glycine; extrémités C/ N : altérations géniques des domaines N et C terminaux. L'âge est exprimé en médiane (25^{ème}-75^{ème} percentiles)

6 Article 2 publié : Modification de la rigidité carotidienne au cours du cycle cardiaque par ultrafastécho chez le volontaire sain et dans le syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire.

Cet article a été publié:

Mirault T, Pernet M, Frank M, Couade M, Niarra R, Azizi M, Emmerich J, Jeunemaitre X, Fink M, Tanter M and Messas E. Carotid stiffness change over the cardiac cycle by ultrafast ultrasound imaging in healthy volunteers and vascular Ehlers-Danlos syndrome. *J Hypertens.* 2015 ;33 (9) : 1890–6

6.1 Objectifs du travail

Nous avons cherché à utiliser les nouvelles capacités d'évaluation tissulaire de l'imagerie échographique ultrarapide pour l'évaluation de la rigidité artérielle locale sur une population de sujets sains (pour les valeurs normales) et de sujets avec troubles caractéristiques de la rigidité de la paroi artérielle comme retrouvés dans le Syndrome d'Ehlers Danlos vasculaire (SEDv). Le principe directeur de cette recherche est d'utiliser la précision temporelle, spatiale et locale de cette nouvelle technique, afin d'obtenir des informations sur la non-linéarité et l'anisotropie de la rigidité artérielle locale, afin de déterminer plus efficacement le phénotype vasculaire des patients souffrant SEDv, et de mieux évaluer le pronostic local et global des patients à haut risque cardiovasculaire.

Les caractéristiques viscoélastiques de la paroi artérielle ont déjà été étudiées par échotracking par l'équipe de pharmacologie clinique du Pr. Boutouyrie de l'HEGP. Dans cette étude de référence, les caractéristiques retrouvés étaient une épaisseur intima media diminuée, une contrainte circonférentielle augmentée et une augmentation de l'élasticité de la paroi artérielle (Boutouyrie et al. 2004).

C'est donc les caractéristiques artérielles de ces patients et notre expertise sur ce type de maladie qui nous a incité à choisir ce type de patient afin d'étudier les capacités de l'imagerie échographique ultrarapide d'évaluer de façon locale et instantanée les modifications des propriétés viscoélastiques de la paroi artérielle dans cette pathologie.

6.1.1 Objectif principal

L'objectif principal est l'établissement des valeurs normales de la VOP par imagerie ultrafastécho sur un segment localisé de la paroi artérielle de sujets sains (segment carotidien).

6.1.2 Objectifs secondaires

L'évaluation de la répétabilité des mesures de VOP locale par ultrafastécho et VOP régionale par Sphygmocor®. L'étude au cours du cycle cardiaque des VOP par ultrafastécho. La comparaison entre la population témoin et les patients SEDv des paramètres analysables par ultrafastécho.

6.1.3 Type d'étude - Plan expérimental

Étude monocentrique interventionnelle ouverte chez 100 sujets volontaires sains et 30 patients ayant un SEDv, des deux sexes et de 18 à 70 ans évaluables. Dix volontaires sains de chaque sexe et par tranche d'âge (5 tranches d'âge : 18-30 ; 30-40 ; 40-50 ; 50-60 ; 60-70) seront inclus au CIC de l'HEGP après vérification des critères d'éligibilité habituels pour ce type de population (bilan biologique normal, signes vitaux normaux, pas de maladies systémiques ou de traitements en cours) et signature du formulaire de consentement. Les 30 patients avec SEDv seront recrutés à partir du fichier du Centre de Référence des Maladies Vasculaires Rares de l'HEGP et inclus après signature du formulaire de consentement et vérification du diagnostic de la maladie selon les critères suivants : Tout patient de 18 à 70 ans ayant un SEDv confirmé par la présence d'une mutation pathogène sur le gène COL3A1 et ayant un segment artériel carotidien indemne de lésion sera potentiellement éligible pour être inclus dans l'étude.

6.2 Article

Carotid stiffness change over the cardiac cycle by ultrafast ultrasound imaging in healthy volunteers and vascular Ehlers–Danlos syndrome

Tristan Mirault^{a,b,*}, Mathieu Pernot^{c,d,*}, Michael Frank^{b,e}, Mathieu Couade^{c,d}, Ralph Niarra^e, Michel Azizi^e, Joseph Emmerich^{a,b}, Xavier Jeunemaître^b, Mathias Fink^{c,d}, Mickaël Tanter^{c,d}, and Emmanuel Messas^{a,b}

Objectives: Arterial stiffness is related to age and collagen properties of the arterial wall and can be indirectly evaluated by the pulse wave velocity (PWV). Ultrafast ultrasound imaging, a unique ultrahigh frame rate technique (>10 000 images/s), recently emerged enabling direct measurement of carotid PWV and its variation over the cardiac cycle. Our goal was to characterize the carotid diastolic–systolic arterial stiffening using ultrafast ultrasound imaging in healthy individuals and in vascular Ehlers–Danlos syndrome (vEDS), in which collagen type III is defectuous.

Methods: Ultrafast ultrasound imaging was performed on common carotids of 102 healthy individuals and 37 consecutive patients with vEDS. Results are mean ± standard deviation.

Results: Carotid ultrafast ultrasound imaging PWV in healthy individuals was 5.6 ± 1.2 in early systole and 7.3 ± 2.0 m/s in end systole, and correlated with age ($r = 0.48$; $P < 0.0001$ and $r = 0.68$; $P < 0.0001$, respectively). Difference between early and end-systole PWV increased with age independently of blood pressure ($r = 0.54$; $P < 0.0001$). In patients with vEDS, ultrafast ultrasound imaging PWV was 6.0 ± 1.5 in early systole and 6.7 ± 1.5 m/s in end systole. Carotid stiffness change over the cardiac cycle was lower than in healthy people (0.021 vs. 0.057 m/s per mmHg; $P = 0.0035$).

Conclusion: Ultrafast ultrasound imaging can evaluate carotid PWV and its variation over the cardiac cycle. This allowed to demonstrate the age-induced increase of the arterial diastolic–systolic stiffening in healthy people and a lower stiffening in vEDS, both characterized by arterial complications. We believe that this easy-to-use technique could offer the opportunity to go beyond the diastolic PWV to better characterize arterial stiffness change with age or other collagen alterations.

Keywords: arterial stiffness, pulse wave velocity, ultrafast, ultrasound, vascular aging, vascular Ehlers–Danlos syndrome

Abbreviations: cfPWV, carotid-femoral pulse wave velocity; PP, pulse pressure; PWV, pulse wave velocity;

ufPWV, ultrafast ultrasound imaging pulse wave velocity; vEDS, vascular Ehlers–Danlos syndrome

INTRODUCTION

Arterial or carotid-femoral pulse wave velocity (cfPWV) has been shown to correlate well with cardiovascular risk factors and mortality [1–5]. Considered the gold standard for measuring arterial stiffness, European guidelines integrate cfPWV for the management of arterial hypertension [6,7]. The method relies on the measure of the transit time of the pulse wave between carotid and femoral arteries in early systole, that is, at DBP. Its accuracy is limited by errors made at that distance [8,9] and the timing algorithm used [10], even though efforts at standardization have been made [7,11,12]. But cfPWV can only provide the weighted average PWV over the distance between the two measurement sites, whereas stiffness is not uniform along the arterial tree. This context has fostered the development of new technologies to evaluate arterial stiffness at a local stage [13]. Local PWV of carotid, aorta, radial, or femoral arteries have thus been measured using different methods on different devices: transit time of the pulse wave between two sites using ultrasound imaging [14,15] or MRI [16,17]; compliance estimation from early

Journal of Hypertension 2015, 33:1890–1896

^aService de Médecine Vasculaire, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Pôle Cardiovasculaire, ^bCentre de Référence National Maladies Vasculaires Rares, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Assistance Publique Hôpitaux de Paris – APHP, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, PARCC, ^cInstitut Langevin Ondes et Images, ESPCI ParisTech, CNRS UMR 7587, Inserm, Paris, ^dSuperSonic Imagine, Aix en Provence and ^eCentre d'Investigation Clinique, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Assistance Publique Hôpitaux de Paris – APHP, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Correspondence to Emmanuel Messas, MD, PhD, FACC, FESC, Chief of Vascular Unit and Vascular Ultrasound Laboratory, Cardiovascular Department, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Hôpitaux Universitaires Paris Ouest, 20 rue Leblanc, Paris 75015, France. Tel: +33 1 56 09 37 55; fax: +33 1 56 09 30 65; e-mail: emmanuel.messas@egp.aphp.fr

*Tristan Mirault and Mathieu Pernot contributed equally to the writing of this article.

Received 1 February 2015 **Revised** 30 March 2015 **Accepted** 30 March 2015

J Hypertens 33:1890–1896 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/HJH.0000000000000617

systolic flow and artery area or diameter using ultrasounds [18–20] or MRI [17]; and distensibility from artery area and pulse pressure (PP) using echotracking [21,22] or MRI [16,17,23]. However, each technique presents limitations [13,20]. The equipment is expensive and a fairly high level of technical expertise is often required. All of this may hamper the use of local PWV in clinical practice. Ultrafast ultrasound imaging has recently emerged as a unique ultra-high frame rate technique enabling visualization of rapid events. Embedded into a conventional vascular Doppler ultrasound apparatus, ultrafast ultrasound imaging can be easily used to determine, with a good repeatability, the carotid PWV by switching from the B mode to the ultrafast ultrasound imaging mode [24,25]. During the last decade, ultrafast ultrasound imaging was proposed as a new technique to overcome the trade-off between frame rate and the number of scanlines, an important limitation in conventional ultrasound imaging. Ultrafast ultrasound imaging uses plane wave transmits with different inclinations [26] and a sampling rate of over 10 000 frames/s, which allows tracking of the pulse wave in real time and thereby measures the PWV [25]. It can measure the velocity of the pulse wave generated not only at the aortic valve opening (early systole) but also at the aortic valve closure (end systole) [24]. These two waves have been well described by Hermeling *et al.* as a forward compression wave (early systole) and forward expansion wave (end systole) propagating at different velocities [19,22,27,28]. In addition, systolic PWV may be more suited to quantify changes in arterial stiffness with age than diastolic PWV [21]. Therefore, our goal was to use ultrafast ultrasound imaging to study the carotid PWV change over the cardiac cycle, and the impact of modifying factors such as age or a collagen modification. cfPWV was used as an internal reference marker of aortic stiffness [29]. We choose to apply ultrafast ultrasound imaging in a broad-age range healthy population and on patients affected by the vascular Ehlers–Danlos syndrome (vEDS). vEDS is a rare vascular disease resulting in mutations in *COL3A1*, the collagen type III gene. Mainly present in the arterial wall, collagen type III alterations induce crosslinking defects, disorganized fibrills, including collagen type I fibrills, with highly variable diameters, reduce the intima–media thickness, increase carotid wall stress, and expose patients to arterial dissections or rupture [30,31].

METHODS

Study population

This observational study recruited 117 healthy volunteers equally distributed by sex and age class (18–29; 30–39; 40–49; 50–59; 60–70 years) and 37 consecutive patients with vEDS, with confirmed mutation in the *COL3A1* gene, from the French National Reference Center for rare vascular diseases. Volunteers were recruited from the database held by the Center for Clinical Investigations of our hospital and through the website Volterys (www.volterys.fr) that offers an anonymous interface between the investigator and the volunteers. Our institutional local medical ethics committee approved this study and all participants gave written informed consents. This study has the ClinicalTrials.gov

identifier NCT01096264. Supplemental material details inclusion and exclusion criteria are available at <http://links.lww.com/HJH/A488> and <http://links.lww.com/HJH/A489>.

Protocol procedure

After 10 min of recumbent rest, peripheral blood pressure was recorded from the left brachial artery using an automated Omron 705CP oscillometric device (Omron Healthcare, Kyoto, Japan). Central aortic blood pressure was provided by the SphygmoCor Vx system (AtCor Medical Pty Ltd., Sydney, Australia). Ultrasound examinations, ultrafast ultrasound imaging and SphygmoCor, were then performed successively on the same day and in the same examination room at the Center for Clinical Investigations. The patient was settled in supine position (back slightly raised) with electrodes placed for ECG recording. Supplemental material details procedures and calculations for each PWV are available at <http://links.lww.com/HJH/A488> and <http://links.lww.com/HJH/A489>.

Statistics

The results were presented with their mean \pm standard deviation and median (25th–75th percentiles) and described with an analysis of variance and covariance. The correlation between the measurements was evaluated with the Spearman correlation test. Repeatability of measurements by ultrafast ultrasound imaging and SphygmoCor devices was assessed using analysis of covariance to calculate the measurement error (standard deviation of the within-patient variance), using mixed model repeated measurements adjusted for age, sex, and blood pressure level. The risk of first kind was set at 5% for all statistical tests. We used SAS software version 9.2 (SAS Inc., Cary, North Carolina, USA) for all statistical analyses.

RESULTS

Healthy population

Study population

Among the 117 healthy volunteers recruited, 15 were excluded because of high blood pressure, ECG abnormalities or biological perturbation, with dyslipidemia and toxin-positive test. The population had an equilibrated sex ratio (51% women), a wide age range, normal SBP and DBP, and heart rate (Tables 1 and 2). The SphygmoCor cfPWV value was 7.6 ± 1.7 m/s and considered normal (50th percentile) according to the reference values for arterial stiffness [11].

Acquisition, repeatability, and agreement of pulse wave velocity measurements

Ultrafast ultrasound imaging was successful in all patients for ultrafast ultrasound imaging PWV (ufPWV) early and end systole in both carotids. The ufPWV mean time acquisition was 1.2 min. Repeatability of the carotid ufPWV measured by ultrafast ultrasound imaging was comparable to the measurement of cfPWV by SphygmoCor (0.81 vs 1.30; $P < 0.0001$ for ufPWV early systole vs cfPWV, and 1.07 vs 1.30; $P < 0.0001$ for ufPWV end systole) using

TABLE 1. Population characteristics and pulse wave velocity values

n = 102	Mean ± standard deviation	Median (25th–75th)
Age (year)	44.3 ± 14.5	45.0 (33.0–56.0)
Weight (kg)	70.0 ± 12.1	69.8 (60.0–77.9)
BMI (kg/m ²)	24.0 ± 2.9	24.0 (22.0–25.4)
LDLc (mmol/l)	3.2 ± 0.7	3.2 (2.6–3.6)
Peripheral blood pressures		
SBP (mmHg)	123.0 ± 11.6	122.0 (115.0–129.0)
DBP (mmHg)	70.5 ± 8.1	70.5 (64.5–75.5)
Pulse pressure (mmHg)	52.5 ± 7.7	51.5 (47.0–58.0)
Central blood pressures		
SBP (mmHg)	109.9 ± 15.5	108.0 (101.0–118.0)
DBP (mmHg)	69.9 ± 8.7	70.0 (64.0–76.0)
Pulse pressure (mmHg)	40.0 ± 11.4	38.0 (33.0–43.0)
Heart rate (bpm)	63.5 ± 10.0	63.3 (56.0–70.0)
PWV		
cfPWV (m/s)	7.6 ± 1.7	7.3 (6.5–8.2)
ufPWV early systole (m/s)	5.6 ± 1.2	5.6 (4.7–6.3)
ufPWV end systole (m/s)	7.3 ± 2.0	7.1 (6.0–8.7)

(25th–75th), 25th to the 75th percentile; cfPWV, carotid-femoral pulse wave velocity; LDLc, low-density lipoproteins cholesterol; ufPWV, ultrafast ultrasound imaging pulse wave velocity.

intraindividual variance square adjusted on age, sex, and central blood pressures. Although the different paths and site of measurement for PWV, we found a good agreement between ultrafast ultrasound imaging and SphygmoCor, with a mean difference of 1.4 ± 2.2 m/s (Bland–Altman analysis) (Fig. 1).

Ultrafast ultrasound imaging values of carotid pulse wave velocity

Carotid ufPWV did not differ between left and right common carotid artery, with a difference of 0.15 ± 1.47 m/s (*P* = 0.348) in early systole and 0.29 ± 2.68 m/s (*P* = 0.319) in end systole. Mean right and left carotid ufPWV was 5.6 ± 1.2 m/s in early systole and significantly increased to 7.3 ± 2.0 m/s in end systole (*P* < 0.0001) (Table 1). Neither sex nor BMI was correlated to ufPWV.

Influence of age on carotid pulse wave velocity

UfPWV early systole (*r* = 0.476; *P* < 0.0001), ufPWV end systole (*r* = 0.682; *P* < 0.0001), and cfPWV (*r* = 0.609; *P* < 0.0001) were correlated to age. The plot of PWV values with age shows that ufPWV early-systole increased by 0.04 ± 0.01 m/s per year and ufPWV end systole by 0.09 ± 0.01 m/s per year (Fig. 2a). Similarly, cfPWV

increased by 0.07 ± 0.01 m/s per year. Like cfPWV, ufPWV significantly increased with age classes even after adjustment for blood pressures (Table 3).

Influence of age on diastolic–systolic arterial stiffening

The difference between the two ufPWV (ΔPWV) was correlated to age (*r* = 0.575; *P* < 0.0001) and increased significantly with age classes (*P* < 0.0001) even after adjustment for central (*P* = 0.0042) or peripheral blood pressures (*P* = 0.0001). But PP, which is known to increase with age, could confound the increase in ΔPWV with age. In order to normalize the diastolic–systolic stiffening, we therefore calculated the ΔPWV/PP. This ratio correlated to age (*r* = 0.535; *P* < 0.0001) and steadily increased within age classes (*P* = 0.0023; *P* = 0.0003) using central or peripheral PP, respectively (Table 4, Fig. 2b and c).

Influence of vascular Ehlers–Danlos syndrome on ultrafast ultrasound imaging parameters

Patients with vEDS were 38.6 ± 13.5 years old and weighted 59.2 ± 11.7 kg, both lower compared with controls. But sex ratio, heart rate, SBP, and DBP did not differ, neither the SphygmoCor cfPWV nor the ufPWV: 6.0 ± 1.5 m/s in early

TABLE 2. Clinical characteristics according to age

	[18–29] n = 20	[30–39] n = 20	[40–49] n = 21	[50–59] n = 20	[60–70] n = 21	<i>P</i> value
Male, n (%)	10 (50)	10 (50)	10 (47.6)	10 (50)	10 (47.6)	0.9996
BMI (kg/m ²)	23.1 ± 1.9	22.8 ± 2.7	23.8 ± 3.2	25.0 ± 2.8	25.0 ± 2.9	0.0286
LDLc (mmol/l)	2.5 ± 0.5	3.0 ± 0.6	3.2 ± 0.6	3.5 ± 0.7	3.6 ± 0.8	<0.0001
Peripheral blood pressures						
SBP (mmHg)	121.7 ± 7.1	118.6 ± 10.9	121.2 ± 15.1	124.0 ± 11.2	129 ± 10.4	0.0356
DBP (mmHg)	66.3 ± 7.0	68.4 ± 7.0	71.8 ± 8.9	72.7 ± 7.9	73.3 ± 7.7	0.0194
Pulse pressure (mmHg)	55.4 ± 5.6	50.3 ± 6.8	49.5 ± 8.9	51.3 ± 7.5	56.1 ± 7.5	0.0099
Central blood pressures						
SBP (mmHg)	107.5 ± 9.8	104.0 ± 17.5	112.4 ± 13.6	110.7 ± 16.1	114.1 ± 17.8	0.2989
DBP (mmHg)	69.1 ± 7.2	65.3 ± 8.7	70.9 ± 8.7	70.2 ± 6.9	73.7 ± 9.9	0.0534
Pulse pressure (mmHg)	38.4 ± 9.3	38.7 ± 15.6	41.5 ± 8.1	40.5 ± 12.8	40.4 ± 10.4	0.9260
Heart rate (bpm)	64.3 ± 10.5	63 ± 12.4	65.8 ± 10.5	61.0 ± 8.4	62.5 ± 8.3	0.6263

Results are mean ± standard deviation. LDLc = low-density lipoproteins cholesterol.

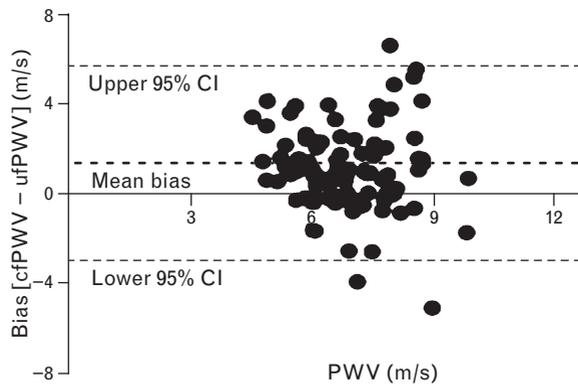


FIGURE 1 Bland–Altman diagram demonstrating good agreement between ultrafast ultrasound imaging and SphygmoCor. Mean bias = cfPWV (SphygmoCor) – ufPWV (ultrafast ultrasound imaging) – and 95% CI is 1.38 (–2.89; 5.65). cfPWV, carotid-femoral pulse wave velocity; CI, confidence interval; ufPWV, ultrafast ultrasound imaging pulse wave velocity.

systole and 6.7 ± 1.5 m/s in end systole. However, the Δ PWV/PP ratio was lower than in healthy individuals, even after adjustment for age and weight (0.021 vs. 0.057 m/s per mmHg; $P=0.0035$) (0.014 vs. 0.039 m/s per mmHg; $P=0.0014$) using central or peripheral PP (Table 5).

DISCUSSION

Main findings

In this study, we presented the use of ultrafast ultrasound imaging, a new ultrasound-imaging technology for local carotid stiffness assessment in a broad age-range healthy population. Ultrafast ultrasound imaging allowed visualization in real time and measurement of a carotid PWV of 5.6 ± 1.2 m/s in early systole, at the DBP. The inpatient precision of ultrafast ultrasound imaging local PWV measurement was in the same order of magnitude as cfPWV measured by SphygmoCor. As expected, PWV increased with age, at 0.04 ± 0.01 m/s per year, for the ufPWV early systole. cfPWV showed the same relationship with a slope of 0.07 ± 0.01 m/s per year in that study. Moreover, ultrafast ultrasound imaging technology allowed measuring a carotid PWV of 7.3 ± 2.0 m/s from the second pulse wave in end systole. This PWV also increased with age, at 0.09 ± 0.01 m/s per year. As reflected by this steeper slope, the difference between PWV in end systole and PWV in early systole – Δ PWV – increased with age even after adjusting for PP. Consequently, we showed that not only stiffness but also diastolic–systolic stiffening of the carotid arterial wall increased with age, independently of blood pressure. The diastolic–systolic stiffening of the carotid is also impacted in a genetic vascular disease impairing the collagen type III, a major component of the arterial wall.

Technique validation

The ufPWV determined by ultrafast ultrasound imaging is the local wave speed at the site of measurement, carotid in this study, whereas cfPWV determined by SphygmoCor corresponded to a weighted average of PWV over the distance between carotid and femoral measurement sites. Because PWV varies with distance along an artery due to

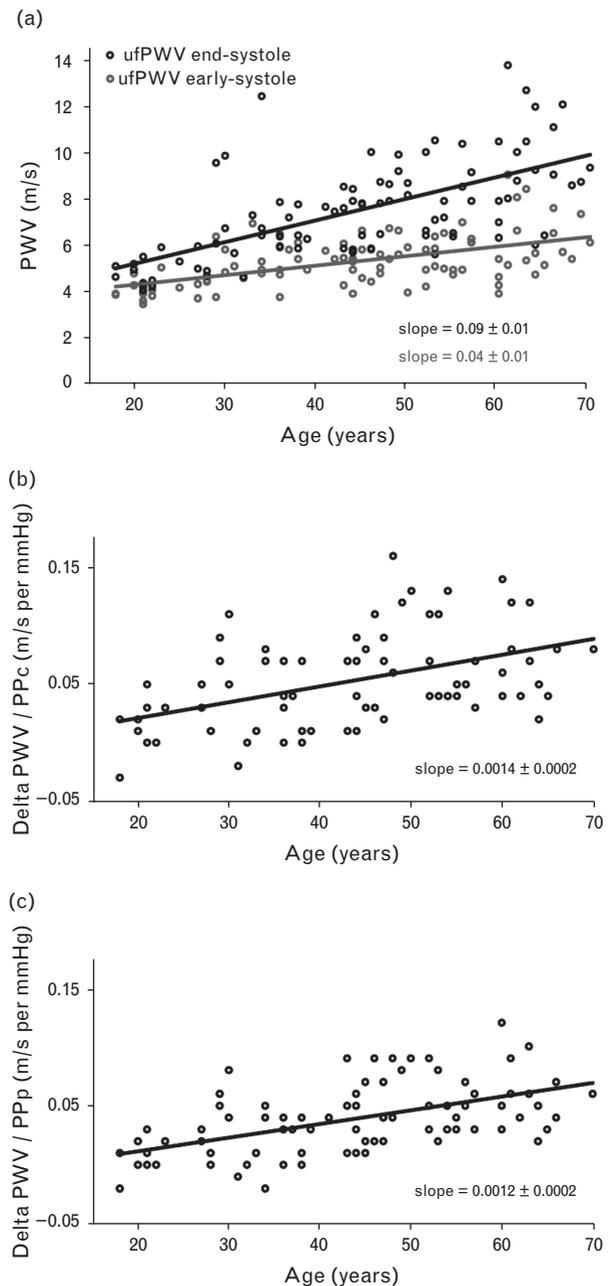


FIGURE 2 Influence of age on local carotid pulse wave velocity. (a) Dependence of ufPWV early or end systole with age is different. (b) and (c) Delta PWV over pulse pressure increases with age (Δ PWV = ufPWV end systole – ufPWV early systole). cfPWV, carotid-femoral pulse wave velocity; PPC, central pulse pressure; PPp, peripheral pulse pressure; ufPWV, ultrafast ultrasound imaging pulse wave velocity.

taper or changes in the distensibility, and from vessel to vessel across bifurcations [32,33], cfPWV was therefore expected to be different from ufPWV. However, the PWV determined by each method – cfPWV by SphygmoCor and ufPWV by ultrafast ultrasound imaging – were in good agreement in this healthy population and ultrafast ultrasound imaging repeatability similar to SphygmoCor. Moreover, in accordance with the previous studies, we showed that cfPWV increased with age even after adjustment on blood pressures, with values over age classes comparable

TABLE 3. Values of pulse wave velocity according to age

	[18–29] n = 20	[30–39] n = 20	[40–49] n = 21	[50–59] n = 20	[60–70] n = 21	P value	P* value	P† value
cfPWV (m/s)	6.4 ± 0.8	7.1 ± 1.1	7.4 ± 1.2	7.8 ± 1.2	9.3 ± 2.2	<0.0001	<0.0001	<0.0001
ufPWV early systole (m/s)	4.5 ± 0.7	5.7 ± 0.8	5.6 ± 0.8	5.7 ± 0.9	6.2 ± 1.4	<0.0001	0.0003	0.0002
ufPWV end systole (m/s)	5.3 ± 1.3	7.0 ± 1.9	7.8 ± 1.4	8.1 ± 1.4	9.2 ± 2.1	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Results are mean ± standard deviation. P*, P value adjusted on central SBP, central DBP, and central pulsed pressure; P†, P value adjusted on peripheral SBP, peripheral DBP, and peripheral pulse pressure; cfPWV, carotid-femoral pulse wave velocity; ufPWV, ultrafast ultrasound imaging pulse wave velocity.

TABLE 4. Normal values of carotid ultrafast ultrasound imaging pulse wave velocity increase over the cardiac cycle

	All ages n = 102	[18–29] n = 20	[30–39] n = 20	[40–49] n = 21	[50–59] n = 20	[60–70] n = 21	P value
ΔPWV/PPc (m/s per mmHg)	0.057 ± 0.048	0.030 ± 0.023	0.033 ± 0.051	0.059 ± 0.040	0.078 ± 0.054	0.087 ± 0.041	0.0023
ΔPWV/PPp (m/s per mmHg)	0.039 ± 0.033	0.014 ± 0.019	0.029 ± 0.040	0.047 ± 0.029	0.051 ± 0.024	0.057 ± 0.029	0.0003

Results are mean ± standard deviation. ΔPWV, difference between ufPWV end systole and ufPWV early systole; PPc, central pulse pressure; PPp, peripheral pulse pressure; ufPWV = ultrafast ultrasound imaging pulse wave velocity.

to published reference values, making cfPWV an internal reference marker of the present study [11,29,34–36].

Carotid artery stiffens with aging

Recently, the Rotterdam study showed an increase in aortic PWV and a decrease in carotid distensibility with age [36]. Previously, cfPWV by SphygmoCor was compared with carotid PWV derived from the carotid distensibility through the Bramwell–Hill equation [32]: cfPWV increase was 0.105 ± 0.017 m/s per year vs. 0.090 ± 0.007 m/s per year for carotid PWV [35]. Carotid also stiffened with aging in our study, but with lower slopes for cfPWV and ufPWV in early systole. The younger age of our population probably explained that difference as the relationship between cfPWV increase and age has been described to fit a full quadratic equation [11]. Blood pressure acts as a stress on the arterial wall and increases with age. Although this could explain the rise of PWV with age, PWV correlation with age was still valid after adjustment for blood pressure in our study as in the previous results [11]. The Baltimore Longitudinal Study of Aging even showed that arterial stiffening preceded increases in SBP [5].

Diastolic–systolic arterial stiffening

One of the major interests of ultrafast ultrasound imaging is to provide the velocity of the pulse wave generated not only at the aortic valve opening (early systole) but also at the aortic valve closure (end systole) [24]. These two waves propagate at different levels of blood pressure and it is known that arteries are less distensible at increased pressure [19]. Thus, in addition to carotid stiffness, in this study, we measured the arterial stiffening during the cardiac cycle in response to the blood pressure increase. The 30% increment between ufPWV early systole and ufPWV end systole that we observed is comparable to the 41% reported by Hermeling *et al.* [21].

Increase of diastolic–systolic arterial stiffening with age

The carotid ΔPWV derived from carotid distensibility was already reported to correlate with age [21,28]. In our study,

the dependence with age was over two-fold higher for ufPWV end systole than for ufPWV early systole and we evaluated this stiffening through the ΔPWV/PP to counteract the impact of blood pressure increase. This ratio clearly correlated to age independently of blood pressure and steadily increased within age classes. Arteries become progressively less distensible as collagen fibers are recruited over the cardiac cycle [37]. With aging, fatigue and fracture of the elastin fibers and deposition of collagen arise in the vascular media, causing stretch of the wall with a transfer of stress from the more extensible elastin to the stiffer collagenous fibers [38]. This might account for the progressive gap between ufPWV end systole and ufPWV early systole with aging, and emphasizes the independent role of age on the biomechanical properties of the arterial wall [5,36].

TABLE 5. Vascular Ehlers–Danlos syndrome patients characteristics and pulse wave velocity values

n = 37	Mean ± standard deviation	P value	P* value
Gender female, n (%)	26 (70.3)	0.0534	
Age (year)	38.6 ± 13.5	0.0384	
Weight (kg)	59.2 ± 11.7	<0.0001	
BMI (kg/m ²)	22.0 ± 3.5	0.0008	
Peripheral blood pressures			
SBP (mmHg)	122.5 ± 11.4	0.8163	
DBP (mmHg)	69.7 ± 8.4	0.6144	
Pulse pressure (mmHg)	52.8 ± 7.2	0.8512	
Central blood pressures			
SBP (mmHg)	108.5 ± 15.8	0.8210	
DBP (mmHg)	70.3 ± 9.7	0.9995	
Pulse pressure (mmHg)	38.3 ± 8.3	0.7408	
Heart rate (bpm)	67.4 ± 10.8	0.0603	
PWV			
cfPWV (m/s)	7.9 ± 1.4	0.3508	0.0028
ufPWV early systole (m/s)	6.0 ± 1.5	0.0580	0.1069
ufPWV end systole (m/s)	6.7 ± 1.5	0.0759	0.0424
ΔPWV/PPc (m/s per mmHg)	0.021 ± 0.046	0.0010	0.0035
ΔPWV/PPp (m/s per mmHg)	0.014 ± 0.031	0.0018	0.0014

P value from comparison with control values. P*, P value adjusted on age and weight; cfPWV, carotid-femoral pulse wave velocity; PPc, central pulse pressure; PPp, peripheral pulse pressure; ufPWV, ultrafast ultrasound imaging pulse wave velocity; ΔPWV, difference between ufPWV end systole and ufPWV early systole.

Lower diastolic–systolic arterial stiffening in patients with vascular Ehlers–Danlos syndrome

The rise of arterial stiffness at higher blood pressure is characteristic of the nonlinear (or hyperelastic) stress–strain relationship of the arterial wall, and the slope of this increase is linked to the arterial wall microstructure organization and to its content, such as the ratio of collagen/elastin [37,39]. It appeared interesting to look at that slope using ultrafast ultrasound imaging in the vEDS, in which arterial wall collagen type III is abnormal. Patients with vEDS presented a lower increase of PWV during the cardiac cycle compared with healthy individuals, and still after adjustment for age and weight. This result witnessed a lack of arterial stiffening whereas blood pressure heightens in patients with vEDS. Comforting this result, a previous study found a 27% higher carotid distensibility in patients with vEDS, and thus a higher strain than controls [30].

Study limitations

One limitation is the absence of comparison with another local carotid PWV measurement device. The aim of this study was not to compare ultrafast ultrasound imaging to other tools measuring local carotid stiffness but to evaluate the influence of modifying factors (age, collagen alterations) on local carotid PWV change over the cardiac cycle, and to use cfPWV, the gold standard technique, as an internal reference marker. Second, the range of carotid PWV corresponded well to carotid PWV measurements by other techniques either in early or late systole [14,15,18,21]. Third, another study is currently recruiting patients with untreated hypertension testing ultrafast ultrasound imaging and echotracking (NCT01743352). Another limitation in our study was the use of PP to normalize the diastolic–systolic stiffening. Indeed, ufPWV early systole reflects the pulse wave propagation velocity at DBP, but ufPWV end systolic is concomitant to the dicrotic notch, which is slightly lower than the SBP [19,25]. Therefore, using PP gives an approximation of the Δ PWV/PP. Nevertheless, our results confirm those published by Giannattasio *et al.* [22] showing evidence of an increased diastolic–systolic stiffening with age, when measuring the slope of carotid diameter correlated to blood pressure. We are also aware that using the brachial PP as a surrogate for the carotid PP may be erroneous [40], but we provide evidences that Δ PWV/PP using peripheral PP showed the same relationship with age as PWV/PP using central PP. In this study, central aortic blood pressure measured by SphygmoCor was used as local pressure at the site of ultrafast ultrasound imaging measurements [41]. We did not choose the applanation tonometry for local pressure evaluation as it may be unreliable [40,41].

Perspectives

Ultrafast ultrasound imaging is an embedded conventional vascular Doppler ultrasound apparatus that clinicians can easily use to visualize and noninvasively determine the carotid PWV. ufPWV uses neither the Bramwell–Hill model assumptions nor the additional tonometric measurement for the local PP evaluation, and is not influenced by error in distance assessment between measurement sites. Thus, the

measure of brachial PP and carotid PWV does not require a high level of technical expertise and is achievable at patient's bedside by any clinician. By measuring arterial stiffness at different blood pressure levels, ultrafast ultrasound imaging goes beyond the 'classic' PWV in diastole and characterizes more precisely the biomechanical properties of the arterial wall and the impact of vascular aging or genetic defect. Obviously, other studies with a larger population, long-term follow-up on healthy volunteers, and patients with cardiovascular risk factors or with treated high blood pressure are needed to assess the potential cardiovascular prognosis of these new ufPWV parameters [29].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the French Society of Cardiology, especially Dr Anissa Bouzamondo for her help on promoting this research.

Funding Sources: This work was supported in part by grants of Agence National of Research (project TechSan, Paris, France) and by the French Society of Vascular Medicine.

Disclosures: M.T. is the cofounder of SuperSonic Imagine. M.C. is an employee of SuperSonic Imagine.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C, May M, Anderson SG, Benjamin EJ, *et al.* Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63:636–646.
- Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic stiffness: current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57:1511–1522.
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:1318–1327.
- Mitchell GF, Hwang S-J, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, *et al.* Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2010; 121:505–511.
- Najjar SS, Scuteri A, Shetty V, Wright JG, Muller DC, Fleg JL, *et al.* Pulse wave velocity is an independent predictor of the longitudinal increase in systolic blood pressure and of incident hypertension in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:1377–1383.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, *et al.* 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2013; 34:2159–2219.
- Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, *et al.* Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006; 27:2588–2605.
- van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, *et al.* Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *J Hypertens* 2012; 30:445–448.
- Németh ZK, Studinger P, Kiss I, Othmane TEH, Nemcsik J, Fekete BC, *et al.* The method of distance measurement and torso length influences the relationship of pulse wave velocity to cardiovascular mortality. *Am J Hypertens* 2011; 24:155–161.
- Millasseau SC, Stewart AD, Patel SJ, Redwood SR, Chowienczyk PJ. Evaluation of carotid-femoral pulse wave velocity: influence of timing algorithm and heart rate. *Hypertension* 2005; 45:222–226.

11. Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *Eur Heart J* 2010; 31:2338–2350.
12. Wilkinson IB, McEniery CM, Schillaci G, Boutouyrie P, Segers P, Donald A, *et al.* ARTERY Society guidelines for validation of non-invasive haemodynamic measurement devices: part 1, arterial pulse wave velocity. *Artery Res* 2010; 4:34–40.
13. Messas E, Pernot M, Couade M. Arterial wall elasticity: state of the art and future prospects. *Diagn Interv Imaging* 2013; 94:561–569.
14. Di Lascio N, Bruno RM, Stea F, Bianchini E, Gemignani V, Ghiadoni L, *et al.* Noninvasive assessment of carotid PWV via accelerometric sensors: validation of a new device and comparison with established techniques. *Eur J Appl Physiol* 2014; 114:1503–1512.
15. Hermeling E, Reesink KD, Kormmann LM, Reneman RS, Hoeks AP. The dirotic notch as alternative time-reference point to measure local pulse wave velocity in the carotid artery by means of ultrasonography. *J Hypertens* 2009; 27:2028–2035.
16. Redheuil A, Yu W-C, Wu CO, Mousseaux E, de Cesare A, Yan R, *et al.* Reduced ascending aortic strain and distensibility: earliest manifestations of vascular aging in humans. *Hypertension* 2010; 55:319–326.
17. Vulli m oz S, Stergiopoulos N, Meuli R. Estimation of local aortic elastic properties with MRI. *Magn Reson Med* 2002; 47:649–654.
18. Borlotti A, Khir AW, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Vermeersch S, Segers P. Noninvasive determination of local pulse wave velocity and wave intensity: changes with age and gender in the carotid and femoral arteries of healthy human. *J Appl Physiol* 2012; 113:727–735.
19. Khir AW, O'Brien A, Gibbs JS, Parker KH. Determination of wave speed and wave separation in the arteries. *J Biomechanics* 2001; 34:1145–1155.
20. Segers P, Swillens A, Taelman L, Vierendeels J. Wave reflection leads to over- and underestimation of local wave speed by the PU- and QA-loop methods: theoretical basis and solution to the problem. *Physiol Meas* 2014; 35:847–861.
21. Hermeling E, Vermeersch SJ, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Gillebert TC, van de Laar RJ, *et al.* The change in arterial stiffness over the cardiac cycle rather than diastolic stiffness is independently associated with left ventricular mass index in healthy middle-aged individuals. *J Hypertens* 2012; 30:396–402.
22. Giannattasio C, Salvi P, Valbusa F, Kearney-Schwartz A, Capra A, Amigoni M, *et al.* Simultaneous measurement of beat-to-beat carotid diameter and pressure changes to assess arterial mechanical properties. *Hypertension* 2008; 52:896–902.
23. Whelton SP, Blankstein R, Al-Mallah MH, Lima JAC, Bluemke DA, Hundley WG, *et al.* Association of resting heart rate with carotid and aortic arterial stiffness: multiethnic study of atherosclerosis. *Hypertension* 2013; 62:477–484.
24. Couade M, Pernot M, Prada C, Messas E, Emmerich J, Bruneval P, *et al.* Quantitative assessment of arterial wall biomechanical properties using shear wave imaging. *Ultrasound Med Biol* 2010; 36:1662–1676.
25. Couade M, Pernot M, Messas E, Emmerich J, Hagege A, Fink M, *et al.* Ultrafast imaging of the arterial pulse wave. *IRBM* 2011; 32:106–108.
26. Tanter M, Fink M. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2014; 61:102–119.
27. Parker KH, Jones CJ, Dawson JR, Gibson DG. What stops the flow of blood from the heart? *Heart Vessels* 1988; 4:241–245.
28. Hermeling E, Hoeks APG, Winkens MHM, Waltenberger JL, Reneman RS, Kroon AA, *et al.* Noninvasive assessment of arterial stiffness should discriminate between systolic and diastolic pressure ranges. *Hypertension* 2010; 55:124–130.
29. van Sloten TT, Schram MT, van den Hurk K, Dekker JM, Nijpels G, Henry RMA, *et al.* Local stiffness of the carotid and femoral artery is associated with incident cardiovascular events and all-cause mortality. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63:1739–1747.
30. Boutouyrie P, Germain DP, Fiessinger J-N, Laloux B, Perdu J, Laurent S. Increased carotid wall stress in vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Circulation* 2004; 109:1530–1535.
31. Ong K-T, Perdu J, De Backer J, Bozec E, Collignon P, Emmerich J, *et al.* Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome: a prospective randomised, open, blinded-endpoints trial. *Lancet* 2010; 376:1476–1484.
32. Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, *et al.* Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995; 26:485–490.
33. Shahmirzadi D, Konofagou EE, Li RX. Pulse-wave propagation in straight-geometry vessels for stiffness estimation: theory, simulations, phantoms and in vitro findings. *J Biomech Eng* 2012; 134:114502.
34. Khoshdel AR, Thakkinstian A, Carney SL, Attia J. Estimation of an age-specific reference interval for pulse wave velocity: a meta-analysis. *J Hypertens* 2006; 24:1231–1237.
35. Paini A, Boutouyrie P, Calvet D, Tropeano A-I, Laloux B, Laurent S. Carotid and aortic stiffness: determinants of discrepancies. *Hypertension* 2006; 47:371–376.
36. Verwoert GC, Franco OH, Hoeks APG, Reneman RS, Hofman A, V Duijn CM, *et al.* Arterial stiffness and hypertension in a large population of untreated individuals: the Rotterdam Study. *J Hypertens* 2014; 32:1606–1612.
37. Armentano RL, Levenson J, Barra JG, Fischer EI, Breitbart GJ, Pichel RH, *et al.* Assessment of elastin and collagen contribution to aortic elasticity in conscious dogs. *Am J Physiol* 1991; 260:H1870–H1877.
38. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:932–943.
39. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 2009; 89:957–989.
40. Van Bortel LM, Balkestein EJ, van der Heijden-Spek JJ, Vanmolkot FH, Staessen JA, Kragten JA, *et al.* Noninvasive assessment of local arterial pulse pressure: comparison of applanation tonometry and echo-tracking. *J Hypertens* 2001; 19:1037–1044.
41. Chen CH, Ting CT, Nussbacher A, Nevo E, Kass DA, Pak P, *et al.* Validation of carotid artery tonometry as a means of estimating augmentation index of ascending aortic pressure. *Hypertension* 1996; 27:168–175.

Reviewer's Summary Evaluation

Reviewer 2

The study is impressive in showing the rapid and localized capabilities of the Ultrafast Ultrasound Pulse Wave Velocity.

These enhanced attributes might allow for broader and potentially more targeted assessments of carotid stiffness. Whether such assessments provide any added value in terms of risk assessment will, of course, have to be determined by prospective, outcome studies.

Supplementary material

Inclusion and exclusion criteria

The population consisted of vEDS patients from our institution and healthy subjects of Caucasian origin with no tobacco history, a weight between 60 and 100 kg, and a body mass index between 18 and 30 kg/m². Brachial blood pressure was checked as normal (below 140 mm Hg for the systolic and 90 mm Hg for the diastolic blood pressure after 10 min of recumbent rest), electrocardiogram did not present any abnormalities, and laboratory tests (blood tests, urine analysis and toxins research) were within normal range.

Subjects were excluded: if pregnant; having allergy to ultrasound gel or skin lesions (severe eczema, wounds, etc. ...), which prevents the application of the ultrasound probe on the region of interest; subjects not affiliated with French social security health benefits; refusal, lack of language skills or mental inability to sign consent; acute or chronic systemic disease; alcohol abuse; medication; current smoking; ingestion of excessive amounts of common tea, licorice, coffee, chocolate and/or beverages containing caffeine (>5 cups/day, about 500 mg of caffeine/day); and subjects in the exclusion period on the national register of persons undergoing biomedical research.

Protocol procedure

Ultrafast ultrasound imaging (UF) and SphygmoCor were performed successively on the same day and in the same examination room to measure two different types of PWV:

- a local carotid PWV (ufPWV) using the UF device
- a regional carotid to femoral PWV (cfPWV) using the SphygmoCor device.

Ultrafast ultrasound imaging of local carotid PWV (ufPWV)

Ultrasound data recording

The ultrafast ultrasound imaging system Aixplorer used in this study is developed by the SuperSonic Imagine company (Aix-en-Provence, France). It is equipped with a linear array probe (128 elements, 8

MHz central frequency, pitch 0.2 mm, 28 mm elevation focus). It is well-known that frame rate limitation of conventional ultrasound imaging scanner is due to the trade-off between frame rate and the number of scan-lines (focused beams). In order to obtain both a very high frame rate and a large field of view, the Aixplorer prototype used the concept of ultrafast plane wave imaging (Figure S1) (Montaldo et al. 2009; Tanter and Fink 2014). In its original form, it added coherently sub-images obtained by beam forming of the backscattered echo from plane waves transmitted with different inclinations. This system is programmable per channel both to receive (128 channels) and to transmit (256 channels). It allows switching between the following sequences: conventional B-mode imaging and Ultrafast imaging sequence. Plane wave transmit enables the reconstruction of a complete frame from a single transmit/receive event. Beam forming is performed in our study using receive-only dynamic focusing. It enables an imaging frame rate equal to the pulse repetition frequency (transmit rate). This concept has been used to reach frame rates of up to 20 kHz in order to enable the imaging of shear wave propagation in the body. The precision of the PWV measurement is determined by the frame rate of the system (Hermeling et al. 2007). In this study, this sequence was used to image the arterial pulse wave in arteries with a frame rate of 1,000 images/s (Figure S2). The acquisition of 2D ultrasound images was triggered on the R wave through the ECG-coupled imaging system, and the total acquisition duration was one second and half. Acquisitions required no apnea from the patient. Quality acquisitions were validated with instant viewing of the movie of the pulse wave propagation on the computer connected to the ultrasonic device (Movie S3). For each site (right and left CCA), measurements were repeated three times. The median value of the three measurements was used for ufPWV calculation of one subject, whereas the three measurements for each subject were taken into account for repeatability evaluation.

Calculation of carotid PWV

Tissue particle velocities are typically on the order of few mm/s (Figure S2 B), whereas the propagation speed of the arterial pulse wave is typically m/s. For all plane transmit insonifications, radiofrequency

(RF) ultrasonic backscattered echoes are beam formed to obtain a stack of two-dimensional images in the IQ space, with a demodulation frequency equal to the transmit frequency (8 MHz). A frame-to-frame conventional axial velocity estimation is performed using an IQ cross-correlation algorithm (Pernot et al. 2007). Finally, a movie of the axial velocity is obtained with a frame rate of 1,000 Hz (Movie S3). Automatic segmentations of the anterior and posterior arterial walls were performed for each frame (Figure S2 A). Anterior and posterior wall velocities were subtracted in order to remove the global motion of the artery. A space-time representation of the arterial wall velocity is presented in Figure S2 B. In a single cardiac cycle, it was found that estimation of radial velocity exhibits two acceleration peaks (Figure S2 B lower frame) corresponding to two propagating waves: the first wave corresponds to the beginning of the systole (after aortic valve opening), the second wave corresponds to the end of the systole (after aortic valve closure). These two waves propagate in the same direction (from the aortic arch toward the brain). Between these two incident waves, early reflection waves can also be detected propagating backward (Figure S2 D). Khir et al. reported the same three characteristics using the wave intensity waveform (Khir et al. 2001): 'the first positive peak occurring at the start of systole represents the initial, forward compression ($dP > 0$) wave generated by the contraction of the ventricle. The second positive peak occurring at the end of systole indicates a forward expansion ($dP < 0$) wave dominating the flow at this time of the cardiac cycle. This indicates that it is a forward wave generated by the inability of the ventricle to contract quickly enough to keep up with the momentum of the blood in the arteries generated by the earlier part of systole, which is the predominant cause of the halt of blood flow at the end of systole (Parker et al. 1988). In mid-systole there is a period when the wave intensity is negative, indicating that backward, reflected waves are dominating the forward waves.' Conventionally (Hermeling et al. 2008) a linear regression of the first and the second acceleration peaks was performed successively to compute the wave velocities based on the space-time representation (Figure S2 C). Therefore two PWV were provided: one in early-systole and one in end-systole.

Measurement of aortic PWV (cfPWV) by SphygmoCor

Device

cfPWV was measured by a conventional method using SphygmoCor and more particularly its application pulse wave velocity SphygmoCorVx system dedicated to the calculation of aortic PWV.

Measurement protocol

Pressure sensors (high fidelity applanation tonometers) were placed successively on two arterial sites distant (carotid and ipsilateral femoral sites) and recorded the passage of the pulse wave on each site. Measurements were performed according to the recent guidelines (Boutouyrie et al. 2009; Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration 2010; Wilkinson et al. 2010). For the purpose of the study, three measurements of cfPWV for each subject were performed. Each measurement was displayed by the device as a mean \pm standard deviation of 10 PWV recordings after obtaining a well-shaped arterial pulse wave. One of three measurements with the lowest coefficient of variation was allocated as the subject's cfPWV, whereas the three measurements for each subject were taken into account for repeatability evaluation.

Calculation of aortic PWV (cfPWV)

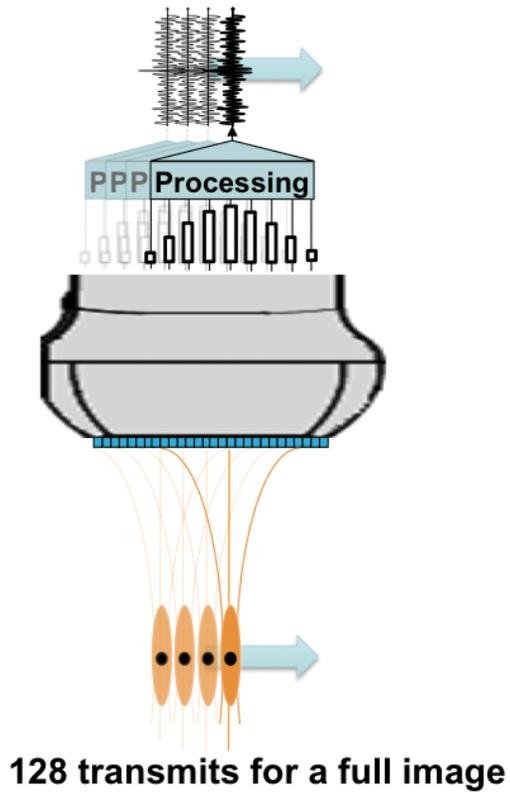
cfPWV calculation was derived from the ratio of the transit time over the distance between the two sites (carotid and femoral, relative to ECG R wave). The transit time was assessed as the time difference between two characteristic points on carotid and femoral waveforms detected by the "intersecting tangent algorithm". This type of algorithm presents the advantage of not underestimating PWV in case of low-rise time of the waveform, as does the Complior system by using the point of maximal upstroke during systole in its algorithm (Millasseau et al. 2005). The carotid to femoral (cf) distance calculation was the direct distance measurement between the carotid and femoral sites corrected by a scaling factor of 0.8 (Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration 2010).

Figure S1. Ultrafast Ultrasound Imaging Principle

(Left panel) Conventional imaging with 128 focusing lines in emission and reception

(Right panel) Ultrafast ultrasound imaging acquisition with one plane wave emission and focusing only on reception

Conventional ultrasound imaging



UltraFast ultrasound imaging

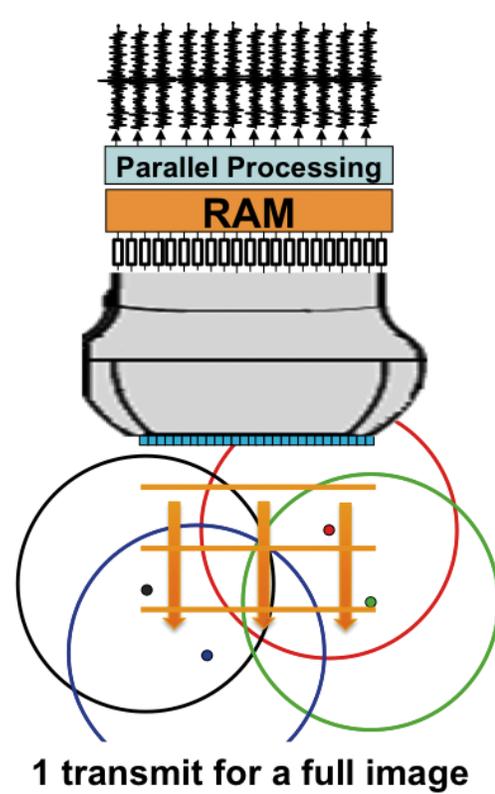
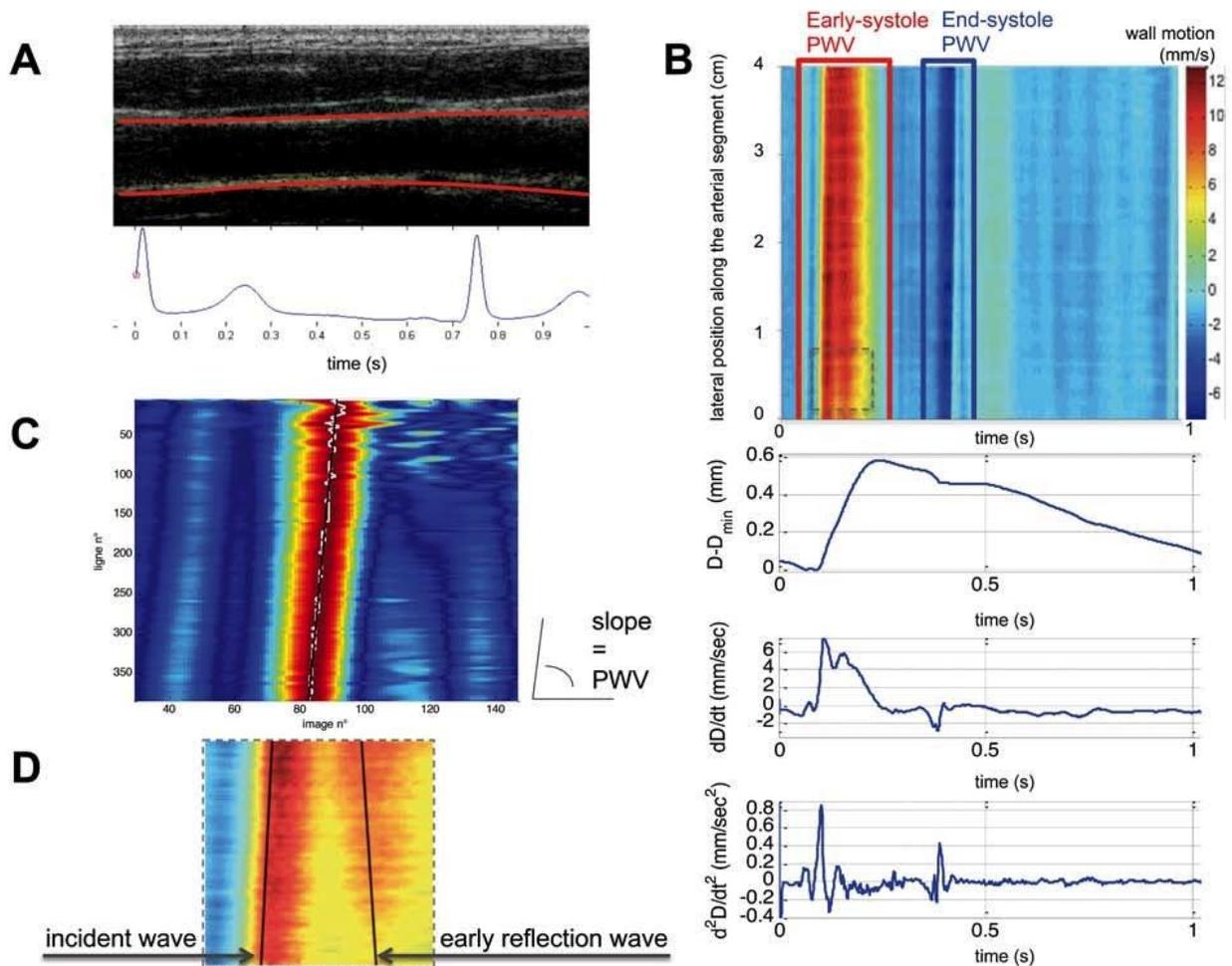


Figure S2. Carotid Arterial Pulse Wave Velocity Computing Using Ultrafast Ultrasound Imaging

(A) Automatic segmentations of the anterior and posterior arterial walls were performed for each frame. (B) Tissue velocity along the arterial wall as a function of time. The three plots show at one location of the wall (from top to bottom): displacement, velocity and acceleration of the arterial wall. The latter displays the two acceleration peaks corresponding to the two propagating waves. (C) Calculation of the PWV derived from the slope of the acceleration peak. (D) Magnification of the dotted outline square in B showing the visualization of the early reflection waves, propagating backward between the 2 incident waves.



6.3 Discussion

Cette étude est la première à apporter des valeurs de VOP carotidienne mesurée par ultrafastécho dans une population de sujets sains, répartis sur 5 classes d'âge entre 18 et 70 ans. L'ultrafastécho est capable de visualiser et mesurer localement la VOP non seulement au début de la systole myocardique, lors de l'ouverture de la valve aortique mais également lors de la fermeture de la valve aortique, en fin de systole cardiaque. La première onde de pouls est celle classiquement mesurée par le Sphygmocor® entre la carotide et la fémorale. L'augmentation de la VOP avec l'âge est un phénomène bien connu (Asmar et al. 1995; Laurent 2012; Najjar et al. 2008; Paini et al. 2006; Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration 2010) et retrouvé ici avec l'ultrafastécho et le Sphygmocor® entre 0,04 et 0,07m/s/an. Par ailleurs, l'augmentation de la VOP persiste même après ajustement sur les valeurs de pression artérielle confirmant la nature intrinsèque des modifications biomécaniques de la paroi artérielle avec l'âge et non simplement un effet de l'augmentation des chiffres tensionnels (Laurent 2012; Sutton-Tyrrell et al. 2005). En effet avec le vieillissement, une faiblesse, des fractures des fibres d'élastine et des dépôts de collagène augmentent dans la média des vaisseaux, responsable d'un transfert de la contrainte pariétale imposée par la pression artérielle des fibres d'élastine davantage extensibles aux fibres de collagène plus rigides (Armentano et al. 1991; Zieman et al. 2005).

L'ultrafastécho permet de mesurer une seconde VOP en fin de systole alors que la pression artérielle est proche de la pression systolique. Cette seconde VOP est plus rapide, témoignant d'une rigidification de la paroi artérielle face à la contrainte qu'est la pression artérielle. Ainsi, nous avons pu mesurer l'augmentation plus importante avec l'âge de la seconde VOP même après ajustement sur la variation de pression au cours du cycle cardiaque. Ceci renforce l'idée de l'apparition de modifications structurelles de la paroi artérielle avec l'âge altérant ses propriétés biomécaniques et son élasticité. Cette variation de la rigidité artérielle au cours du cycle cardiaque en raison du comportement non-

linéaire (ou hyperélastique) de la paroi artérielle est d'un intérêt majeur pour caractériser plus précisément les propriétés biomécaniques de la paroi artérielle.

Dans cette étude, les patients SEDv présentaient clairement une augmentation plus faible de la VOP pendant le cycle cardiaque, à savoir entre le début et la fin de la systole. Ce résultat est le témoin d'un manque de rigidification artérielle tandis que la pression artérielle augmente chez les patients vEDS. Il est compatible avec le rôle clé des collagènes de type I et III dans les propriétés biomécaniques artérielles et leur relation avec les fibres élastiques fibres (Wagenseil and Mecham 2009).

Des études antérieures ont montré que la paroi artérielle des artères élastiques se comporte comme "deux phases" matériaux constitués de deux éléments étroitement associés différent de résistance à la traction et module d'élasticité. Le module d'élasticité de l'aorte à des pressions physiologiques est inférieure à celle du collagène seul, mais supérieure à celle de l'élastine seule (Bergel 1961; Roach and Burton 1957). Le collagène a une résistance à la traction relativement élevée et un module d'élasticité d'environ 1×10^9 dynes / cm^2 , tandis que l'élastine a une résistance à la traction relativement faible et un module d'élasticité d'environ 3×10^8 dynes / cm^2 (Burton 1954).

Au cours du cycle cardiaque, les artères deviennent progressivement moins extensibles car de plus en plus de fibres de collagène sont recrutées. A ce stade toute augmentation supplémentaire de la contrainte envers la paroi s'accompagne d'une augmentation très faible de son rayon, ce qui représente la relation contrainte-déformation non linéaire de la paroi artérielle (Berry and Greenwald 1976; Roach and Burton 1957; Wolinsky and Glagov 1964). En raison de cette nature non linéaire, une seule constante, comme le module d'élasticité de Young pour les matériaux linéaires, n'est pas suffisant pour décrire les propriétés biomécaniques de la paroi artérielle. En revanche en mesurant des VOP à des niveaux de pression différents par ultrafastécho, on peut calculer des modules élastiques supplémentaires. Ainsi, le comportement de la paroi artérielle lorsque les fibres de collagène sont plus ou moins recrutées peut être évaluée.

Dans le SEDv, nous avons mis en évidence un schéma différentiel par rapport aux témoins avec aucune différence à faible contrainte pariétale (pression diastolique en début de systole), mais une rigidification moindre lors de l'augmentation de la pression artérielle. Ceci suggère que la résistance à la traction des fibres de collagène serait compromise dans le SEDv résultant en un manque de rigidité de la paroi artérielle au fur et à mesure du recrutement des fibres de collagène. Cela explique l'excès de contrainte mécanique des parois vasculaires dans le SEDv, une distension artérielle plus importante à chaque systole qui peut aboutir à une rupture artérielle une fois le point de rupture atteint.

Enfin, il est intéressant de mentionner que 32 des 37 patients SEDv recevaient un traitement par céliprolol. Le défaut de rigidification était toujours observable malgré une rigidité artérielle accrue et une distensibilité réduite sous céliprolol dans l'étude BBEST (Ong et al. 2010).

Basée sur les résultats présentés dans cette étude, une approche thérapeutique pourrait consister à trouver un moyen de renforcer les fibres de collagène. La réticulation du collagène se réfère à la capacité des fibrilles de collagène de former des liaisons covalentes avec les fibrilles adjacentes. Plusieurs voies peuvent conduire à la réticulation. Par exemple, la glycosylation observée au cours du diabète peut conduire à la formation de liaisons supplémentaires entre les fibrilles de collagène engendrant un vieillissement vasculaire accéléré.

La plupart des efforts scientifiques visent à réduire la réticulation du collagène dans les vaisseaux, (Brodeur et al. 2014; Steppan et al. 2012) tandis que chez les patients SEDv nous nous attendrions à effet bénéfique d'une réticulation accrue. En ophtalmologie, la réticulation du collagène a été délibérément augmentée dans les affections de la cornée à l'aide de la riboflavine et une exposition rapide de la cornée aux ultraviolets A, avec de bons résultats (Kymionis et al. 2013; Touboul et al. 2014).

Une autre approche pourrait être de cibler les lysyl-oxydases (LOX), qui catalysent les liaisons covalentes des chaînes latérales entre collagène et élastine. Ces enzymes peuvent stabiliser la matrice extracellulaire. Les développements de thérapies ciblées vers l'augmentation de l'activité des LOX risquent

de se heurter aux risques tumoraux. En effet, les LOX sont également impliqués dans la prolifération cellulaire, l'invasion tumorale et les métastases cellulaires (Nishioka et al. 2012).

7 Article 3 soumis : Ultrafastécho offre un nouvel aperçu du phénotype vasculaire des souris haploinsuffisantes pour le collagène de type III.

Cet article a été soumis pour publication:

Mirault T, Papadacci C, Dizier B, Goudot G, Tanter M, Jeunemaitre X, Boisson-Vidal C, Emmerich J, Pernot M, Messas E. Ultrafast ultrasound imaging gives new insight into vascular phenotype of collagen type III haploinsufficient mice. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 2015.

7.1 Objectifs de travail

L'analyse de la moindre rigidification au cours du cycle cardiaque observée dans l'étude précédente, chez les patients atteints de SEDv nous a amené à rechercher un modèle expérimental afin d'analyser ces nouvelles données. Un modèle préclinique a l'avantage de pouvoir mieux contrôler les biais et d'étudier les propriétés biomécaniques de la paroi artérielle. Il a également l'avantage de permettre l'analyse de différentes approches thérapeutiques selon les hypothèses générées par nos études physiopathologiques.

Le seul modèle pré-clinique à notre disposition était un modèle murin invalidé pour le gène COL3A1 (Liu et al. 1997). Les souris COL3A1 hétérozygotes présentent une diminution du contenu en collagène III de la paroi vasculaire mais pas de phénotype de rupture. Les souris COL3A1 homozygotes $-/-$ ne sont pas viables pour la majorité. L'équipe INSERM du Pr Xavier Jeunemaître a démontré que ce modèle murin d'haploinsuffisance en collagène de type III des dissections et ruptures aortiques plus élevées lorsque que soumis à une perfusion d'angiotensine 2 (Faugeroux et al. 2013). Un autre modèle de souris porteuse d'une mutation du gène Col3a1, responsable d'une substitution glycine dans la triple hélice, par mutagenèse insertionnelle (Knock-In) était toujours en développement lors du début de mes travaux. Ce modèle devrait avoir un phénotype plus proche du phénotype humain et sera certainement un meilleur modèle d'étude de la physiopathologie du SEDv. Néanmoins, nous avons décidé d'appliquer

la technologie ultrafastécho sur ces souris Col3a1 hétérozygotes afin de mesurer la VOP aortique, comparativement à des souris sauvages. L'intérêt du plan expérimental choisi, était d'avoir une mesure sanglante par cathéter artériel de la pression artérielle tout le long du cycle cardiaque simultanément à l'enregistrement par ultrafastécho. L'électrocardiogramme a permis de synchroniser la captation échographique sur chaque QRS. La fréquence d'images d'ultrafastécho est tellement élevée qu'elle a permis un échantillonnage suffisant durant les 150 millisecondes du cycle cardiaque chez la souris pour une mesure fiable de la VOP au niveau de l'aorte abdominale. Enfin, nous avons pu établir une relation entre la rigidité de la paroi artérielle et la pression artérielle qui est la contrainte à laquelle la paroi est soumise, en injectant en intraveineux de la phényléphrine, un vasoconstricteur périphérique artériel sans effet sur l'aorte, afin d'augmenter graduellement la pression artérielle. Ce protocole a déjà été validé antérieurement dans un modèle murin d'haploinsuffisance en L-WNK1 (Bergaya et al. 2011). Ainsi à partir des équations de biomécaniques on comprend que la contrainte circonférentielle de la paroi artérielle est proportionnelle à la pression qui s'exerce dessus (Figure 5-1).

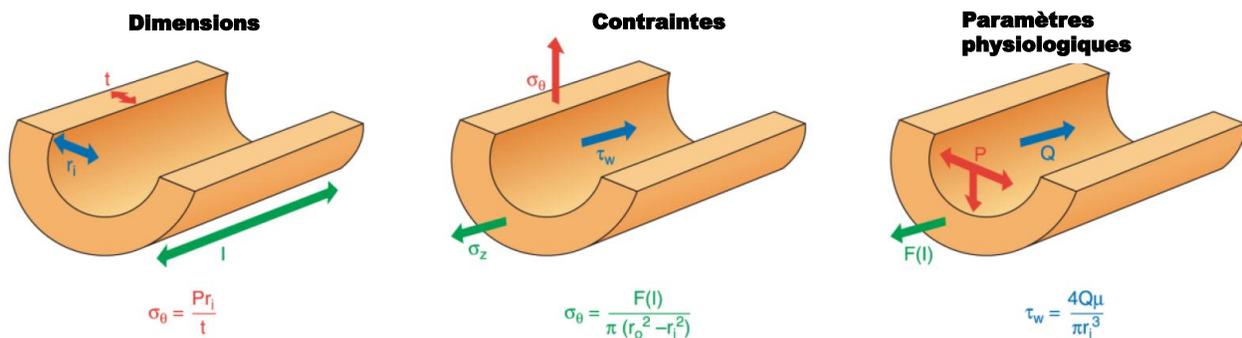


Figure 7-1 Relations entre les dimensions de l'artère, les contraintes et les paramètres physiologiques.

Les dimensions sont le rayon interne (r_i) la longueur (l), l'épaisseur (t). Les contraintes sont la contrainte de cisaillement pariétal, (τ_w), la contrainte longitudinale (σ_z), et la contrainte circonférentielle (σ_θ). Les paramètres physiologiques sont le débit sanguin (Q), les forces d'étirement longitudinal [$F(l)$], et la pression artérielle (P). La viscosité du sang (μ) intervient dans l'équation de la contrainte de cisaillement pariétal. D'après (Wagenseil and Mecham 2009)

7.2 Article

Elsevier Editorial System(tm) for Ultrasound in Medicine and Biology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Ultrafast ultrasound imaging gives new insight into vascular phenotype of collagen type III haploinsufficient mice

Article Type: Original Contribution

Keywords: Pulse wave velocity; Stiffness; Arteries; Collagen type III; Ehlers-Danlos syndrome vascular type; Genetics; Mice.

Corresponding Author: Dr. Tristan Mirault, M.D..

Corresponding Author's Institution:

First Author: Tristan Mirault, M.D..

Order of Authors: Tristan Mirault, M.D.; Clement Papadacci, Ph.D.; Blandine Dizier, DI; Guillaume Goudot, MSci; Mickael Tanter, Ph.D.; Xavier Jeunemaitre, MD, PhD; Catherine Boisson-Vidal, PhD; Joseph Emmerich, MD, PhD; Mathieu Pernot, PhD; Emmanuel Messas, MD, PhD

Abstract: Determining non-invasively and in real-time, the arterial pulse wave velocity (PWV), Ultrafast ultrasound imaging (UF) offers to study the arterial wall biomechanical response to blood pressure change in collagen type III-haploinsufficient (Col3a1+/-) mice vs. wild type (WT). Acute arterial pressor responses to increasing dose of intravenous phenylephrine in anesthetized mice were recorded. Tissue velocities of the abdominal aorta arterial walls were imaged at 5400 frames/s using UF and computed to provide PWV. Fifteen-month-old mice presented a higher PWV than 10-month-old mice and a steeper increase of PWV with BP increment. Compared to their WT littermates, Col3a1+/- mice presented a weaker increase of PWV with BP, an effect which was more pronounced in older mice, and for BP over 110 mm Hg. This emphasizes the key role of collagen fibers, which are recruited at high pressure to support passive wall tension, restricting aortic distension by leading the vessel progressively less distensible.

Suggested Reviewers: Alban Redheuil
alban.redheuil@imed.jussieu.fr
involved in pulse wave velocity imaging field.

Alban Redheuil
Alban.Redheuil@imed.jussieu.fr
involved in pulse wave velocity imaging

EE Konofagou
ek2191@columbia.edu
involved in ultrafast ultrasound imaging

Opposed Reviewers: Evelien Hermeling
e.hermeling@maastrichtuniversity.nl
uses a competitive technology: echo tracking

1 **Ultrafast ultrasound imaging gives new insight into**
2 **vascular phenotype of collagen type III haploinsufficient mice.**

3 Tristan Mirault^{1,3*}, Clément Papadacci², Blandine Dizier¹, Guillaume Goudot²,
4 Mickaël Tanter², Xavier Jeunemaitre^{3,4,5}, Catherine Boisson-Vidal¹, Joseph
5 Emmerich^{1,3,5}, Mathieu Pernot², Emmanuel Messas^{1,3,5}

6 ¹INSERM UMRS-1140, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité

7 ²Institut Langevin Ondes et Images, ESPCI ParisTech, CNRS UMRS-7587,
8 INSERM U979, Paris, France

9 ³AP-HP, Centre National de Référence Maladies Vasculaires Rares, Hôpital
10 européen Georges-Pompidou, 75015 Paris, France

11 ⁴INSERM UMRS-970, Paris Cardiovascular Research Centre, 75015 Paris,
12 France

13 ⁵Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, PRES Sorbonne Paris Cité,
14 Paris France

15 * Corresponding author. Tristan Mirault M.D., MSc.

16 Centre National de Référence Maladies Vasculaires Rares, Hôpital européen
17 Georges-Pompidou, Hôpitaux Universitaires Paris Ouest, 20 rue Leblanc, 75015 Paris ;
18 Tel: +33 1.56.09.30.51 ; Fax: +33 1.56.09.30.65 ; Email: tristan.mirault@aphp.fr

19 **Word count : manuscript 3,525 (<4,000) abstract 150 (<150)**

20

1 **Abstract**

2 Determining non-invasively and in real-time, the arterial pulse wave velocity
3 (PWV), Ultrafast ultrasound imaging (UF) offers to study the arterial wall biomechanical
4 response to blood pressure change in collagen type III-haploinsufficient (Col3a1+/-)
5 mice vs. wild type (WT). Acute arterial pressor responses to increasing dose of
6 intravenous phenylephrine in anesthetized mice were recorded. Tissue velocities of the
7 abdominal aorta arterial walls were imaged at 5400 frames/s using UF and computed to
8 provide PWV. Fifteen-month-old mice presented a higher PWV than 10-month-old mice
9 and a steeper increase of PWV with BP increment. Compared to their WT littermates,
10 Col3a1+/- mice presented a weaker increase of PWV with BP, an effect which was more
11 pronounced in older mice, and for BP over 110 mm Hg. This emphasizes the key role of
12 collagen fibers, which are recruited at high pressure to support passive wall tension,
13 restricting aortic distension by leading the vessel progressively less distensible.

14 **Key words.** Pulse wave velocity; Stiffness; Arteries; Collagen type III; Ehlers-
15 Danlos syndrome vascular type; Genetics; Mice.

16

1 **Introduction**

2 Genetically modified mice provide a tremendous resource for delineating contributions to
3 overall arterial stiffness or structural integrity by the different extracellular matrix proteins.
4 Seventeen different collagen types have been identified in the mouse aorta, with
5 collagens types I and III being mainly responsible for imparting strength to the vessel
6 wall (Kelleher et al. 2004; McLean et al. 2005). Thus in mice, the complete and
7 ubiquitous inactivation of the Col3a1 gene (Col3a1 $-/-$), coding for collagen type III, leads
8 to over 90 % perinatal mortality, with survivors dying rapidly from vascular rupture. The
9 haploinsufficient mice (Col3a1 $+/-$) are viable without reduced life span (Liu et al. 1997).
10 However, their aortic collagen content is reduced, and increase of blood pressure
11 mediated by angiotensin II infusion triggers aortic dissection and rupture (Faugeroux et
12 al. 2013). In humans, mutations in the collagen type III gene (COL3A1) result in vascular
13 Ehlers-Danlos syndrome (vEDS) (OMIM #130050), whose patients present a propensity
14 towards spontaneous rupture of their large vessels. Collagen and elastin deposited by
15 smooth muscle cells in the medial layer are the components of the arterial wall that
16 account for the majority of the arterial stiffness. The pulse wave velocity (PWV), speed
17 measurement of a pressure wave generated at the aortic root and propagating along the
18 arterial wall, is correlated with the arterial stiffness (Callaghan et al. 1986). In a clinical
19 study on vEDS patients, aortic PWV was found similar to controls (Boutouyrie et al.
20 2004). In an ex vivo study, the distensibility of the aorta of Col3a1 $+/-$ mice and wild-type
21 did not differ at physiological pressures, but the rupture pressure of the abdominal aorta
22 was lower in old Col3a1 $+/-$ mice (21 months) compared to wild-type (Cooper et al. 2010).
23 This is consistent with other studies showing that, at high pressure, vessels become

1 progressively less distensible as collagen fibers are recruited and become
2 circumferentially aligned, to support passive wall tension and restrict aortic distension
3 (Greenwald et al. 1997; Roach and Burton 1957; Wolinsky and Glagov 1964). As we
4 aimed to evaluate in vivo, the arterial stiffness of Col3a1^{+/-} mice compared to control we
5 were looking for a technique that could assess PWV at high pressure. In vivo aortic
6 PWV assessment in mice is available either with invasive technique like intravascular
7 tonometry (Wang et al. 2000) or noninvasive methods by magnetic resonance imaging,
8 (Gotschy et al. 2013) ultrasonic echo Doppler velocimetry (Humphrey et al. 2009) or
9 applanation tonometry (Leloup et al. 2014). However, all these techniques measure
10 PWV at diastolic blood pressure, which might not be high enough to figure out a
11 discrepancy between Col3a1^{+/-} and wild-type mice biomechanical arterial properties.
12 New technology ultrafast ultrasound imaging (UF) offers the opportunity to test our
13 hypothesis. UF allows to track the pulse wave in real-time and thereby to measure the
14 PWV non-invasively, using plane wave transmits at multiple inclinations and an over
15 1,000 frames/s sampling rate (Tanter and Fink 2014). Moreover UF allows to measure
16 the velocity of the pulse wave generated not only at the aortic valve opening but also at
17 the aortic valve closure (Couade et al. 2011). These two waves have been well
18 described as a forward compression wave (ventricular early-systole) for the first one,
19 and a forward expansion wave (ventricular end-systole) for the second one, wich
20 propagates at a high blood pressure level (Giannattasio et al. 2008; Hermeling et al.
21 2010; Khir et al. 2001). In this paper we compare the stiffness of the abdominal aorta in
22 Col3a1^{+/-} versus wild-type mice at different blood pressure levels. Furthermore, age is
23 an important factor impairing arterial stiffness. PWV increase with aging have been
24 reported in humans (Laurent 2012; Painsi et al. 2006; Verwoert et al. 2014) but also in

1 mice (Fleenor et al. 2013; Soucy et al. 2006; Wang et al. 2000). We therefore decided to
2 study mice of two groups of age.

3 **Methods**

4 **Mice**

5 This animal study has been approved by our local Institutional Care and Animal
6 Use Committee (IACUC) (Authorization Executive Order No. 01282.02) and conducted
7 in accordance with the relevant guidelines of the French Ministry of Research for
8 scientific experimentation on animals, European Communities Council Directives and
9 international ethical standards. Col3A1 deficient mice (strain C.129S4(B6)-
10 Col3a1^{tm1Jae}/J) (Liu et al. 1997) were re-derived (Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME,
11 USA) and bred in our laboratory. We used adult female wild type (Col3a1^{+/+}) (WT) and
12 collagen type III-haploinsufficient (Col3a1^{+/-}) littermates. We verified that they were age-
13 and weight-matched between groups for series of experiments. Mice of two classes of
14 age were used : 15 months (452 ± 30 days) and 10 months (289 ± 54 days).

15 **In vivo pressure response study**

16 Mice were anesthetized with pentobarbital sodique (60mg/kg i.p.) (CEVA Santé
17 animale, Libourne, France). The neck and the abdomen areas were shaved, and the
18 anesthetized mouse was placed in a supine position with its paws taped to electrodes
19 on a temperature-controlled with feedback control ECG board (Mouse Monitor S, Indus
20 instrument, Webster, TX, USA). A polyethylene catheter (intravascular portion PE-10:
21 0.61 mm/0.28 mm — outer diameter/inner diameter—; extravascular portion PE-50 :
22 0.97 mm/ 0.58 mm, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) was inserted into the left

1 common carotid artery and tightened. The catheter was connected to a pressure
2 transducer (RX104A Biopac Systems, Inc. Goleta, CA, USA) and a MP35 data
3 acquisition system and acknowledge software BioPack Student Lab Pro v3.7.2 (Biopac
4 Systems, Inc. Goleta, CA, USA). A venous catheter (PE-50, Harvard Apparatus,
5 Holliston, MA, USA) was inserted into the right jugular vein and connected to a syringe
6 pump (Pump 11 Elite Programmable, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) for
7 phenylephrine injection (AP-HP, Paris, France). Arterial blood pressure was gradually
8 raised with increasing dose of phenylephrine (0.01–700 $\mu\text{g}/\text{kg}$). For each dose, UF
9 imaging was acquired when the effect of phenylephrine begun to level off. We stopped
10 the infusion when systolic blood pressure reached 250 mmHg.

11 **Protocol procedure for PWV measurements**

12 **Measurement Protocol:** the vascular ultrasound probe was applied parallel to
13 the long axis of the abdominal aorta with imaging of the arterial wall along 4 cm length
14 (width of the probe). After switching the system to ultrafast ultrasound imaging mode,
15 the set of 2D ultrasound images was acquired during 200 milliseconds to measure the
16 local PWV. The acquisition was triggered on the R wave through the ECG coupled
17 imaging system. Quality acquisitions were validated with instant viewing of the movie of
18 the pulse wave propagation on the computer connected to the ultrasound device.

19 **Ultrasound data recording:** the UF system Aixplorer used in this study has been
20 developed by the SuperSonic Imagine company (Aix-en-Provence, France). It was
21 equipped with a linear array probe (128 elements, 15 MHz central frequency, pitch 0.125
22 mm). UF uses plane wave transmit, which enables the reconstruction of a complete
23 frame from a single transmit/receive event. Coherent plane compounding (Montaldo et

1 al. 2009) with three emissions tilted at $(-3^{\circ};0^{\circ};3^{\circ})$ were used to increase the imaging
2 quality. Beamforming has been performed using receive-only dynamic focusing with a
3 frame rate of 5,400 images/s.

4 **Calculation of aortic PWV:** for all plane transmit insonifications, radiofrequency
5 ultrasonic backscattered echoes were beamformed to obtain a stack of two-dimensional
6 images in the IQ space, with a demodulation frequency equal to the transmit frequency
7 (15 MHz). A frame-to-frame conventional axial velocity estimation was performed using
8 IQ cross-correlation algorithm. Finally, a “movie” of the axial velocity was obtained with a
9 frame rate of 5,400 Hz. After automatic segmentations of the anterior and posterior
10 arterial walls for each frame, anterior and posterior wall velocities were subtracted in
11 order to remove the global motion of the artery. In a single cardiac cycle, estimation of
12 radial velocity exhibited two acceleration peaks corresponding to two propagating
13 waves: the first wave corresponding to the beginning of the systole (after aortic valve
14 opening), the second wave corresponding to the end of the systole (after aortic valve
15 closing). These two waves propagated in the same direction. A linear regression of the
16 acceleration peak was performed to compute the wave speed based on the space-time
17 representation. Therefore two PWVs were provided: one in early-systole and one in end-
18 systole.

19 **Statistics**

20 The results are presented as mean \pm standard deviation. We used the Student *t*-
21 test to compare continuous variables. Linear regression analysis was used with the
22 Enter method for independent variables. Statistical significance was considered at the

1 0.05 level. All statistical tests were 2 sided. Analyses were carried out using IBM SPSS
2 Statistics for Mac Version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3 **Results**

4 **Two PWV for one arterial biomechanical property: stiffness.**

5 We could visualize the first and second pulse wave along the arterial wall of the
6 aorta (Figure 1). We checked out that for a same level of arterial pressure (arterial
7 pressure $\pm 10\%$), first and second PWV were in good agreement as shown by the
8 Bland—Altman plot (Figure 2). Besides, strong co-linearity was found in a regression
9 analysis between the two PWV and the arterial pressure on this data set with a variance
10 inflation factor of 8.367 for both PWV. Similarly, regression analysis on the whole data
11 set with PWV (first and second PWV pooled together) as the dependent variable, and
12 arterial blood pressure and PWV type as the independent variables, showed that arterial
13 blood pressure was associated with PWV ($p < 10^{-4}$), in that model with a R^2 of 0.485, but
14 not with the type of PWV ($p = 0.09$). Thus, first and second PWV evaluate the stiffness
15 of the arterial wall and differ only because of the level of the stress that applies to the
16 wall, i.e. the arterial blood pressure. We thereby pooled the two PWV for further analysis.

17 **PWV increases with age**

18 The 15-month-old mice presented a significantly higher PWV than the 10-month-
19 old group: respectively 5.8 ± 1.8 m/s vs. 4.8 ± 1.3 m/s ($p < 10^{-4}$) for the WT mice and 5.4
20 ± 1.1 vs. 4.1 ± 0.6 m/s ($p < 10^{-4}$) for the Col3a1+/- mice (Table 1). Moreover, the
21 increase of PWV with arterial blood pressure was steeper in the older WT mice: $0.045 \pm$
22 0.004 vs. 0.029 ± 0.002 m/s/mm Hg ($p = 0.001$) respectively (Table 2, Figure 3).

1 Similarly, 10-month-old Col3a1^{+/-} mice presented PWV that correlated with arterial
2 blood pressure ($R = 0.573$, $p < 10^{-4}$) with a slope of 0.010 ± 0.001 m/s/mm Hg.
3 Interestingly, that trend was not found in the older Col3a1^{+/-} mice where PWV did not
4 correlate with the arterial blood pressure ($p = 0.541$) (Table 2). Figure 3 and Table 3
5 show that in these mice, PWV initially correlated with arterial blood pressure when below
6 110 mm Hg ($R = 0.341$, $p = 0.031$) but not above 110 mm Hg ($R = 0.179$, $p = 0.382$). It
7 is worth to note that in WT mice, arterial stiffening with age is unmasked at a high level
8 of blood pressure: the slope of PWV increase with arterial blood pressure is higher in the
9 older mice when blood pressure is above 110 mmHg ($p = 0.038$) and not significantly
10 different when below 110 mmHg ($p = 0.764$) (Table 3).

11 **Weaker increase of PWV with arterial blood pressure in Col3A1^{+/-} mice**

12 Increase of PWV with arterial blood pressure also differed between genotypes.
13 Figure 3 and Table 2 show clearly that the slope of PWV increase with arterial blood
14 pressure was significantly steeper for wild type mice compared to Col3a1^{+/-} mice ($p <$
15 10^{-4}) either in the 10-month-old mice or the 15-month-old mice. Plot of PWV with arterial
16 blood pressure showed an inflexion of the relationship after 110 mm Hg in the wild-type
17 mice (Figure 3). Interestingly, linear regression analysis of the relationship between
18 PWV and arterial blood pressure showed no linear correlation according to age or
19 genotype for pressures below 110 mmHg, whereas PWV increase with arterial blood
20 pressure is significantly weaker in older Col3a1^{+/-} mice than WT mice for pressures
21 above 110 mmHg ($p < 10^{-4}$) (Table 3, Figure 3).

1 **Discussion**

2 Applying UF, a new technology that can image locally the propagation of the
3 pulse wave, and thereby calculate its velocity, we could measure non-invasively the
4 abdominal aortic PWV on anesthetized mice. We used phenylephrine, a peripheral
5 artery vasopressor agent, and invasive arterial blood pressure monitoring to assess the
6 relationship between PWV and arterial blood pressure. Fifteen-month-old mice
7 presented a higher PWV than 10-month-old mice and a steeper increase of PWV with
8 arterial blood pressure increase. Compared to WT, Col3a1+/- mice had a weaker
9 increase of PWV with arterial blood pressure, this effect being more significant in older
10 mice and for pressure above 110 mm Hg.

11 One of the major interests of UF is to provide two values of PWV over the cardiac
12 cycle, thus at a different level of blood pressure which represents here the stress for the
13 arterial wall. In this study, we could record the propagation of a first wave, propagating
14 at the diastolic blood pressure, and a second wave concomitant to the dicrotic notch on
15 the pressure curve (Figure 1). This is consistent with previous studies describing these
16 two waves as a forward compression wave generated at the aortic valve opening (early-
17 systole) and forward expansion wave at the aortic valve closure (end-systole)
18 (Giannattasio et al. 2008; Hermeling et al. 2010; Khir et al. 2001; Parker et al. 1988).
19 The increase of arterial stiffness over the cardiac cycle reveals the non-linear behavior
20 of the arterial elasticity, as "two-phase" materials consisting of two closely associated
21 components of different tensile strength and elastic modulus. The modulus of elasticity
22 of the aorta at physiological pressures is less than that of collagen alone but greater
23 than that of elastin alone (Bergel 1961; Berry and Greenwald 1976). Collagen has a

1 relatively high tensile strength and a modulus of elasticity of about 1×10^9 dynes/cm²
2 whereas elastin has a relatively low tensile strength and a modulus of elasticity of about
3 3×10^8 dynes/cm² (Burton 1954). During the cardiac cycle arteries become
4 progressively less distensible as collagen fibers are recruited. Additional increase in wall
5 strain is therefore accompanied by little further change in radius, accounting for the
6 nonlinear stress-strain relationship of large arteries like aorta (Berry and Greenwald
7 1976; Roach and Burton 1957; Wolinsky and Glagov 1964). In this study Col3a1^{+/-} mice
8 presented clearly a lower increase of PWV with arterial blood pressure increment than
9 WT. It is consistent with the aforementioned key role of collagen type I and III in arterial
10 biomechanical properties and their relationship with elastic fibers (Wagenseil and
11 Mecham 2009) and the reduction of collagen content of the aortic wall in Col3a1^{+/-} mice
12 (Cooper et al. 2010; Faugeron et al. 2013). The present findings suggest that the high
13 tensile strength of the collagen fibers would be impaired in Col3a1^{+/-} mice resulting in a
14 lack of stiffening of the arterial wall as collagen fibers are recruited. Going beyond, once
15 the fracture point is reached, arterial distension and arterial rupture should occur. This
16 was readily observed in Col3a1^{+/-} mice when challenged by angiotensin II infusion to
17 increase the blood pressure secondary. The aortic diameter and the rate of thoracic
18 aorta rupture increased much higher compared to WT (Faugeron et al. 2013).

19 We observed a PWV increase with age, which is in accordance with numerous
20 studies in humans (Laurent 2012; Paini et al. 2006; Verwoert et al. 2014) and in mice
21 (Fleenor et al. 2013; Soucy et al. 2006; Wang et al. 2000). Age-related artery stiffening
22 is mediated in part by structural changes that include increased collagen type I
23 deposition, reductions in elastin and modifications of these proteins by glycation and
24 proteases (Lakatta and Levy 2003). Interestingly we found that with aging, Col3a1^{+/-}

1 mice presented weaker arterial stiffening to blood pressure increase. This interaction
2 between aging and collagen content corroborates data from Cooper et al., who found a
3 lower aortic rupture pressure in old —and not in young— Col3a1^{+/-} mice vs. WT, and a
4 fragmentation of the internal elastic lamina in the aortic wall of Col3a1^{+/-} mice
5 worsening with age (Cooper et al. 2010). Different mechanisms may elicit this interaction
6 between aging and collagen type III haploinsufficiency. Thus, the increased collagen
7 type I deposition usually observed and increased ECM turnover might do more harm
8 than good in Col3a1^{+/-} mice.

9 **Limitations**

10 We keep in mind that conclusions should stay assumptions in this study, which presents
11 several limitations. We choose not to perform histological study of the tested mice,
12 because several publications have already pointed out the features of the different
13 genotypes we used (Cooper et al. 2010; Faugeroux et al. 2013; Liu et al. 1997), and
14 also to head off making the procedure more cumbersome. Finally, the aim of the study
15 was to check the ability of UF to provide PWV at high blood pressure, a condition
16 necessary for testing our hypothesis.

17 **Conclusion**

18 We showed that Col3a1^{+/-} mice, i.e. collagen type III haploinsufficient, present a weak
19 arterial stiffening while blood pressure increases. This emphasizes the key role of
20 collagen fibers recruited at high pressures to support passive wall tension, leading the
21 vessel progressively less distensible and restricting aortic distension. Further studies are
22 needed to investigate whether therapeutic agents could improve this arterial fragility.

1 **Conflict of interest**

2 Dr. Tanter is co-founder of SuperSonic Imagine. Other authors have no conflict of
3 interest directly relevant to the content of this article.

4 **Funding Sources**

5 This work was partially supported by the 2010 SHIRE Human Genetic Therapies price
6 awarded to Dr Mirault.

7 **References**

- 8 Bergel DH. The static elastic properties of the arterial wall. *J Physiol (Lond)*
9 1961;156:445–457.
- 10 Berry CL, Greenwald SE. Effects of hypertension on the static mechanical properties
11 and chemical composition of the rat aorta. *Cardiovasc Res* 1976;10:437–451.
- 12 Boutouyrie P, Germain DP, Fiessinger J-N, Laloux B, Perdu J, Laurent S. Increased
13 carotid wall stress in vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Circulation* 2004;109:1530–
14 1535.
- 15 Burton AC. Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels.
16 *Physiol Rev* 1954;34:619–642.
- 17 Callaghan FJ, Geddes LA, Babbs CF, Bourland JD. Relationship between pulse-wave
18 velocity and arterial elasticity. *Med Biol Eng Comput* 1986;24:248–254.
- 19 Cooper TK, Zhong Q, Krawczyk M, Tae HJ, Muller GA, Schubert R, Myers LA, Dietz HC,
20 Talan MI, Briest W. The haploinsufficient Col3a1 mouse as a model for vascular
21 Ehlers-Danlos syndrome. *Vet Pathol* 2010;47:1028–1039.
- 22 Couade M, Pernet M, Messas E, Emmerich J, Hagege A, Fink M, Tanter M. Ultrafast
23 imaging of the arterial pulse wave. *Irbm* 2011;32:106–108.
- 24 Faugeroux J, Nematalla H, Li W, Clement M, Robidel E, Frank M, Curis E, Ait-Oufella H,
25 Caligiuri G, Nicoletti A, Hagege A, Messas E, Bruneval P, Jeunemaitre X, Bergaya
26 S. Angiotensin II promotes thoracic aortic dissections and ruptures in Col3a1
27 haploinsufficient mice. *Hypertension* 2013;62:203–208.
- 28 Fleenor BS, Sindler AL, Marvi NK, Howell KL, Zigler ML, Yoshizawa M, Seals DR.
29 Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging. *Exp*
30 *Gerontol* 2013;48:269–276.

- 1 Giannattasio C, Salvi P, Valbusa F, Kearney-Schwartz A, Capra A, Amigoni M, Failla M,
2 Boffi L, Madotto F, Benetos A, Mancia G. Simultaneous Measurement of Beat-to-
3 Beat Carotid Diameter and Pressure Changes to Assess Arterial Mechanical
4 Properties. *Hypertension* 2008;52:896–902.
- 5 Gotschy A, Bauer E, Schrodtt C, Lykowsky G, Ye Y-X, Rommel E, Jakob PM, Bauer WR,
6 Herold V. Local arterial stiffening assessed by MRI precedes atherosclerotic plaque
7 formation. *Circ Cardiovasc Imaging* 2013;6:916–923.
- 8 Greenwald SE, Moore JEJ, Rachev A, Kane TP, Meister JJ. Experimental investigation
9 of the distribution of residual strains in the artery wall. *J Biomech Eng American*
10 *Society of Mechanical Engineers*, 1997;119:438–444.
- 11 Hermeling E, Hoeks APG, Winkens MHM, Waltenberger JL, Reneman RS, Kroon AA,
12 Reesink KD. Noninvasive assessment of arterial stiffness should discriminate
13 between systolic and diastolic pressure ranges. *Hypertension* 2010;55:124–130.
- 14 Humphrey JD, Eberth JF, Dye WW, Gleason RL. Fundamental role of axial stress in
15 compensatory adaptations by arteries. *Journal of Biomechanics* 2009;42:1–8.
- 16 Kelleher CM, McLean SE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and aortic
17 development. *Current topics in developmental ...* 2004.
- 18 Khir AW, O'Brien A, Gibbs JS, Parker KH. Determination of wave speed and wave
19 separation in the arteries. *Journal of Biomechanics* 2001;34:1145–1155.
- 20 Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular
21 disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation*
22 2003;107:139–146.
- 23 Laurent S. Defining vascular aging and cardiovascular risk. *Journal of Hypertension*
24 2012;30 Suppl:S3–8.
- 25 Leloup A, Fransen P, Van Hove CE. Applanation Tonometry is a Novel Technique for
26 the Noninvasive Assessment of Carotid-Femoral Pulse Wave Velocity as a Measure
27 of Arterial Stiffness in Mice. *Hypertension* 2014;64:195–200.
- 28 Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I
29 fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*
30 1997;94:1852–1856.
- 31 McLean SE, Mecham BH, Kelleher CM, Mariani TJ, Mecham RP. Extracellular matrix
32 gene expression in the developing mouse aorta. In: Miner JH, ed. *Advances in*
33 *Developmental Biology Elsevier*, 2005. pp. 81–128.
- 34 Montaldo G, Tanter M, Bercoff J, Benech N, Fink M. Coherent plane-wave compounding
35 for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE Trans*
36 *Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2009;56:489–506.

- 1 Paini A, Boutouyrie P, Calvet D, Tropeano A-I, Laloux B, Laurent S. Carotid and aortic
2 stiffness: determinants of discrepancies. *Hypertension* 2006;47:371–376.
- 3 Parker KH, Jones CJ, Dawson JR, Gibson DG. What stops the flow of blood from the
4 heart? *Heart Vessels* Springer-Verlag, 1988;4:241–245.
- 5 Roach MR, Burton AC. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries.
6 *Can J Biochem Physiol* 1957;35:681–690.
- 7 Soucy KG, Ryoo S, Benjo A, Lim HK, Gupta G, Sohi JS, Elser J, Aon MA, Nyhan D,
8 Shoukas AA, Berkowitz DE. Impaired shear stress-induced nitric oxide production
9 through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular
10 stiffness. *J Appl Physiol* 2006;101:1751–1759.
- 11 Tanter M, Fink M. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE Trans Ultrason*
12 *Ferroelectr Freq Control* 2014;61:102–119.
- 13 Verwoert GC, Franco OH, Hoeks APG, Reneman RS, Hofman A, V Duijn CM, Sijbrands
14 EJG, Witteman JCM, Mattace-Raso FUS. Arterial stiffness and hypertension in a
15 large population of untreated individuals: the Rotterdam Study. *Journal of*
16 *Hypertension* 2014;32:1606–1612.
- 17 Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics.
18 *Physiol Rev* 2009;89:957–989.
- 19 Wang YX, Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Fitch R, Mallari C, Martin-McNulty B,
20 da Cunha V, Freay A, Rubanyi GM, Kauser K. Increased aortic stiffness assessed
21 by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ*
22 *Physiol* 2000;278:H428–H434.
- 23 Wolinsky H, Glagov S. Structural basis for the static mechanical properties of the aortic
24 media. *Circulation Research* 1964;14:400–413.

1 **FIGURES**

2 **Figure 1. First and second PWV with arterial blood pressure recording**

3 (a) Tissue velocity along the arterial wall as a function of time. The blue pulse represent
4 the first pulse wave, the red pulse represents the second pulse wave. The two plots
5 below show at one location of the wall (b) tissue velocity (c) wall displacement.
6 Concomitant (d) invasive arterial blood pressure and (e) electrocardiogram recordings.

7 **Figure 2. First and second PWV show a good agreement**

8 Bland—Altman plot of first and second pulse wave velocities (PWV) for the same value
9 of arterial blood pressure.

10 **Figure 3. Change of PWV with arterial blood pressure differs according to age and** 11 **genotype**

12 Scatter dot of aortic pulse wave velocity (PWV) and arterial pressure according to age
13 and genotype of the mice. Lines represent the linear regression and dotted line the 95%
14 confidence interval margins for PWV values when blood pressure is above 110mmHg.
15 Wild type 10-month-old mice, n = 3; Wild type 15-month-mice, n = 7; Col3a1 +/- 10-
16 month-old mice, n = 4; Col3a1 +/- 15-month-old mice, n = 5.

17

1 **Table 1 PWV according to age and genotype**

Genotype	wild type	wild type		Col3a1 +/-	Col3a1 +/-	
Age	15 months	10 months	<i>p</i>	15 months	10 months	<i>p</i>
Mice, n	7	3		5	4	
PWV, m/s	5.8 ± 1.8	4.8 ± 1.3	< 10 ⁻⁴	5.4 ± 1.1	4.1 ± 0.6	< 10 ⁻⁴
Arterial pressure, mm Hg	117.2 ± 27.2	116.1 ± 32.5	0.769	104.7 ± 47.0	114.8 ± 35.9	0.138

2 Results are mean ± standard deviation. PWV, pulse wave velocity. *p*, Age comparison
 3 among each genotype.

4

1 **Table 2 Linear Regression Analysis of PWV with arterial blood**
 2 **pressure**

	R	<i>p</i>	Slope, m/s/mm Hg	<i>p</i> (Age)	<i>p</i> (Genotype)
wild type 15 months	0.696	< 10 ⁻⁴	0.045 ± 0.004		< 10 ⁻⁴
wild type 10 months	0.709	< 10 ⁻⁴	0.029 ± 0.002	0.001	< 10 ⁻⁴
Col3a1 +/- 15 months	0.077	0.541	-0.002 ± 0.003		—
Col3a1 +/- 10 months	0.573	< 10 ⁻⁴	0.010 ± 0.001	0.0001	—

3 Results are mean ± standard deviation. PWV, pulse wave velocity. *p* (Age), Comparison
 4 between ages among each genotype. *p* (Genotype), comparison between genotypes
 5 among each age.

6

1 **Table 3 Linear Regression Analysis of PWV with arterial blood**
 2 **pressure**

3 **A. Arterial blood pressure below 110 mm Hg**

	R	<i>p</i>	Slope, m/s/mm Hg	<i>p</i> (Age)	<i>p</i> (Genotype)
wild type 15 months	0.377	0.009	0.018 ± 0.007		0.831
wild type 10 months	0.296	0.016	0.022 ± 0.009	0.764	0.181
Col3A1 +/- 15 months	0.341	0.031	0.021 ± 0.009		—
Col3A1 +/- 10 months	0.140	0.396	0.006 ± 0.008	0.335	—

4 **B. Arterial blood pressure above 110 mm Hg**

	R	<i>p</i>	Slope, m/s/mm Hg	<i>p</i> (Age)	<i>p</i> (Genotype)
wild type 15 months	0.514	< 10 ⁻⁴	0.050 ± 0.009		< 10 ⁻⁴
wild type 10 months	0.650	< 10 ⁻⁴	0.030 ± 0.004	0.038	0.093
Col3A1 +/- 15 months	0.179	0.382	-0.004 ± 0.005		—
Col3A1 +/- 10 months	0.788	< 10 ⁻⁴	0.021 ± 0.002	< 10 ⁻⁴	—

5 Results are mean ± standard deviation. PWV, pulse wave velocity. *p* (Age), Comparison
 6 between ages among each genotype. *p* (Genotype), comparison between genotypes
 7 among each age.

Figure1
[Click here to download Figure: Figure1mice.pdf](#)

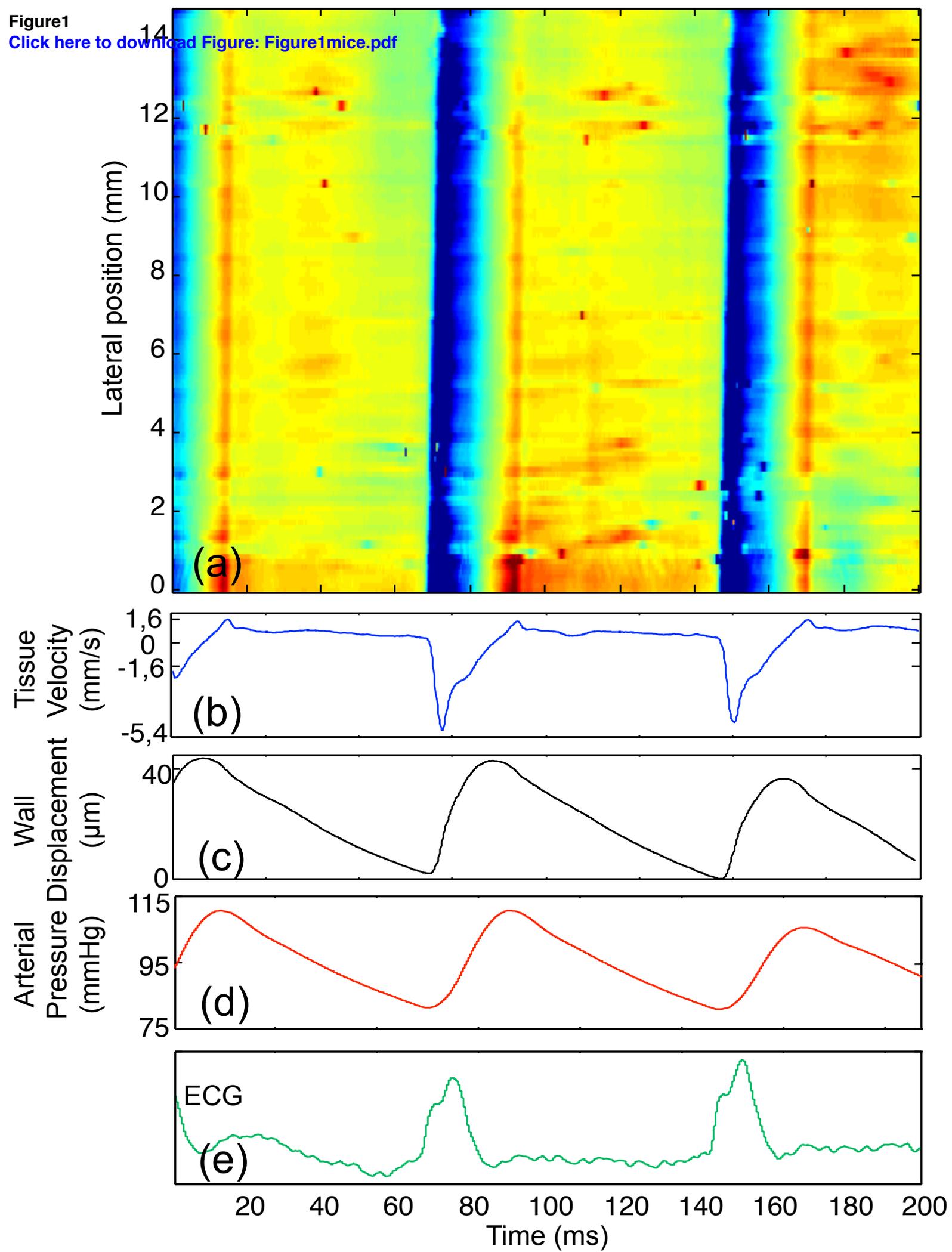


Figure2

[Click here to download Figure: Figure2mice.pdf](#)

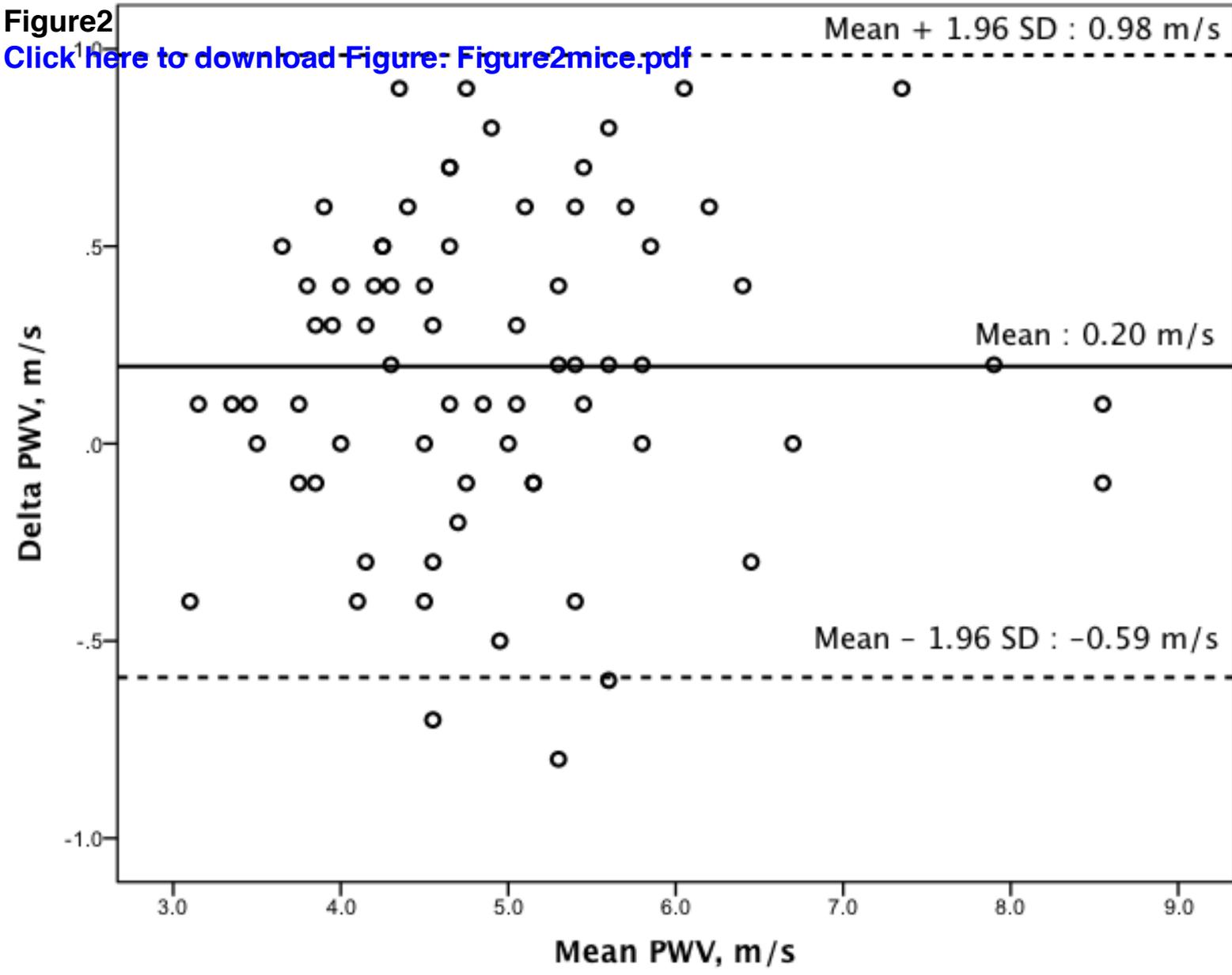
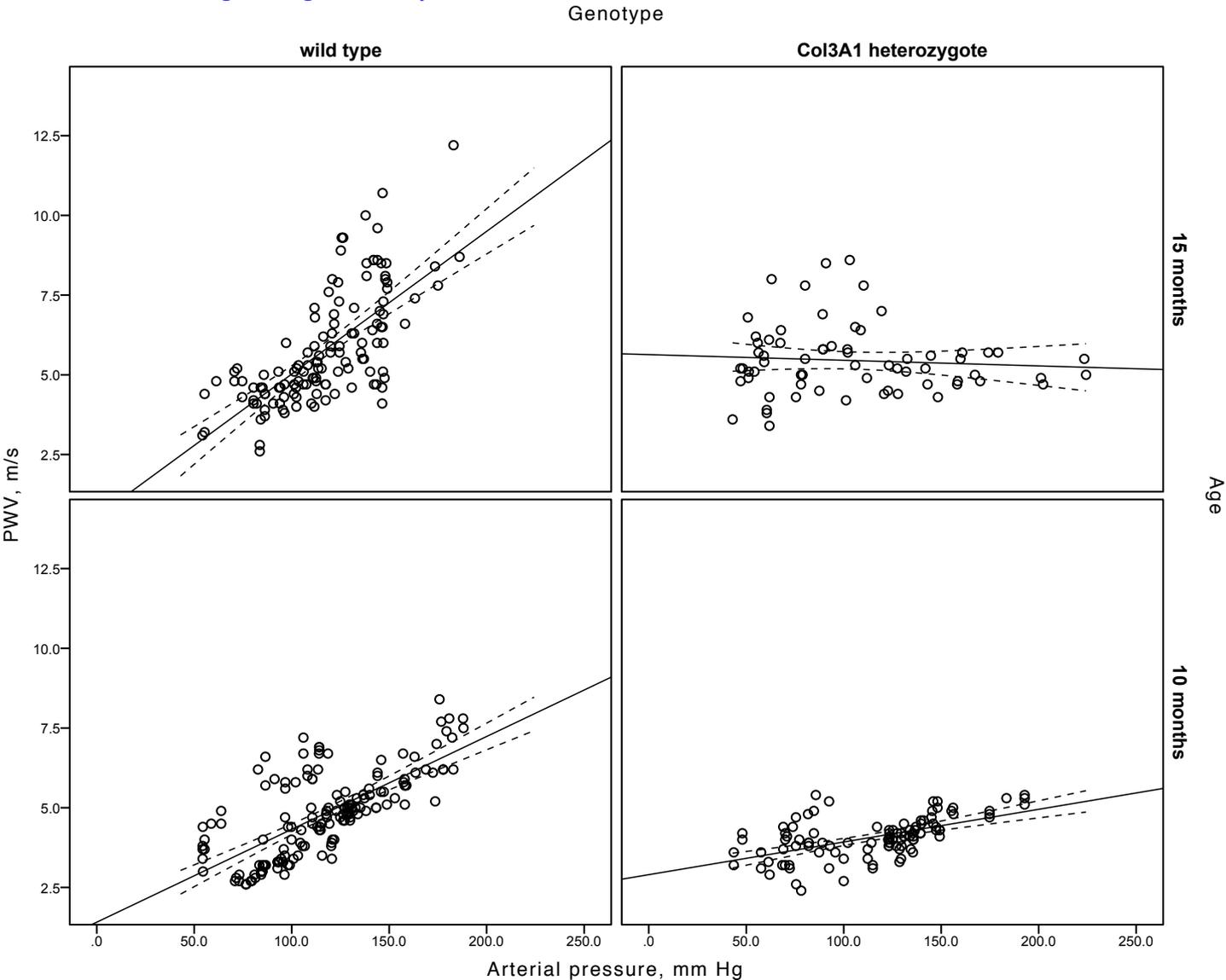


Figure3
[Click here to download Figure: Figure3mice.pdf](#)



7.3 Discussion

Nous avons appliqué chez la souris la technologie ultrafastécho pour la mesure de la VOP locale aortique dans un modèle murin d'haploinsuffisance en collagène de type III. Comme validation interne, l'effet bien connu de l'âge sur la VOP a été recherché et on a pu observer comme chez l'homme une augmentation de la VOP dans le groupe plus âgé. Ces données sont concordantes avec celles d'autres équipes ayant utilisé une mesure de la VOP classique par rapport de la distance entre 2 sondes et le temps de propagation entre ces 2 sites du flux aortique en début de systole (Fleenor et al. 2013; Soucy et al. 2006). A ce titre, les travaux de Fleenor et al. sont très intéressants sur le rôle important du stress oxydatif dans le vieillissement artériel responsable d'une inflammation, de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes et sa réversibilité possible par un traitement par TEMPOL une superoxyde dismutase mimétique exogène, qui détruit les anions superoxydes (Fleenor et al. 2012). Le traitement des souris par TEMPOL a diminué la production d'anions superoxydes, réduit la sécrétion de cytokines proinflammatoires, réduit l'expression de collagène de type I, et surtout a normalisé leur VOP aortique augmentée avec l'âge (Fleenor et al. 2012). Dans notre étude, les souris du groupe plus âgé présentent non seulement une VOP plus élevée que celles du groupe moins âgées mais surtout une augmentation de la VOP parallèlement à l'augmentation de pression artérielle, plus rapide. Cette courbe représentant la rigidification de la paroi artérielle avec l'augmentation de pression artérielle se divise en 2 parties : d'abord une augmentation faible de la VOP par rapport à l'augmentation de pression soit une pente de $0,018\text{m/s/mmHg}$; puis au-dessus de 110mmHg , une augmentation plus forte de la VOP avec une pente de $0,050\text{m/s/mmHg}$. Ceci met en évidence le comportement non-linéaire de l'élasticité artérielle.

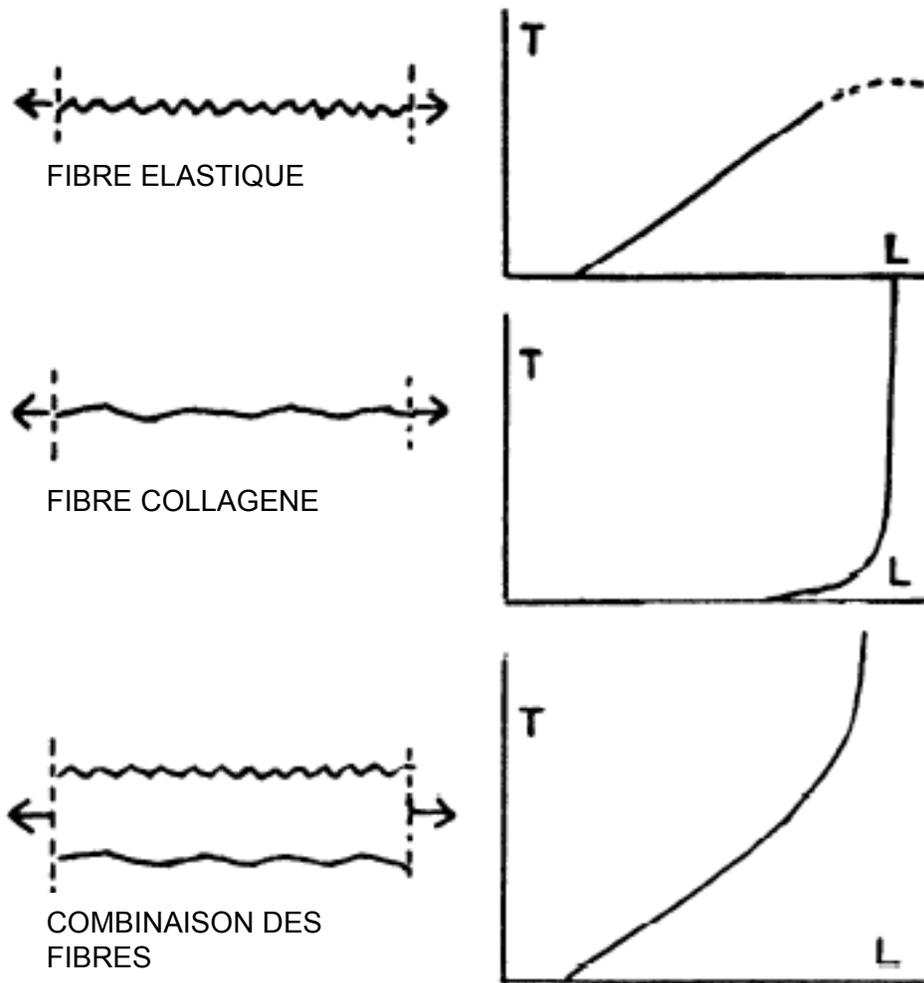


Figure 7-2: Relation Tension (T) (ou force) – Longueur (L) de fibres d'élastine (relation linéaire à allongement long), de fibres de collagène (relation linéaire à allongement court) et relation telle qu'observée dans la paroi artérielle: comportement non linéaire. D'après (Burton 1954)

Le comportement élastique de la paroi artérielle peut être réduit à la somme de 2 matériaux : l'élastine très élastique, et le collagène très rigide (Figure 5-2). Le collagène de la paroi artérielle agirait comme un filet contenant l'allongement des fibres élastiques et limitant l'augmentation du diamètre de l'artère. Ainsi avec l'augmentation de pression artérielle, la première partie de la courbe décrite plus haut correspondrait au recrutement des fibres élastiques et la seconde partie à celui des fibres de collagène.

L'utilisation d'un modèle murin d'haploinsuffisance en collagène de type III prend tout son sens ici. Nous avons mis en évidence au niveau de la paroi aortique des souris Col3a1 hétérozygotes, une

moindre rigidification avec l'augmentation de la pression artérielle de la paroi par rapport aux souris sauvages et ce d'autant plus prononcé avec l'âge. Une fragmentation des lames élastiques de la limitante élastique interne de la paroi aortique a été décrite chez ces souris Col3a1 hétérozygotes avec une aggravation des lésions avec l'âge (Cooper et al. 2010). Différents mécanismes physiopathologiques pourraient expliquer cette interaction entre l'âge et l'haploinsuffisance en collagène de type III. Les souris Col3a1 hétérozygotes présentent une augmentation de l'expression des métalloprotéinases de la matrice (MMP) MMP-9 et MMP-2, enzymes qui dégradent l'élastine et le collagène. L'adjonction dans leur alimentation de doxycycline, un inhibiteur de MMP prévient l'apparition des lésions histologiques décrites ci-dessous (Briest et al. 2011; Tae et al. 2012). Chez l'homme l'expression des MMP-9, MMP-2 et d'autres sérines protéases a été retrouvée corrélée à la rigidité aortique, suggérant que le remodelage de la MEC avec l'âge pourrait contribuer à l'augmentation de rigidité artérielle. On comprend alors que l'augmentation d'activité des MMP avec l'âge se combine à l'activité des sérines protéases déjà élevée chez les souris haploinsuffisantes en collagène de type III, et pourrait expliquer l'interaction âge/génotype observée, avec une dégradation de la MEC de la paroi artérielle. Sur le plan quantitatif, les souris Col3a1 hétérozygotes présentent une réduction du collagène de type III dans la paroi de leurs vaisseaux mais également une altération qualitative des fibres de collagène de type I avec lequel le précédent collagène interagit. Ainsi le nombre de fibrilles de collagène des souris Col3a1 hétérozygotes représente le tiers de celui des souris sauvages et le diamètre moyen est réduit de moitié (Liu et al. 1997). L'altération structurelle de la paroi artérielle, combinée à l'augmentation de l'expression des sérines protéases concourent à une dégradation des propriétés biomécaniques de la paroi artérielle et une moindre résistance à l'augmentation de la pression artérielle avec risque de rupture. Ces données corroborent les conclusions de l'étude des relations génotype-phénotype avec un profil artériel sévère des patients haploinsuffisants avec atteinte de l'aorte plus fréquente que pour les substitutions glycines

et l'apparition des symptômes plus tardive que chez les patients avec substitution glycine (Frank et al. 2015a).

Une limitation de notre étude chez l'animal est de ne pas avoir effectué les descriptions des lésions artérielles chez les souris Col3a1 hétérozygotes après l'établissement de la courbe rigidité/contrainte. L'expérience est difficile à réaliser car la mise en place des cathéters artériels et veineux chez les souris est délicate et nécessite une grande dextérité. Ensuite la sonde d'échographie devait être manipulée par un bras articulé stéréotaxique afin d'exposer un segment suffisamment long de l'aorte abdominale sans interposition aérienne afin de pouvoir acquérir un signal de bonne qualité. Enfin l'augmentation de pression artérielle nécessite des plateaux d'équilibre de la perfusion de phényléphrine allongeant le temps de l'expérience alors que l'appareil d'ultrafastéchographie était réservé pour un temps précis. D'autre part les données de la littérature sont fournies sur le phénotype artériel des souris Col3a1 hétérozygotes avec la description de l'augmentation des lésions histologiques de la paroi artérielle (Cooper et al. 2010; Faugeron et al. 2013; Liu et al. 1997; Smith et al. 2011), et l'apparition de dissections et ruptures aortiques chez les souris soumises à une perfusion d'angiotensine II (Faugeron et al. 2013).

Enfin, le modèle murin Col3a1 hétérozygote est un modèle d'haploinsuffisance en collagène de type III ce qui n'est pas le type de mutation retrouvé majoritairement dans le SEDv. Nous prévoyons donc d'appliquer le même plan expérimental aux souris Col3a1 Knock-In de l'équipe du professeur Xavier Jeunemaître afin d'étudier les propriétés biomécaniques de la paroi artérielle de ces souris.

8 Travaux : Modèle pré-clinique de SEDv par lignées isogéniques humaines de cellules souches pluripotentes induites

8.1 Objectifs de travail

L'objectif de mes travaux effectués à l'université de Californie à San Francisco au sein du laboratoire de génétique du Pr Robert Nussbaum a consisté à établir un modèle cellulaire humain de SEDv par l'édition génomique de cellules souches pluripotentes induites ou « induced pluripotent stem cells » (iPS) (Miyaoaka et al. 2014). L'introduction d'une substitution nucléotidique ciblée au sein du gène d'intérêt permet d'obtenir deux lignées cellulaires quasi-clonale, ne différant que d'une base. On parle de lignées isogéniques. Pour cela, plusieurs techniques ont été développées ces dernières années afin de modifier, éditer, le génome d'une cellule, et ce spécifiquement au niveau du gène d'intérêt. La technologie transcription activator-like effector nucleases (TALENs) (nucléases effectrices de type activateur de transcription) (Miller et al. 2011) offre l'opportunité d'une édition du génome avec un taux plus spécifique et moins d'effets collatéraux que la technologie CRISPR/Cas et une facilité d'emploi supérieure aux doigts de Zinc. Utilisés à partir de en 2009, les TALENs, sont des enzymes de restriction générées par assemblage d'un domaine de liaison à l'ADN, appelé TALE pour transcription activator-like effector, à un domaine enzymatique ayant la capacité de cliver l'ADN (Figure 6-1). Les TALENs sont des séquences d'acides aminés dont l'ordonnement est spécifique d'une séquence nucléotidique, équipée à leur extrémité d'une endonucléase. Les endonucléases sont des enzymes de restriction qui ont la capacité de couper l'ADN au niveau d'une séquence spécifique. Toutefois, la cassure de l'ADN par l'endonucléase ne s'effectue que par la présence de l'extrémité d'un autre TALENs. Les endonucléases fonctionnant par paire. Ceci rend ainsi l'action de ces endonucléases très spécifiques puisqu'un TALENs est complémentaire d'une séquence nucléotidique à gauche de la césure, et un autre TALENs à droite, ce qui correspond à une séquence d'environ 30 paires de bases. Les TALENs peuvent être construits pour se

fixer à quasiment n'importe quelle séquence ADN voulue (Boch 2011). Quand ces enzymes sont transfectées dans les cellules, elles peuvent alors être utilisées pour modifier le génome in situ.

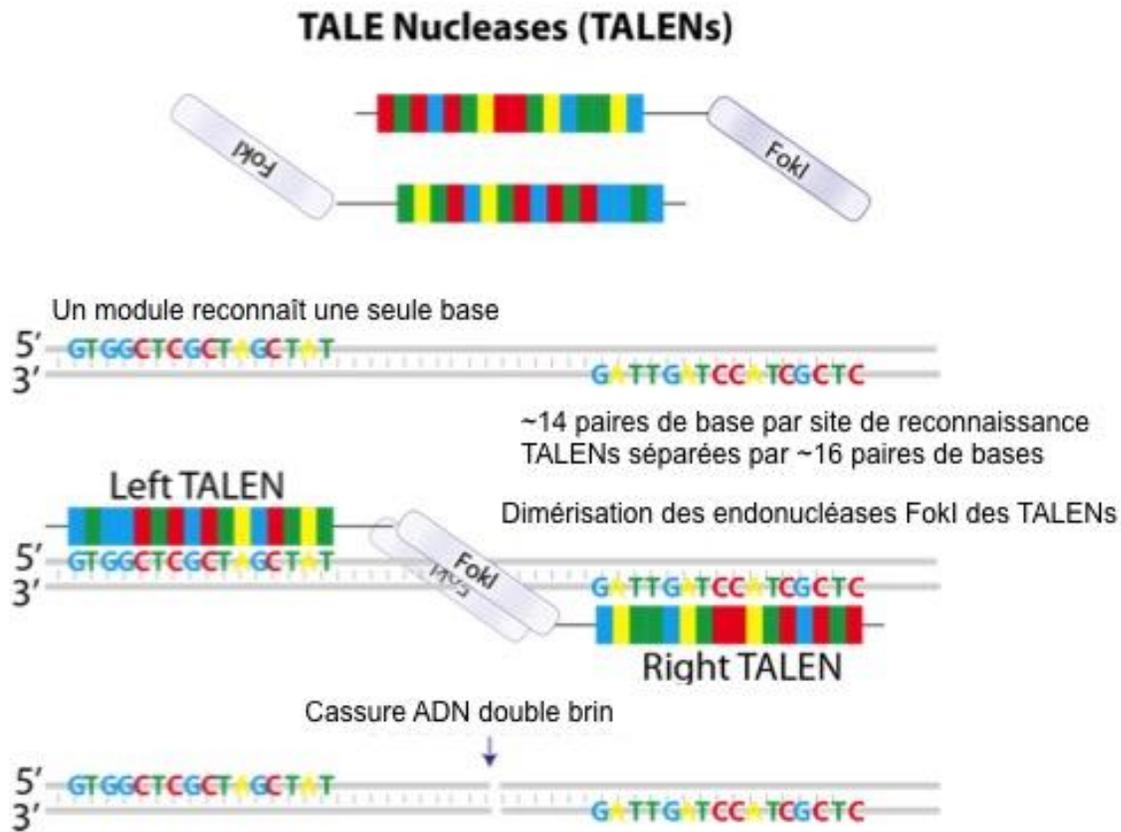


Figure 8-1: Principe de liaison spécifique à l'ADN génomique des TALENs (transcription activator-like effector nucleases) et clivage ADN au site spécifique de la région d'intérêt par des endonucléases (FokI). (d'après http://www.bulldog-bio.com/newsletters/NEPA21_CRISPR_barker.html/)

L'édition du génome sur cellules iPS a déjà été utilisée pour générer un modèle cellulaire isogénique de maladie de Parkinson liée à une mutation de la Leucine rich repeat Kinase 2 (LRRK2). Mais également pour corriger la mutation présente dans le gène LRRK2 de cellules iPS obtenues à partir d'un patient avec une maladie de Parkinson liée à LRRK2 (Liu et al. 2012; Musunuru 2013; Reinhardt et al. 2013). Une fois le modèle cellulaire créé, l'objectif est de conduire la différenciation de ces cellules iPS vers un phénotype de cellules musculaires lisses, cellules constitutives de la paroi artérielle. Un protocole récemment publié permet, à partir de cellules iPS, de dériver des cellules musculaires lisses de 3 lignages

embryologiques différents : neuroectodermique, mésodermique latéral, mésodermique paraxial (Cheung et al. 2014).

Cette approche offre plusieurs intérêts (Musunuru 2013) (Figure 6-2):

- i) un modèle cellulaire isogénique permet de comparer les cellules avec la mutation à leur parfait contrôle (absence de mutation).
- ii) les cellules iPS peuvent être cultivées en grand nombre pour les études in vitro
- iii) les cellules iPS ont la capacité de se différencier dans tous les types cellulaires

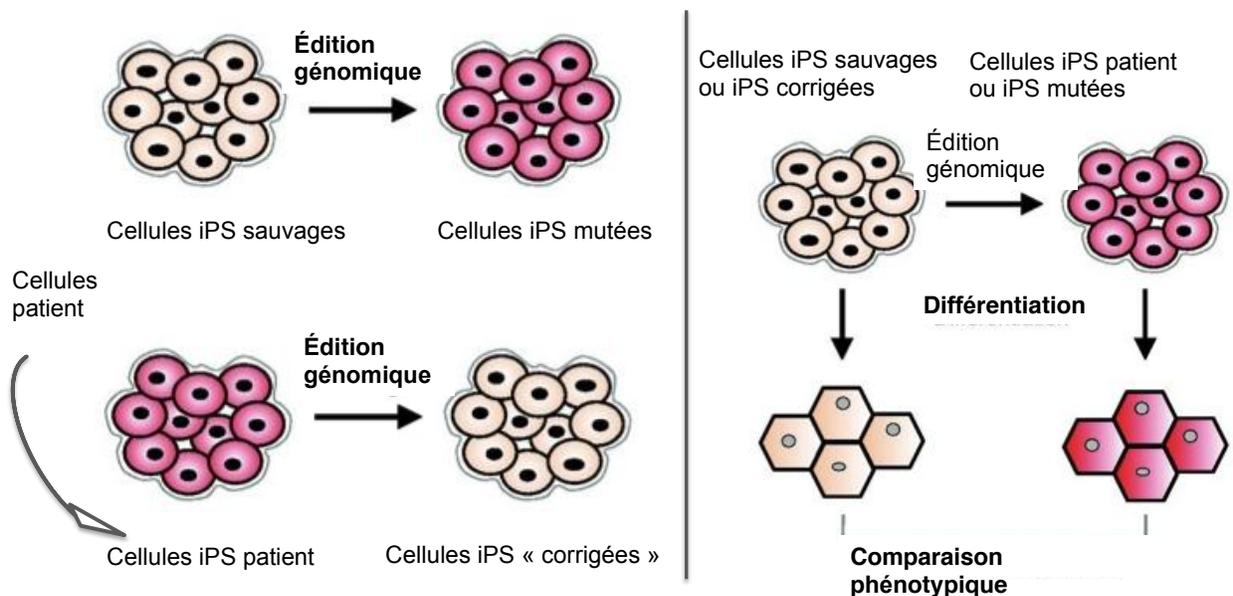


Figure 8-2: Différentes approches de production de lignées isogéniques de cellules iPS, et leur utilisation pour une meilleure compréhension physiopathologique grâce à leur capacités à être dérivées vers tous les types de tissus. D'après (Musunuru 2013)

C'est donc une opportunité unique de pouvoir étudier l'impact des mutations COL3A1 sur les fibroblastes, les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules musculaires utérines...par exemple. La région d'intérêt s'est portée sur la mutation c.547G>A dans l'exon 6, et responsable au niveau protéique de la substitution d'une glycine du domaine de la triple hélice en position 183 par une Sérine : p.Gly183Ser.

8.2 Etapes

8.2.1 Étape 1: séquençage génomique ADN des lignées de travail

Afin de pouvoir, construire l'outil TALENs avec une liaison spécifique à la région d'intérêt il faut vérifier le séquençage ADN des cellules desquelles je souhaite modifier le génome. Il s'agit d'une lignée de cellules iPS issues d'un témoin sain (WTC11) et de cellules classiques immortalisées de cancer du rein HEK293T.

Aucun variant n'a été observé dans les résultats des séquençages de l'ADN génomique obtenu à partir de cultures de cellules HEK293T ou de cellules WTC11 au sein de l'exon 6 du gène COL3A1.

8.2.2 Étape 2: conception des TALENs, construction et séquençage

Afin d'obtenir un clivage spécifique et localisé au locus souhaité sur l'exon 6 du gène COL3A1 des TALENs, le logiciel en ligne ZiFiT (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>) a été utilisé pour choisir les séquences TALENs. L'assemblage des éléments qui composent la séquence correcte codant pour les TALENs a été réalisée dans 2 plasmides : l'un codant pour le TALENs de gauche ou forward, l'autre pour le TALENs de droite ou reverse. Le domaine de liaison à l'ADN se compose de séquences identiques de 33 à 34 acides aminés répétées 15 à 20 fois, à l'exception des acides aminés 12 et 13. Ces deux résidus forment une paire spécifique d'un nucléotide : Histidine-acide Aspartique (HD) pour la cytosine, Asparagine-Glycine (NG) pour la thymine, Asparagine-Isoleucine (NI) pour l'adénine, Asparagine-Asparagine (NN) pour la guanine. Ce couplage entre la complémentarité des paires appropriées d'acides aminés avec les nucléotides et l'espacement régulier par de longues séquences répétitives intercalées entre les paires, permet la reconnaissance spécifique d'une séquence ADN sélectionnée. Le Golden Gate TALEN Kit d'Addgene a été utilisé pour cela (Cermak et al. 2011). Deux paires de TALENs ont été conçues et produites : une homodimérique (les endonucléases du TALENs gauche et du TALENs droit sont les mêmes, rendant possible les combinaisons gauche-gauche et droit-

droit), une hétérodimérique forçant la complémentarité TALENs gauche avec TALENs droit pour que les endonucléases soient actives (Cade et al. 2012; Doyon et al. 2011).

Les séquences des 4 plasmides codant pour la paire homodimérique et la paire hétérodimérique présentent un alignement de 100% avec la séquence prédite.

8.2.3 Étape 3: Validation de l'efficacité des TALENs

Avant d'utiliser les TALENs sur les cellules iPS, il est apparu important de confirmer la capacité des TALENs de cliver spécifiquement l'ADN de notre région d'intérêt. Pour cela, les plasmides codant les TALENs ont été transfectés dans des cellules HEK293T avec la Lipofectamine 2000. La nucléase Surveyor (Qiu et al. 2004) est une endonucléase qui clive l'ADN avec une haute spécificité aux sites où une substitution nucléotidique a eu lieu, ou toute autre perturbation de la séquence ADN. Les différents fragments d'ADN sont ensuite visualisés par migration électrophorétique dans un gel d'agarose et révélés au bromure d'éthidium.

Une activité pourvoyant des jonctions précises ou imprécises des extrémités (Nonhomologous end-joining—NHEJ) était détectable avec le test Surveyor sur l'ADN génomique des cellules HEK293T que ce soit avec les TALENs homodimériques ou hétérodimériques. La taille des fragments d'amplicon correspond aux segments de part et d'autre de la base prédite où doit s'effectuer la césure (Figure 6-3).

Test Surveyor® sur cellules HEK293T transfectées par TALENs

Extraction d'ADN génomique extrait de cellules HEK293T transfectées par Lipofectamine 2000 avec 500ng de Forward et 500ng de Reverse TALEN (soit HomoDimérique soit HétéroDimérique)

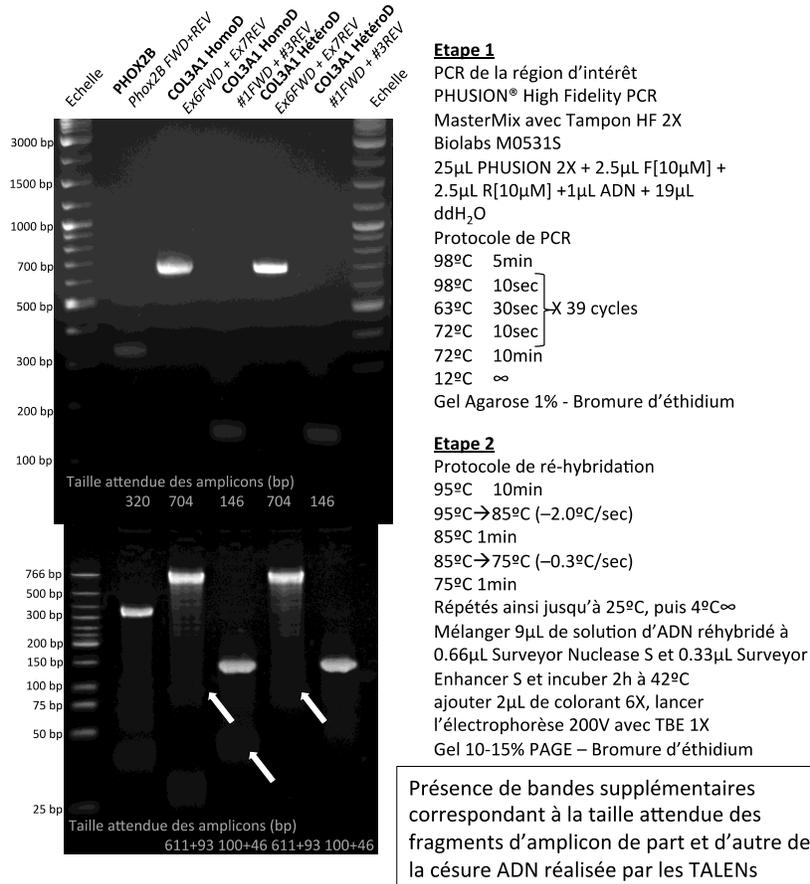


Figure 8-3: Test Surveyor afin de s'assurer que la paire de TALENs transfectée effectue la césure ADN dans la région d'intérêt la colonne PHOX2B sert de contrôle positif pour la technique. Il s'agit de la paire de TALENs spécifique d'une région du gène PHOX2B. COL3A1 HomoD est la paire de TALENs homodimérique construite pour cibler la région d'intérêt dans l'exon 6 du gène COL3A1. COL3A1 HétéroD est la paire de TALENs hétérodimérique construite pour cibler la région d'intérêt dans l'exon 6 du gène COL3A1. Ex6FWD et Ex7REV sont un couple d'amorces encadrant l'exon 6 de COL3A1 (amplicon de 704 paires de base (bp)), de même #1FWD et #3REV sont un couple d'amorces encadrant la région d'intérêt dans l'exon 6 (146 bp).

Les cellules HEK293T ont par la suite été transfectées avec les TALENs et une séquence d'ADN simple brin de la région d'intérêt comportant la mutation. La technique droplet digital PCR (ddPCR) a été utilisée afin de détecter les cellules HEK293T porteuses de la mutation dans l'exon 6 du gène COL3A1.

8.2.4 Étape 4: construction des plasmides contrôles pour la ddPCR

La quantification des rares événements de recombinaison homologue requiert une technique très sensible, en l'occurrence la ddPCR et des contrôles positifs. Le TOPO TA Cloning Kit d'Invitrogen a été utilisé afin de transformer des bactéries TOP10 compétentes (*Escherichia coli*) avec le produit de PCR obtenu par la même paire de amorces que celle utilisée pour la ddPCR (#1F and #4R). Ceci a permis d'obtenir un plasmide codant pour la séquence sauvage de la région d'intérêt de l'exon 6 du gène COL3A1. Pour le plasmide codant la séquence avec la mutation ponctuelle, un gBlock Gene Fragment correspondant à un ADN double brin de 300 paires de base avec les séquences complémentaires des primers (#1F and #4R) à ses extrémités et porteur de la substitution nucléotidique a été fourni par la compagnie IDT. Le TOPO TA Cloning Kit d'Invitrogen a été utilisé afin de transformer des bactéries TOP10 compétentes (*Escherichia coli*) avec le produit de PCR obtenu à partir du gBlock Gene Fragment correspondant à la séquence ADN mutée.

Les séquençages ont révélé une fidélité de 100% de la séquence des plasmides avec la séquence ADN attendue.

8.2.5 Étape 5: Quantification des variants génétiques rares à l'aide de la ddPCR (BioRad®)

La ddPCR a été utilisée afin de pouvoir détecter une expression aussi faible que 0.01% de variant génomique parmi les cultures cellulaires de cellules transfectées. Des sondes TaqMan se lient spécifiquement à la séquence sauvage (sonde étiquetée avec fluorophore 6-FAM) ou à la séquence présentant la mutation (sonde étiquetée avec fluorophore VIC). Les amorces pour la PCR et les sondes sont conçues sur mesure (Figure 6-4).

ddPCR avec les plasmides contrôles (mutant et sauvage)
sondes: 6-FAM sauvage et VIC mutant
Gradient de températures avec 4 paires d'amorces

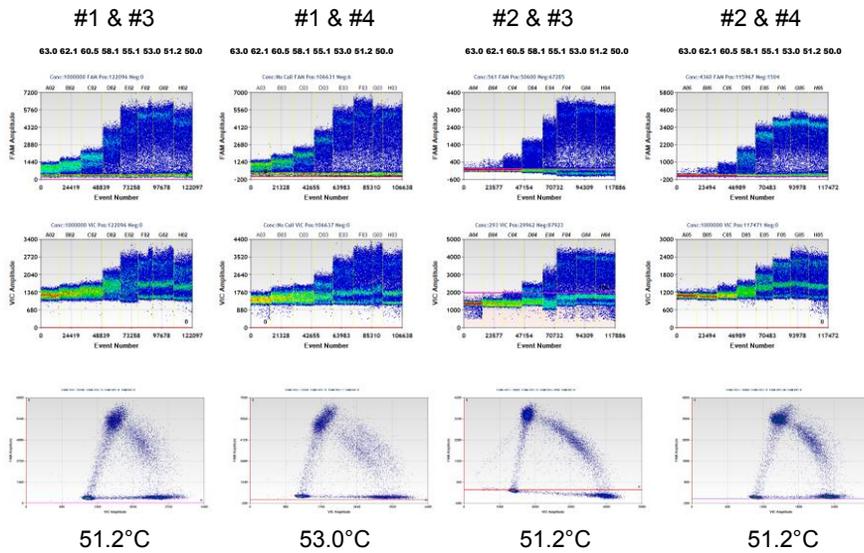


Figure 8-4: Sélection de la paire d'amorces et de la température d'hybridation les plus adaptées afin d'obtenir les signaux des sondes TaqMan sauvage-6-FAM et mutée-VIC les plus intenses.

ddPCR ADN génomique HEK293T
transfectées
sondes: 6-FAM sauvage et VIC mutant

ddPCR blancs (eau)
4 paires d'amorces

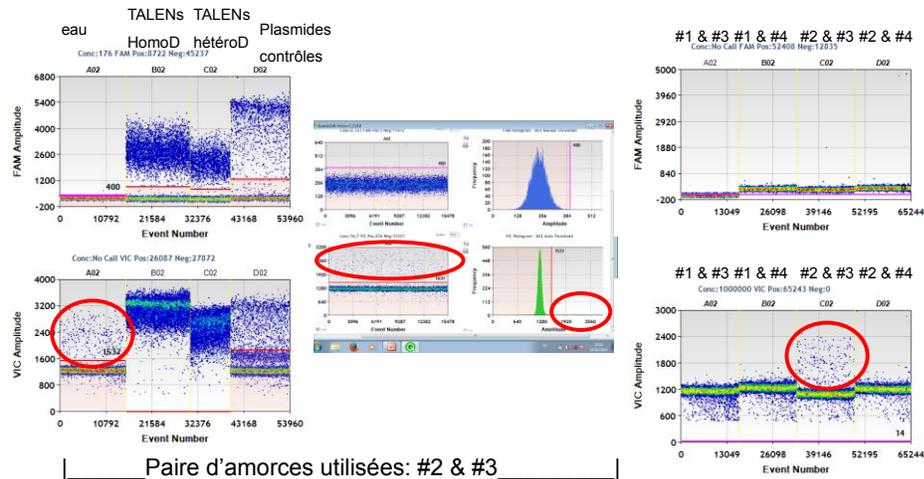


Figure 8-5: Résultats de la quantification de l'allèle sauvage et de l'allèle mute en digital droplet PCR (ddPCR)

La première paire d'amorces choisie (#2 et #3), car donnant les intensités les plus fortes en FAM et VIC, a généré des résultats faux-positifs, avec un signal VIC présent même sans matériel génomique dans l'échantillon amplifié (Figure 6-5).

Ceci nous a conduit au choix d'une nouvelle paire d'amorces permettant de mettre en évidence la qualité des sondes, des contrôles positifs, et l'efficacité de la transfection des cellules HEK293T avec les paires de TALENs et les séquence d'ADN simple brin de la région d'intérêt comportant la mutation.

8.2.6 Étape 6: transfection des cellules iPS avec les paires de TALENs et l'ADN donneur

Les TALENs peuvent être utilisés pour réaliser des modifications du génome par leur capacité à induire des cassures double brin de l'ADN, auxquelles les cellules répondent par des mécanismes de réparation de l'ADN. La réparation par jonction d'extrémités non-homologues (Non-Homologue End-Joining, NHEJ) permet de reconnecter deux extrémités d'ADN résultant d'une cassure double brin. De l'ADN peut être introduit dans le génome en profitant de la NHEJ en prenant soin de fournir une source d'ADN exogène (Miller et al. 2011). Ainsi, deux séquences ADN simple brin (forward, and complementary reverse) et les 2 paires de TALENs (homodimérique et hétérodimérique) ont été utilisées afin d'évaluer l'efficacité de chaque combinaison. La transfection a été réalisée selon 2 méthodes : l'électroporation par le système Neon® d'Invitrogen® et la magnétofection avec le PolyMagNeo d'OzBiosciences.

L'utilisation du système Neon® s'est accompagnée d'une forte mortalité des cellules transfectées. Ce phénomène a été de nettement moindre ampleur avec la Magnétofection permettant de cultiver les cellules iPS transfectées jusqu'à confluence, d'en extraire l'ADN génomique et déterminer ainsi la présence ou non de cellules iPS porteuses de la mutation. La ddPCR a mis au jour que jusqu'à 0,3% des cellules étaient porteuses de la mutation (Figure 6-6).

ddPCR sur ADN génomique d'iPS Magnéto-transfectée

Talens COL3A1 Hétérodimérique + ADN donneur FWD

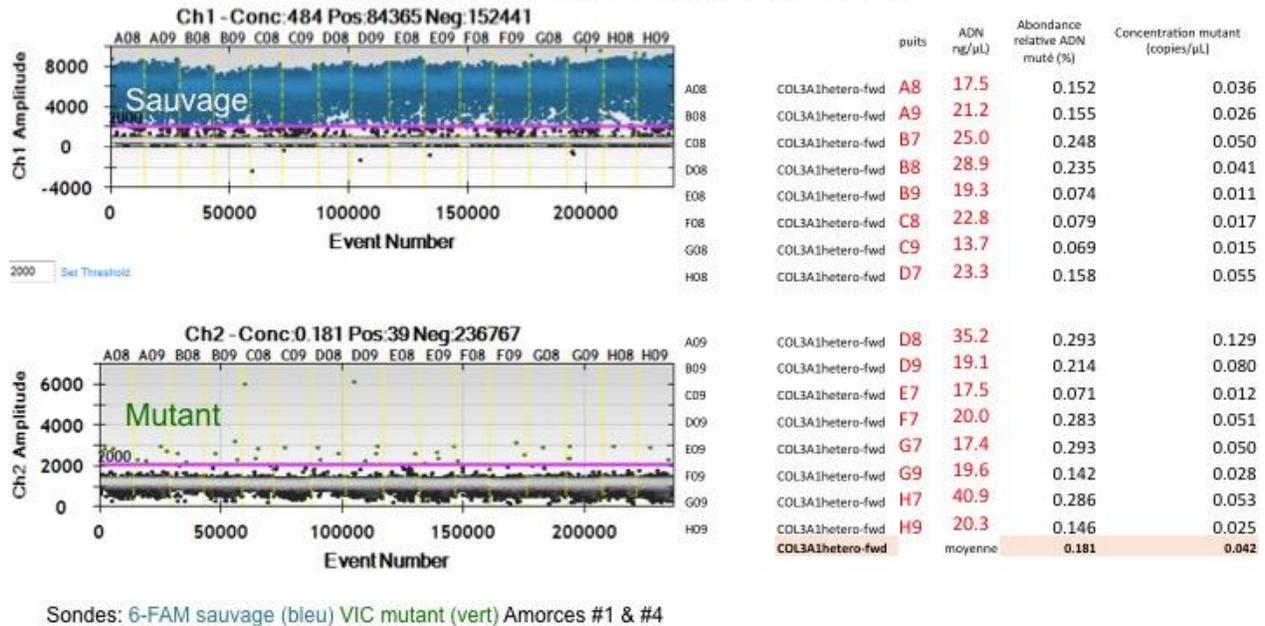


Figure 8-6: Détermination du succès de l'édition génomique de cellules iPS par ddPCR. Les points verts correspondant au signal de la sonde VIC, spécifique de la séquence de l'exon 6 du gène COL3A1 avec la mutation générée par la transfection de la paire de TALENs (ici hétérodimérique) couplés à une séquence ADN porteuse de la mutation (séquence forward). Chaque point correspond au résultat de la PCR au sein d'une gouttelette lipidique comportant l'ADN génomique d'une à trois cellules. Ainsi l'abondance de cellules iPS porteuses de la mutation dans les puits de culture s'élève en moyenne à 0,2%.

8.2.7 Étape 7: culture et enrichissement des cellules iPS porteuses de la mutation

L'objectif est d'enrichir la culture cellulaire par passages successifs des cellules après sélection des puits de culture les plus riches en ADN avec mutation. Le protocole utilisé a été publié en 2014 par l'équipe de Bruce Conklin du Gladstone Institute de San Francisco, chez qui j'ai eu la chance de pouvoir effectuer mes premières manipulations (Miyaoaka et al. 2014).

Après le succès de la transfection et l'obtention de cellules iPS exprimant la mutation au sein du gène COL3A1, l'étape d'enrichissement a été laborieuse et infructueuse avec une progression asymptotique vers une abondance relative de 0,3% en moyenne, et un maximum à 0,9%. Ce résultat était inattendu puisqu'habituellement, au terme de 3 passages ou sous-sélections, la fréquence d'expression de l'allèle muté attendue est supérieure à 5% (Figure 6-7).

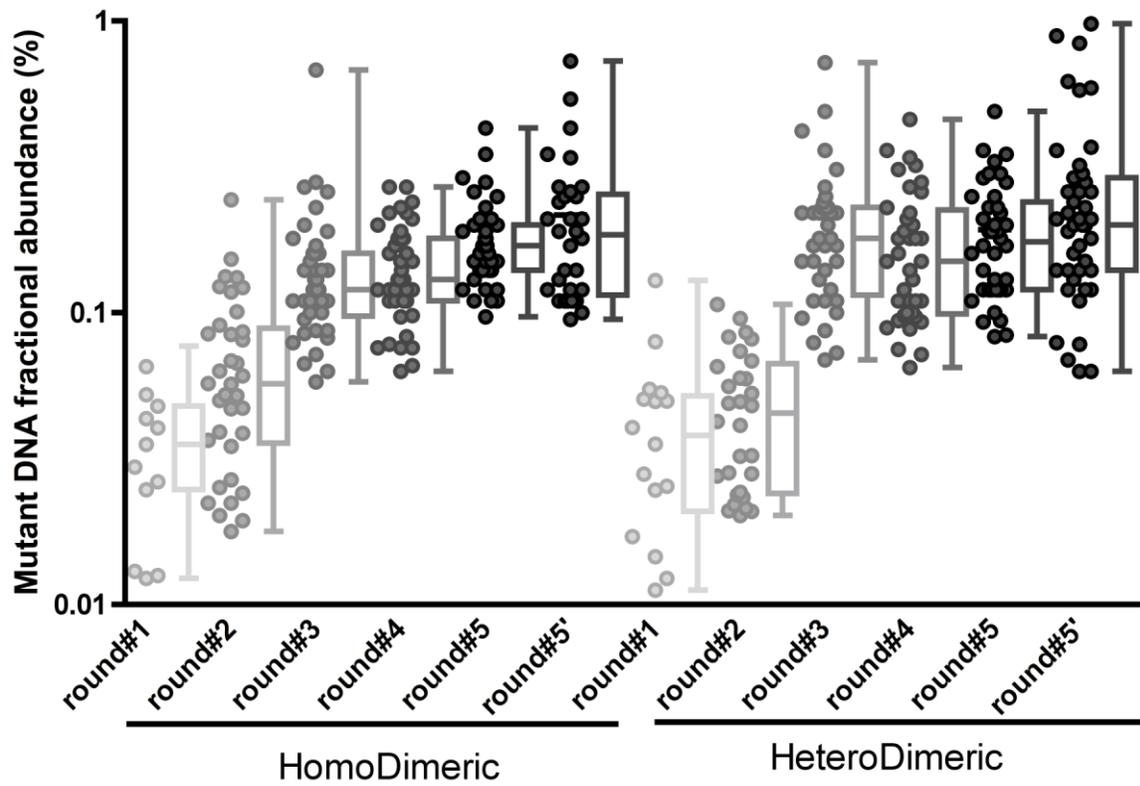


Figure 8-7: Progression au cours des différents passages (round 1 à 5') de l'enrichissement en cellules iPS exprimant la mutation du gène COL3A1.

8.3 Discussion

L'édition génomique est une technique d'avenir, permettant de générer des modèles cellulaires avec invalidation de gène, avec substitution nucléotidique, avec insertion notamment d'une séquence codant la green fluorescente protein (GFP), permettant ainsi de suivre la transcription d'un gène in vivo (Oost 2013; Porteus and Fischer 2012; Ran et al. 2013; Sanjana et al. 2012). Les techniques les plus utilisées actuellement sont les TALENs et le système CRISPR/Cas9. Ce dernier a l'avantage d'être plus aisé à construire, mais est moins spécifique de la région d'intérêt et pourvoyeur d'un plus grand nombre de cassures ADN en dehors de la région d'intérêt « off target activity » responsables de phénotypes différents (Gori et al. 2015; Sato et al. 2015; Sprink et al. 2015). Le choix de la technologie TALENs a été guidé par plusieurs raisons. TALENs est l'un des outils les plus largement utilisés dans le domaine de l'édition du génome. Il permet l'intégration d'une modification d'un gène ou l'inactivation génique d'une manière très efficace et précise. Il s'agit d'une technique très attractive dont le taux de réussite est élevé (Valton et al. 2014).

L'équipe de Bruce Conklin au Gladstone Institute à UCSF a une immense habitude de la confection des TALENs et de l'édition génomique de cellules iPS (Miyaoaka et al. 2014). Amanda Chan a l'expérience de l'édition génomique de cellules iPS pour de nombreux gènes. Elle obtient au terme de 3 passages ou sélections (sib-selection), une fréquence d'expression de l'allèle muté supérieure à 5% (Figure 6-8).

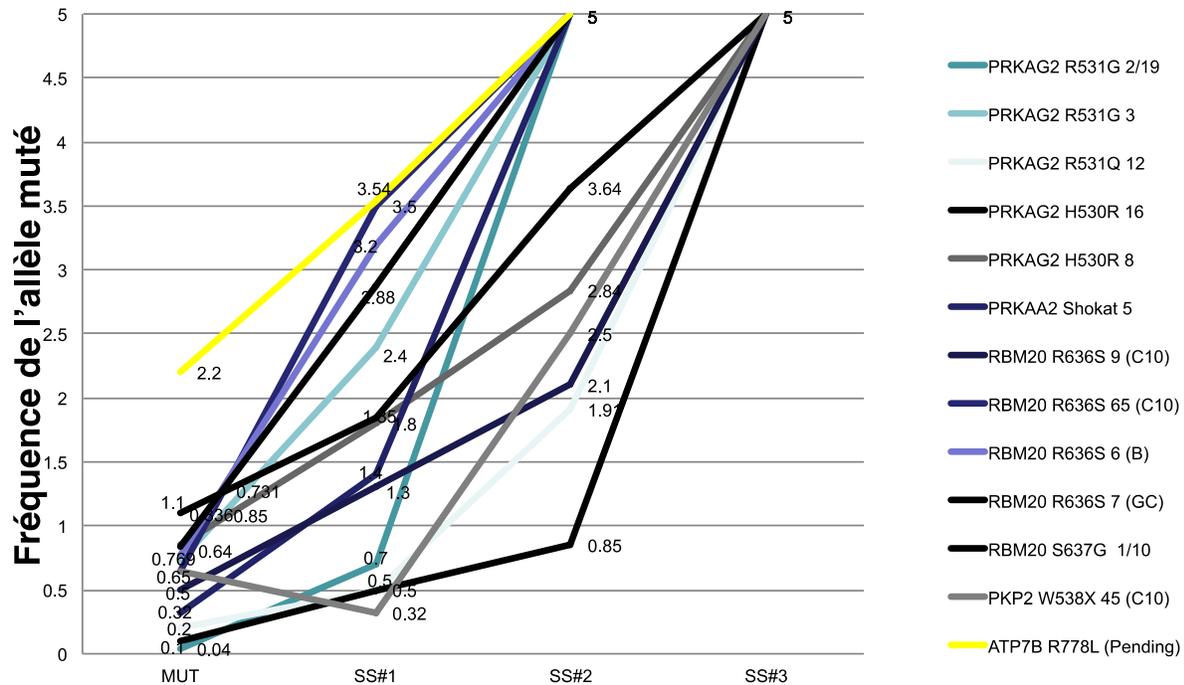


Figure 8-8: Progression au cours des différents passages (SS=sib selection 1 à 3) de l'enrichissement en cellules iPS après transfection de paires de TALENs avec ADN donneur (MUT). Résultats d'édérations génomiques de plusieurs gènes et différentes mutations.

Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées pour tenter de comprendre le plafonnement de l'enrichissement à 0,3% que nous avons obtenu.

Nous avons tout d'abord remis en cause la technique de cultures des iPS, de transfection, d'extraction de l'ADN génomique, d'analyse en ddPCR. En effet, quelques différences de milieu de culture (Gibco E8 pour Amanda Chan, mTeSR pour nous), de technique de transfection (Electroporation par Nucleofector 2b de Lonza, magnétofection d'OzBiosciences pour nous) existaient, et on sait également qu'en fonction des lots de Matrigel qui servent à tapisser les fonds des boîtes de culture pour l'adhésion des colonies d'iPS, ces dernières ont des facilités de prolifération différentes.

L'ensemble des étapes 6 et 7 ont donc été dupliquées dans le laboratoire de Bruce Conklin par Amanda Chan qui a mis au point le protocole d'enrichissement (Miyaoka et al. 2014). La fréquence maximale qu'elle a pu obtenir dans ses conditions standardisées de travail a été 0,701% après 5 sous-sélections, donc similaire aux résultats initiaux que nous avons obtenus.

Il apparaît donc que les cellules exprimant la mutation ont un désavantage de sélection par rapport aux cellules sauvages, empêchant leur enrichissement.

Nous avons donc cherché à analyser le niveau d'expression du gène COL3A1 dans les cellules iPS sauvages. Cette expérience a été menée les derniers jours de présence au laboratoire de UCSF et je n'ai pas pu effectuer de rt-PCR quantitative mais seulement une rt-PCR avec comme gène rapporteur la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les cellules iPS expriment l'ARN messager de COL3A1. Le niveau d'expression est moindre que la GAPDH, mais bien présent (Figure 6-9).

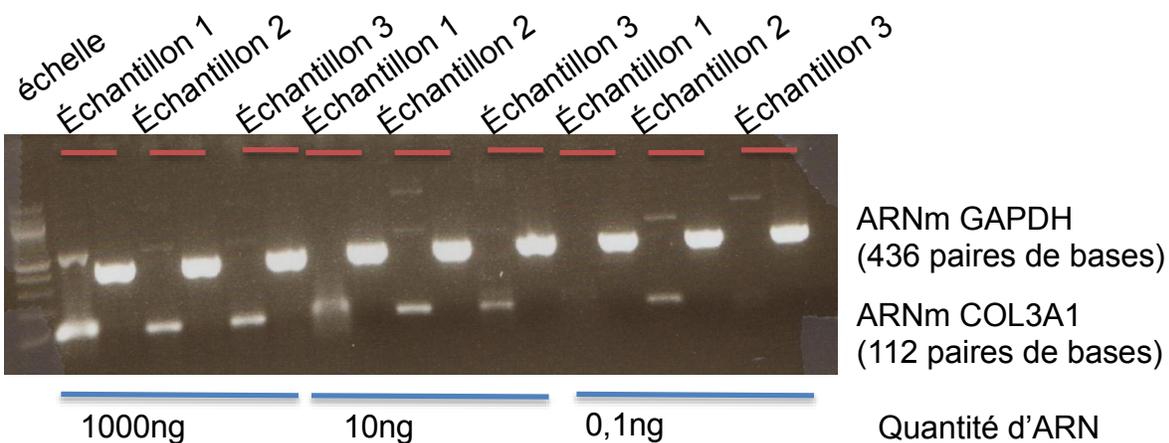


Figure 8-9: Expression de l'ARN messager (ARNm) de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de chaîne alpha1 de procollagène de type III (COL3A1) après extraction de l'ARN total de 3 cultures de cellules iPS.

La prolifération et le maintien au stade indifférencié des cellules iPS nécessite de les cultiver sur une matrice protéique : vitronectine, Matrigel, ou fibroblastes irradiés. Devant la transcription par les iPS de COL3A1, il est possible que les iPS exprimant la mutation insérée dans l'exon 6 de COL3A1 présentent un désavantage par défaut de prolifération secondaire à une production de collagène de type III anormal, soit stocké en intracellulaire, soit sécrété, mais délétère pour une croissance et une prolifération cellulaire normale. Cette hypothèse nouvelle générée par ces travaux fondamentaux préliminaires ouvre quelques hypothèses intéressantes dans la physiologie cellulaire et la physiopathologie du SEDv.

La thérapie génique est une option séduisante pour la guérison des maladies d'origine génétique. Toutefois, il n'y a pas de technologie d'emblée accessible pour le traitement d'anomalies géniques à

effet dominant négatif comme dans le SEDv. Des approches d'inhibition par interférence ARN, diminuant l'expression post-transcriptionnelle de gènes a été testée dans le SEDv (Muller et al. 2012; Watanabe et al. 2005). Muller et al ont transfecté des fibroblastes issus de patients atteint de SEDv, par de petits ARN interférents (siRNA). Ils ont pu observer une diminution de l'expression des ARNm mutants jusqu'à 90 %, et la restauration de fibrilles de collagènes normales. Néanmoins cette suppression de l'expression de l'allèle muté, conduit à une haploinsuffisance (Muller et al. 2012). Watanabe et al. ont proposé de combiner deux approches. La première a cherché à détruire les transcrits anormaux issus d'une mutation d'un site d'épissage en 5' du gène COL3A1, par des siRNA. La quantité d'ARNm muté a diminué jusqu'à 80%. La seconde approche a consisté à augmenter la production d'ARNm de COL3A1 par transfection d'un vecteur exprimant la lysyl oxidase (LOX), qui on l'a vu plus haut joue un rôle dans la maturation extracellulaire du collagène, et qui en intracellulaire est un activateur de transcription du promoteur de COL3A1. La combinaison des 2 approches a permis d'obtenir une quantité quasi normale d'ARNm de COL3A1 (Watanabe et al. 2005). Par ailleurs, Deyle et al ont mis en œuvre une approche d'invalidation de l'allèle muté dans l'ostéogénèse imparfaite avec la correction des gènes COL1A1 et COL1A2 par transfection de lentivirus (Deyle et al. 2011). Ils ont transfecté des cellules souches mésenchymateuses (MSC) de patients afin d'invalider l'allèle muté, puis ils ont produit des cellules iPS à partir de ces MSC « corrigées ». L'obtention des MSC a été obtenue par différenciation des cellules iPS, et tant l'expression que la sécrétion de collagène de type I étaient normalisées et comparables aux MSC de sujets contrôle, par rapport aux MSC des patients atteints d'ostéogénèse imparfaite (Deyle et al. 2011).

L'édition génomique pourrait permettre d'envisager corriger la mutation ponctuelle du gène COL3A1 de patients atteints de SEDv. Ici, la correction n'aboutirait pas à une haploinsuffisance mais à une restitution ad integrum de 2 allèles fonctionnels. Cette correction pourrait intervenir soit à partir des cultures de fibroblastes de patients directement, puis induire les fibroblastes corrigés en cellules iPS, soit induire des cellules iPS à partir de fibroblastes de patients et corriger ces iPS (Musunuru 2013) (Figure 6-

2). Il s'agit de la perspective de continuation de ce travail, puisque nous possédons des fibroblastes cutanés de patient avec la substitution p.Gly183Ser, en espérant que malgré le désavantage de prolifération de cette mutation COL3A1 nous puissions dériver des cellules iPS à partir de ces fibroblastes.

9 CONCLUSIONS

Bien que le SEDv soit une maladie artérielle très rare, l'atteinte à un âge jeune, la sévérité des complications, leur morbidité, leur mortalité, l'absence de signes avant-coureurs incitent à développer des thérapeutiques permettant de diminuer l'incidence des ruptures artérielles, digestives, ou utérines, et de mieux les traiter lorsqu'elles surviennent. L'administration du Céliprolol, un bêtabloquant, a permis de diminuer les événements artériels majeurs (Ong et al. 2010). Mais encore 20% des patients traités présentent des complications. Une meilleure compréhension des aspects physiopathologiques du SEDv est nécessaire afin de mieux appréhender les conséquences des mutations du gène COL3A1 par le développement d'approches innovantes des modèles pré-cliniques et d'outils de caractérisation et de suivi plus précis.

Ainsi nos travaux ont permis d'améliorer la connaissance phénotypique du SEDv et la relation génotype-phénotype. Le phénotype des 215 patients présentant des mutations du gène COL3A1 était parfaitement détaillé et il est apparu que les complications digestives n'étaient observées que chez les patients dont les mutations concernaient une substitution glycine dans le domaine de la triple hélice, l'atteinte d'un site d'épissage ou les insertions/délétions (Frank et al. 2015a). Par ailleurs, en cas de mutation responsable d'une haploinsuffisance, l'atteinte aortique était plus précoce et plus fréquente, que dans les autres types de mutation. Sur le plan physiopathologique, ceci suggère que la diminution quantitative du collagène de type III dans la paroi aortique, et non dans la paroi du tube digestif, est probablement le mécanisme prépondérant de la fragilité de ce tissu. Par ailleurs, cela permet d'émettre des hypothèses sur les rôles différentiels du collagène de type III dans la paroi digestive ou la paroi artérielle. Néanmoins, au vu de la variabilité phénotypique au sein de certaines familles, d'autres facteurs indépendants du type de mutation existent et devront être explorés afin d'améliorer nos connaissances sur la relation génotype-phénotype. Sur le plan thérapeutique, une meilleure

caractérisation de cette relation permettra de mieux définir les critères d'évaluation et d'objectifs de futurs essais thérapeutiques.

Les complications artérielles au cours du SEDv surviennent sur des vaisseaux ne présentant pas de disparité de calibre ou de modification visible de la paroi en imagerie. Afin de mieux caractériser les propriétés biomécaniques de la paroi artérielle dans le SEDv nous avons eu recours à une technologie ultrasonore innovante, permettant d'acquérir le signal échographique extrêmement rapidement. Ainsi des phénomènes très rapides, comme la vitesse de l'onde de pouls qui se propage le long de la paroi des artères après chaque battement cardiaque, peuvent être visualisés et mesurés en temps réel au niveau du segment artériel étudié. Nous avons appliqué cette technologie dans un modèle pré-clinique murin d'haploinsuffisance en collagène de type III, mais également sur des patients atteints de SEDv moléculairement prouvés. Les résultats sont concordants, mettant en évidence des propriétés biomécaniques artérielles différentes des témoins en fonction des valeurs de pression artérielle. La paroi artérielle se rigidifie au cours du cycle cardiaque face à l'augmentation de pression artérielle générée par la systole ventriculaire. Tant chez les souris haploinsuffisantes en collagène de type III que chez les patients atteints de SEDv nous avons observé une moindre rigidification de la paroi des artères au cours du cycle cardiaque (Mirault et al. 2015; Mirault et al. 2013). Cette caractéristique témoigne d'une faiblesse de la MEC conférant sa rigidité à la paroi artérielle, liée ici au collagène de type III quantitativement ou qualitativement altéré. L'ultrafastécho nous a permis de mieux caractériser la paroi artérielle des patients SEDv permettant d'envisager que par un suivi longitudinal, des modifications précoces de ces nouveaux paramètres pourraient précéder la survenue d'une complication artérielle à type de dissection, anévrisme ou rupture. Cela représenterait l'opportunité d'intensifier le traitement avant la survenue d'une complication et de suivre de façon plus rapprochée les patients. Bien évidemment des études de suivi sont nécessaires afin d'étudier l'évolution de ces paramètres avec le

temps, de mettre en évidence une corrélation avec la survenue des complications et de démontrer le bénéfice de cette approche sur la morbidité des complications vasculaires.

Enfin, au-delà d'une physiopathologie basée principalement sur les conséquences moléculaires sur la MEC nos travaux préliminaires suggèrent qu'il existe peut être également des conséquences cellulaires des mutations du gène COL3A1 en terme de prolifération et croissance cellulaires. L'approche par édition génomique offre de multiples intérêts : le développement d'un modèle cellulaire humain avec son parfait témoin, et une perspective de thérapie génique. De nombreux écueils se dressent sur cette voie, à commencer par l'obtention de lignées de cellules iPS isogéniques. Nos expérimentations se sont heurtées à un désavantage des cellules exprimant la mutation au sein du gène COL3A1 par rapport aux cellules sauvages. Ceci ne nous a pas permis d'isoler une population pure de cellules iPS mutées. Cet effet n'était pas attendu pour des cellules souches qui n'ont pas un phénotype sécrétoire de protéines de la MEC comme l'ont les fibroblastes. Néanmoins, il suscite des questionnements sur les conséquences de la transcription d'une chaîne α de procollagène de type III sur les cellules et sur l'impact de cet effet cellulaire à l'échelon tissulaire. Enfin, l'avenir de la thérapie génique nécessite non seulement de pouvoir corriger la mutation causale de la maladie, mais également de pouvoir cibler les tissus responsables des complications cliniques chez l'homme.

Nos travaux ont donc permis d'éclaircir des aspects physiopathologiques du SEDv, de révéler des caractéristiques entre le phénotype et le type de mutation du gène COL3A1 et des différences de comportement de la paroi artérielle par rapport aux individus non atteints ; de définir des paramètres nouveaux d'évaluation de la rigidité artérielle ; d'aborder la problématique sur le versant cellulaire et non pas seulement matriciel. De nombreuses zones d'ombre persistent, évidemment, mais elles stimulent l'esprit à poursuivre la recherche sur cette maladie, tant sur le plan fondamental que clinique.

10 Références

- Ahmadi J, Choi JN. Newly diagnosed Ehlers-Danlos syndrome in an adult with elastosis perforans serpiginosa. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:226–227.
- Aldridge RT. Ehlers-Danlos syndrome causing intestinal perforation. *Br J Surg* 1967;54:22–25.
- Alexakis C, Caruelle JP, Sezeur A, Cosnes J, Gendre JP, Mosnier H, Beaugerie L, Gallot D, Malafosse M, Barritault D, Kern P. Reversal of abnormal collagen production in Crohn's disease intestinal biopsies treated with regenerating agents. *Gut* BMJ Group, 2004;53:85–90.
- André R, Duhamel G, Vergoz D, Lavallée R. [Visceral and hemorrhagic consequences of Ehlers-Danlos disease]. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1965;116:971–976.
- Anstey A, Mayne K, Winter M, Van de Pette J, Pope FM. Platelet and coagulation studies in Ehlers-Danlos syndrome. *Br J Dermatol* 1991;125:155–163.
- Armentano RL, Levenson J, Barra JG, Fischer EI, Breitbart GJ, Pichel RH, Simon A. Assessment of elastin and collagen contribution to aortic elasticity in conscious dogs. *Am J Physiol* 1991;260:H1870–7.
- Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, Target R, Levy BI. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995;26:485–490.
- Bade MA, Queral LA, Mukherjee D, Kong LS. Endovascular abdominal aortic aneurysm repair in a patient with Ehlers-Danlos syndrome. *J Vasc Surg* 2007;46:360–362.
- Barabas AP. Heterogeneity of the Ehlers-Danlos syndrome: description of three clinical types and a hypothesis to explain the basic defect(s). *Br Med J BMJ Group*, 1967;2:612–613.
- Barabas AP. Vascular complications in the Ehlers-Danlos syndrome, with special reference to the “arterial type” or Sack's syndrome. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1972;13:160–167.
- Bedda S, Radovanovic A, Fajardy A, Bataille N, Montariol T. [Ehlers-Danlos syndrome revealed by sigmoid perforation]. *Ann Chir* 2005;130:44–46.
- Beighton P, de Paepe A, Danks D, Finidori G, Gedde-Dahl T, Goodman R, Hall JG, Hollister DW, Horton W, McKusick VA. *International Nosology of Heritable Disorders of Connective Tissue*, Berlin, 1986. Am J Med Genet Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 1988;29:581–594.
- Beighton P, de Paepe A, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am. J. Med. Genet.* 1998. pp. 31–37.
- Beighton P, Horan FT. Surgical aspects of the Ehlers-Danlos syndrome. A survey of 100 cases. *Br J Surg* 1969;56:255–259.

- Beighton P, Solomon L, Soskolne CL. Articular mobility in an African population. *Annals of the Rheumatic Diseases* BMJ Group, 1973;32:413–418.
- Beighton PH, Murdoch JL, Votteler T. Gastrointestinal complications of the Ehlers-Danlos syndrome. *Gut* BMJ Group, 1969;10:1004–1008.
- Bergaya S, Faure S, Baudrie V, Rio M, Escoubet B, Bonnin P, Henrion D, Loirand G, Achard J-M, Jeunemaitre X, Hadchouel J. WNK1 regulates vasoconstriction and blood pressure response to α 1-adrenergic stimulation in mice. *Hypertension* 2011;58:439–445.
- Bergel DH. The static elastic properties of the arterial wall. *J Physiol (Lond)* 1961;156:445–457.
- Bergqvist D. Ehlers-Danlos type IV syndrome. A review from a vascular surgical point of view. *Eur J Surg* 1996;162:163–170.
- Bergqvist D, Björck M, Wanhainen A. Treatment of vascular Ehlers-Danlos syndrome: a systematic review. *Ann Surg* 2013;258:257–261.
- Berney T, La Scala G, Vettorel D, Gumowski D, Hauser C, Frileux P, Ambrosetti P, Rohner A. Surgical pitfalls in a patient with type IV Ehlers-Danlos syndrome and spontaneous colonic rupture. Report of a case. *Dis Colon Rectum* 1994;37:1038–1042.
- Berry CL, Greenwald SE. Effects of hypertension on the static mechanical properties and chemical composition of the rat aorta. *Cardiovasc Res* 1976;10:437–451.
- Boch J. TALEs of genome targeting. *Nature Biotechnology* 2011;29:135–136.
- Bode MK, Karttunen TJ, Mäkelä J, Risteli L, Risteli J. Type I and III collagens in human colon cancer and diverticulosis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:747–752.
- Bolster BD, Atalar E, Hardy CJ, McVeigh ER. Accuracy of arterial pulse-wave velocity measurement using MR. *J Magn Reson Imaging* 1998;8:878–888.
- Borlotti A, Khir AW, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Vermeersch S, Segers P. Noninvasive determination of local pulse wave velocity and wave intensity: changes with age and gender in the carotid and femoral arteries of healthy human. *J Appl Physiol* 2012;113:727–735.
- Boutouyrie P, Briet M, Collin C, Vermeersch S, Pannier B. Assessment of pulse wave velocity. *Artery Res Elsevier*, 2009;3:3–8.
- Boutouyrie P, Germain DP, Fiessinger J-N, Laloux B, Perdu J, Laurent S. Increased carotid wall stress in vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Circulation* 2004;109:1530–1535.
- Brands PJ, Hoeks AP, Willigers J, Willekes C, Reneman RS. An integrated system for the non-invasive assessment of vessel wall and hemodynamic properties of large arteries by means of ultrasound. *Eur J Ultrasound* 1999;9:257–266.
- Brands PJ, Willigers JM, Ledoux LA, Reneman RS, Hoeks AP. A noninvasive method to estimate pulse wave velocity in arteries locally by means of ultrasound. *Ultrasound in Medicine & Biology* 1998;24:1325–1335.
- Briest W, Cooper TK, Tae H-J, Krawczyk M, McDonnell NB, Talan MI. Doxycycline ameliorates

the susceptibility to aortic lesions in a mouse model for the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;337:621–627.

Brighthouse D, Guard B. Anaesthesia for caesarean section in a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Br J Anaesth* 1992;69:517–519.

Brodeur MR, Bouvet C, Bouchard S, Moreau S, Leblond J, deBlois D, Moreau P. Reduction of advanced-glycation end products levels and inhibition of RAGE signaling decreases rat vascular calcification induced by diabetes. *PLoS ONE* 2014;9:e85922.

Brooke BS, Arnaoutakis G, McDonnell NB, Black JH. Contemporary management of vascular complications associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Journal of Vascular Surgery* 2010;51:131–8– discussion 138–9.

Burton AC. Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *Physiol Rev* 1954;34:619–642.

Byers PH. Brittle bones--fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet* 1990;6:293–300.

Byers PH, Holbrook KA, Barsh GS, Smith LT, Bornstein P. Altered secretion of type III procollagen in a form of type IV Ehlers-Danlos syndrome. *Biochemical studies in cultured fibroblasts. Lab Invest* 1981;44:336–341.

Byers PH, Holbrook KA, McGillivray B, MacLeod PM, Lowry RB. Clinical and ultrastructural heterogeneity of type IV Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Genet* 1979;47:141–150.

Cade L, Reyon D, Hwang WY, Tsai SQ, Patel S, Khayter C, Joung JK, Sander JD, Peterson RT, Yeh J-RJ. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Research* 2012;40:8001–8010.

Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005;118:1341–1353.

Catala-Pétavy C, Machet L, Georgesco G, Pétavy F, Maruani A, Vaillant L. Contribution of skin biometry to the diagnosis of the Ehlers-Danlos syndrome in a prospective series of 41 patients. *Skin Res Technol* 2009;15:412–417.

Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic Stiffness: Current Understanding and Future Directions. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1511–1522.

Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research* 2011;39:e82.

Cheung C, Bernardo AS, Pedersen RA, Sinha S. Directed differentiation of embryonic origin-specific vascular smooth muscle subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2014;9:929–938.

Chuman H, Trobe JD, Petty EM, Schwarze U, Pepin M, Byers PH, Deveikis JP. Spontaneous direct carotid-cavernous fistula in Ehlers-Danlos syndrome type IV: two case reports and a review of the literature. *J Neuroophthalmol* 2002;22:75–81.

- Cikrit DF, Glover JR, Dalsing MC, Silver D. The Ehlers-Danlos specter revisited. *Vasc Endovascular Surg* 2002;36:213–217.
- Cikrit DF, Miles JH, Silver D. Spontaneous arterial perforation: the Ehlers-Danlos specter. *J Vasc Surg* 1987;5:248–255.
- Cooper TK, Zhong Q, Krawczyk M, Tae HJ, Muller GA, Schubert R, Myers LA, Dietz HC, Talan MI, Briest W. The haploinsufficient Col3a1 mouse as a model for vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Vet Pathol* 2010;47:1028–1039.
- Couade M, Pernot M, Messas E, Emmerich J, Hagege A, Fink M, Tanter M. Ultrafast imaging of the arterial pulse wave. *Irbm* 2011;32:106–108.
- Dalainas I. Regarding "Percutaneous embolization of a lumbar pseudoaneurysm in a patient with type IV Ehlers-Danlos syndrome". *J Vasc Surg* 2008;47:1376–author reply 1376.
- Danlos M. Un cas de cutis laxa avec tumeurs par contusion chronique des coudes et des genoux (xanthome juvénile pseudo-diabétique de MM hallopeau et Mace de Lepinay). *Bull Soc Fr Dermatol Syphil Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr*, 1908;19:70–72.
- Davies JI, Struthers AD. Pulse wave analysis and pulse wave velocity: a critical review of their strengths and weaknesses. *Journal of Hypertension* 2003;21:463–472.
- De Felice C, Toti P, Di Maggio G, Parrini S, Bagnoli F. Absence of the inferior labial and lingual frenula in Ehlers-Danlos syndrome. *The Lancet Elsevier*, 2001;357:1500–1502.
- de Paepe A. Ehlers-Danlos syndrome type IV. Clinical and molecular aspects and guidelines for diagnosis and management. *Dermatology (Basel)* 1994;189 Suppl 2:21–25.
- De Paepe A, Malfait F. Bleeding and bruising in patients with Ehlers-Danlos syndrome and other collagen vascular disorders. *Br J Haematol Blackwell Science Ltd*, 2004;127:491–500.
- Debette S, Goeggel-Simonetti B, Schilling S, Martin JJ, Kloss M, Sarikaya H, Hausser I, Engelter S, Metso TM, Pezzini A, Thijs V, Touzé E, Paolucci S, Costa P, Sessa M, Samson Y, Béjot Y, Altintas A, Metso AJ, Hervé D, Lichy C, Jung S, Fischer U, Lamy C, Grau A, Chabriat H, Caso V, Lyrer PA, Stapf C, Tatlisumak T, Brandt T, Tournier-Lasserre E, Germain DP, Frank M, Baumgartner RW, Grond-Ginsbach C, Bousser M-G, Leys D, Dallongeville J, Bersano A, Arnold M, CADISP-plus consortium. Familial occurrence and heritable connective tissue disorders in cervical artery dissection. *Neurology Lippincott Williams & Wilkins*, 2014;83:2023–2031.
- Demirogullari B, Karabulut R, Demirtola A, Karabulut B, Gol IH, Aybay C, Symoens S, Sonmez K, Basaklar AC, Kale N. A novel mutation in the vascular Ehlers-Danlos syndrome: a case presenting with colonic perforations. *J Pediatr Surg* 2006;41:e27–30.
- Desal HA, Toulgoat F, Raoul S, Guillon B, Bommard S, Naudou-Giron E, Auffray-Calvier E, de Kersaint-Gilly A. Ehlers-Danlos syndrome type IV and recurrent carotid-cavernous fistula: review of the literature, endovascular approach, technique and difficulties. *Neuroradiology* 2005;47:300–304.
- Deyle DR, Khan IF, Ren G, Wang P-R, Kho J, Schwarze U, Russell DW. Normal collagen and bone production by gene-targeted human osteogenesis imperfecta iPSCs. *Molecular*

Therapy Nature Publishing Group, 2011;20:204–213.

Dill-Russell P, Jones LS. Anaesthesia for caesarean section in a patient with Ehlers-Danlos syndrome and mitral valve prolapse. *Int J Obstet Anesth* 2001;10:192–197.

Dolan AL, Mishra MB, Chambers JB, Grahame R. Clinical and echocardiographic survey of the Ehlers-Danlos syndrome. *Br J Rheumatol* 1997;36:459–462.

Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods* 2011;8:74–79.

Ehlers E. Cutis laxa. Nagung zu haemorrhagien in der haut, lockierung mehrerer. *Artik Dermatol Zeit* 1901;8:173–175.

Emanuel BS, Cannizzaro LA, Seyer JM, Myers JC. Human alpha 1(III) and alpha 2(V) procollagen genes are located on the long arm of chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:3385–3389.

ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. 2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *Journal of Hypertension*. 2013. pp. 1925–1938.

Fallas JA, Gauba V, Hartgerink JD. Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:26851–26859.

Faugeroux J, Nematalla H, Li W, Clement M, Robidel E, Frank M, Curis E, Ait-Oufella H, Caligiuri G, Nicoletti A, Hagege A, Messas E, Bruneval P, Jeunemaitre X, Bergaya S. Angiotensin II promotes thoracic aortic dissections and ruptures in Col3a1 haploinsufficient mice. *Hypertension* 2013;62:203–208.

Ferré FC, Frank M, Gogly B, Golmard L, Naveau A, Chérifi H, emmerich J, Gaultier F, Berdal A, Jeunemaitre X, Fournier BPJ. Oral phenotype and scoring of vascular Ehlers-Danlos syndrome: a case-control study. *BMJ Open British Medical Journal Publishing Group*, 2012;2:e000705–e000705.

Fleenor BS, Seals DR, Zigler ML, Sindler AL. Superoxide-lowering therapy with TEMPOL reverses arterial dysfunction with aging in mice. *Aging Cell Blackwell Publishing Ltd*, 2012;11:269–276.

Fleenor BS, Sindler AL, Marvi NK, Howell KL, Zigler ML, Yoshizawa M, Seals DR. Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging. *Exp Gerontol* 2013;48:269–276.

Frank M. [Vascular Ehlers-Danlos syndrome]. *Rev Prat* 2009;59:459–461.

Frank M, Albuissou J, Ranque B, Golmard L, Mazzella J-M, Bal-Theoleyre L, Fauret A-L, Mirault T, Denarié N, Mousseaux E, Boutouyrie P, Fiessinger J-N, emmerich J, Messas E, Jeunemaitre X. The type of variants at the COL3A1 gene associates with the phenotype and severity of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Eur J Hum Genet* 2015a.

- Frank M, Molière D, Golmard L, Lenain E, Ong KT, Messas E, Emmerich J, Fiessinger JN, Jeunemaitre X. Complications du syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire dans le peripartum. *Journal des Maladies Vasculaires Journal des Maladies ...*, 2011;36:114–115.
- Frank M, Says J, Denarié N, Sapoval M, Messas E. Successful segmental thermal ablation of varicose saphenous veins in a patient with confirmed vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Phlebology SAGE Publications*, 2015b;:0268355515585048.
- Franzke C-W, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J Biol Chem* 2005;280:4005–4008.
- Freeman RK, Swegle J, Sise MJ. The surgical complications of Ehlers-Danlos syndrome. *Am Surg* 1996;62:869–873.
- Fuchs JR, Fishman SJ. Management of spontaneous colonic perforation in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *J Pediatr Surg* 2004;39:e1–3.
- Garrone R. [Ultrastructural aspects of collagen]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1986;44:162–167.
- Germain D. [Ehlers-Danlos syndromes. Clinical, genetic and molecular aspects]. *Ann Dermatol Venereol* 1995;122:187–204.
- Germain DP. Clinical and genetic features of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Ann Vasc Surg* 2002;16:391–397.
- Germain DP. Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:32.
- Gilchrist D, Schwarze U, Shields K, MacLaren L, Bridge PJ, Byers PH. Large kindred with Ehlers-Danlos syndrome type IV due to a point mutation (G571S) in the COL3A1 gene of type III procollagen: low risk of pregnancy complications and unexpected longevity in some affected relatives. *Am J Med Genet* 1999;82:305–311.
- Giunta C, Steinmann B. Characterization of 11 new mutations in COL3A1 of individuals with Ehlers-Danlos syndrome type IV: preliminary comparison of RNase cleavage, EMC and DHPLC assays. *Hum Mutat* 2000;16:176–177.
- Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res* 2010;339:247–257.
- Gori JL, Hsu PD, Maeder ML, Shen S, Welstead GG, Bumcrot D. Delivery and Specificity of CRISPR-Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. *Hum Gene Ther Mary Ann Liebert, Inc.* 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2015;26:443–451.
- Gómez Sugrañes JR, Luengo Rodríguez de Ledesma L, Castellote Caixal M, Ros López S, Mayo Artal E. [Perforation of small intestine diverticulum in Ehlers-Danlos syndrome]. *Rev Esp Enferm Dig* 1995;87:53–55.
- Grotenhuis HB, Ottenkamp J, Westenberg JJM, Bax JJ, Kroft LJM, De Roos A. Reduced aortic elasticity and dilatation are associated with aortic regurgitation and left ventricular hypertrophy in nonstenotic bicuspid aortic valve patients. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1660–1665.

- Habib K, Memon MA, Reid DA, Fairbrother BJ. Spontaneous common iliac arteries rupture in Ehlers-Danlos syndrome type IV: report of two cases and review of the literature. *Ann R Coll Surg Engl* 2001;83:96–104.
- Hardy CJ, Bolster BD, McVeigh ER, Adams WJ, Zerhouni EA. A one-dimensional velocity technique for NMR measurement of aortic distensibility. *Magn Reson Med NIH Public Access*, 1994;31:513–520.
- Harris SC, Slater DN, Austin CA. Fatal splenic rupture in Ehlers-Danlos syndrome. *Postgrad Med J* 1985;61:259–260.
- Herman TE, McAlister WH. Cavitory pulmonary lesions in type IV Ehlers-Danlos syndrome. *Pediatr Radiol* 1994;24:263–265.
- Hermeling E, Reesink KD, Reneman RS, Hoeks AP. Confluence of incident and reflected waves interferes with systolic foot detection of the carotid artery distension waveform. *Journal of Hypertension* 2008;26:2374–2380.
- Hermeling E, Reesink KD, Reneman RS, Hoeks APG. Measurement of local pulse wave velocity: effects of signal processing on precision. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2007;33:774–781.
- Hoeks AP, Brands PJ, Smeets FA, Reneman RS. Assessment of the distensibility of superficial arteries. *Ultrasound in Medicine & Biology* 1990;16:121–128.
- Hoeks AP, Brands PJ, Willigers JM, Reneman RS. Non-invasive measurement of mechanical properties of arteries in health and disease. *Proc Inst Mech Eng H* 1999;213:195–202.
- Holbrook KA, Byers PH. Ultrastructural characteristics of the skin in a form of the Ehlers-Danlos syndrome type IV. Storage in the rough endoplasmic reticulum. *Lab Invest* 1981;44:342–350.
- Iida Y, Obitsu Y, Komai H, Shigematsu H. Successful coil embolization for rupture of the subclavian artery associated with Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Journal of Vascular Surgery* 2009;50:1191–1195.
- Jaffe AS, Geltman EM, Rodey GE, Uitto J. Mitral valve prolapse: a consistent manifestation of type IV Ehlers-Danlos syndrome. The pathogenetic role of the abnormal production of type III collagen. *Circulation* 1981;64:121–125.
- Jiang S, Gao C, Ren C, Zhang T. Successful surgical treatment of intramural aortoatrial fistula, severe aortic regurgitation, mitral prolapse, and tricuspid insufficiency in a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Heart Surg Forum* 2012;15:E156–7.
- Karkos CD, Prasad V, Mukhopadhyay U, Thomson GJ, Hearn AR. Rupture of the abdominal aorta in patients with Ehlers-Danlos syndrome. *Ann Vasc Surg* 2000;14:274–277.
- Kawabata Y, Watanabe A, Yamaguchi S, Aoshima M, Shiraki A, Hatamochi A, Kawamura T, Uchiyama T, Watanabe A, Fukuda Y. Pleuropulmonary pathology of vascular Ehlers-Danlos syndrome: spontaneous laceration, haematoma and fibrous nodules. *Histopathology* 2010;56:944–950.
- Khair AW, O'Brien A, Gibbs JS, Parker KH. Determination of wave speed and wave separation in

the arteries. *Journal of Biomechanics* 2001;34:1145–1155.

Kuivaniemi H, Prockop DJ, Wu Y, Madhatheri SL, Kleinert C, Earley JJ, Jokinen A, Stolle C, Majamaa K, Myllylä VV. Exclusion of mutations in the gene for type III collagen (COL3A1) as a common cause of intracranial aneurysms or cervical artery dissections: results from sequence analysis of the coding sequences of type III collagen from 55 unrelated patients. *Neurology* 1993;43:2652–2658.

Kymionis GD, Mikropoulos DG, Portaliou DM, Voudouragkaki IC, Kozobolis VP, Konstas AGP. An overview of corneal collagen cross-linking (CXL). *Adv Ther* 2013;30:858–869.

LAPAYOWKER MS. Cutis hyperelastica, the Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1960;84:232–234.

Laurent S. Defining vascular aging and cardiovascular risk. *Journal of Hypertension* 2012;30 Suppl:S3–8.

Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001;37:1236–1241.

Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H, European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European Heart Journal* 2006;27:2588–2605.

Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano A-I, Gautier I, Laloux B, Boutouyrie P. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke* 2003;34:1203–1206.

Lee B, D'Alessio M, Vissing H, Ramirez F, Steinmann B, Superti-Furga A. Characterization of a large deletion associated with a polymorphic block of repeated dinucleotides in the type III procollagen gene (COL3A1) of a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet Elsevier*, 1991;48:511–517.

Leistriz DF, Pepin MG, Schwarze U, Byers PH. COL3A1 haploinsufficiency results in a variety of Ehlers-Danlos syndrome type IV with delayed onset of complications and longer life expectancy. *Genet Med* 2011;13:717–722.

Li Y, Borlotti A, Hickson SS, McEniery CM, Wilkinson IB, Khir AW. Using magnetic resonance imaging measurements for the determination of local wave speed and arrival time of reflected waves in human ascending aorta. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2010;2010:5153–5156.

Lind J, Wallenburg HCS. Pregnancy and the Ehlers-Danlos syndrome: a retrospective study in a Dutch population. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002;81:293–300.

Liu G-H, Qu J, Suzuki K, Nivet E, Li M, Montserrat N, Yi F, Xu X, Ruiz S, Zhang W, Wagner U, Kim A, Ren B, Li Y, Goebel A, Kim J, Soligalla RD, Dubova I, Thompson J, III JY, Esteban CR, Sancho-Martinez I, Belmonte JCI. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature* Nature Publishing Group, 2012;491:603–607.

- Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1852–1856.
- Lurie S, Manor M, Hagay ZJ. The threat of type IV Ehlers-Danlos syndrome on maternal well-being during pregnancy: early delivery may make the difference. *J Obstet Gynaecol* 1998;18:245–248.
- Lynch HT, Larsen AL, Wilson R, Magnuson CL. Ehlers-Danlos syndrome and “congenital” arteriovenous fistulae. A clinicopathologic study of a family. *JAMA* 1965;194:1011–1014.
- Martin JJ, Hausser I, Lyrer P, Busse O, Schwarz R, Schneider R, Brandt T, Kloss M, Schwaninger M, Engelter S, Grond-Ginsbach C. Familial cervical artery dissections: clinical, morphologic, and genetic studies. *Stroke* Lippincott Williams & Wilkins, 2006;37:2924–2929.
- Massé R, Cessou L, Duvillier J. [Spontaneous gastric rupture in a young woman suffering from Ehlers-Danlos syndrome]. *Ann Med Leg Criminol Police Sci Toxicol* 1967;47:706–709.
- Masuno M, Watanabe A, Naing BT, Shimada T, Fujimoto W, Ninomiya S, Ueda Y, Kadota K, Kotaka T, Kondo E, Yamanouchi Y, Inoue M, Ouchi K, Kuroki Y. Ehlers-Danlos syndrome, vascular type: a novel missense mutation in the COL3A1 gene. *Congenit Anom (Kyoto)* 2012;52:207–210.
- Mattar SG, Kumar AG, Lumsden AB. Vascular complications in Ehlers-Danlos syndrome. *Am Surg* 1994;60:827–831.
- Mayne R, Brewton RG, Mayne PM, Baker JR. Isolation and characterization of the chains of type V/type XI collagen present in bovine vitreous. *J Biol Chem* 1993;268:9381–9386.
- McFarland W, Fuller DE. Mortality in Ehlers-Danlos syndrome due to spontaneous rupture of large arteries. *N Engl J Med* 1964;271:1309–1310.
- McKusick VA. *Heritable Disorders of Connective Tissue*, St. Louis: CV Mosby Co. ... and *Abnormalities of Muscles and Connective Tissue*, 1966.
- Meaume S, Rudnichi A, Lynch A, Bussy C, Sebban C, Benetos A, Safar ME. Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular disease in subjects over 70 years old. *Journal of Hypertension* 2001;19:871–877.
- Meinders JM, Kornet L, Brands PJ, Hoeks AP. Assessment of local pulse wave velocity in arteries using 2D distension waveforms. *Ultrasonic Imaging* 2001;23:199–215.
- Messas E, Jeunemaitre X, emmerich J. Les “élastopathies.” *Neurologies* 2009;12:449–460.
- Metafratzi ZM, Efremidis SC, Skopelitou AS, De Roos A. The clinical significance of aortic compliance and its assessment with magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson* 2002;4:481–491.
- Millasseau SC, Stewart AD, Patel SJ, Redwood SR, Chowienczyk PJ. Evaluation of carotid-femoral pulse wave velocity: influence of timing algorithm and heart rate. *Hypertension* 2005;45:222–226.

- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* Nature Publishing Group, 2011;29:143–148.
- Mirault T, Frank M, Pernot M, Couade M, Tanter M, Niarra R, Azizi M, Albuissou J, Jeunemaitre X, Messas E. Lack of systolic arterial stiffening in vascular Ehlers-Danlos syndrome. *European Heart Journal* 2013;34:4540.
- Mirault T, Pernot M, Frank M, Couade M, Niarra R, azizi M, emmerich J, Jeunemaitre X, Fink M, Tanter M, Messas E. Carotid stiffness change over the cardiac cycle by ultrafast ultrasound imaging in healthy volunteers and vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Journal of Hypertension* 2015;33:1890–1896.
- Miyaoka Y, Chan AH, Judge LM, Yoo J, Huang M, Nguyen TD, Lizarraga PP, So P-L, Conklin BR. Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection. *Nat Methods* 2014.
- Mizuno K, Boudko S, Engel J, Bächinger HP. Vascular Ehlers-Danlos syndrome mutations in type III collagen differently stall the triple helical folding. *Journal of Biological Chemistry* 2013;288:19166–19176.
- Mohiaddin RH, Underwood SR, Bogren HG, Firmin DN, Klipstein RH, Rees RS, Longmore DB. Regional aortic compliance studied by magnetic resonance imaging: the effects of age, training, and coronary artery disease. *Br Heart J* 1989;62:90–96.
- Montaldo G, Tanter M, Bercoff J, Benech N, Fink M. Coherent plane-wave compounding for very high frame rate ultrasonography and transient elastography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2009;56:489–506.
- Mories A. Ehlers-Danlos syndrome with a report of a fatal case. *Scott Med J* 1960;5:269–272.
- Muller GA, Hansen U, Xu Z, Griswold B, Talan MI, McDonnell NB, Briest W. Allele-specific siRNA knockdown as a personalized treatment strategy for vascular Ehlers-Danlos syndrome in human fibroblasts. *The FASEB Journal* 2012;26:668–677.
- Musunuru K. Genome editing of human pluripotent stem cells to generate human cellular disease models. *Disease Models & Mechanisms* 2013;6:896–904.
- Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol* 2003;22:15–24.
- Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 2001;33:7–21.
- Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 2004;20:33–43.
- Naclerio S, Bassetta P, Sorgente F, Orlando C, Polito D, Mattei A, Fava A, Vitalone V. [The Ehlers-Danlos syndrome and its surgical implications]. *Clin Ter* 1990;132:235–248.
- Naidu SG, Chong BW, Huettl EA, Stone WM. Percutaneous embolization of a lumbar pseudoaneurysm in a patient with type IV Ehlers-Danlos syndrome. *J Vasc Surg*

2007;46:1036–1038.

Najjar SS, Scuteri A, Shetty V, Wright JG, Muller DC, Fleg JL, Spurgeon HP, Ferrucci L, Lakatta EG. Pulse wave velocity is an independent predictor of the longitudinal increase in systolic blood pressure and of incident hypertension in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1377–1383.

Ng KL, Cheong WK. Surgical pitfalls in patients with Ehlers-Danlos type IV: a case of spontaneous sigmoid perforation in a 17-year-old male. *Asian J Surg* 2011;34:143–145.

Nishioka T, Eustace A, West C. Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment. *Cell Struct Funct* 2012;37:75–80.

North KN, Whiteman DA, Pepin MG, Byers PH. Cerebrovascular complications in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Ann Neurol* 1995;38:960–964.

Nuytinck L, Narcisi P, Nicholls A, Renard JP, Pope FM, de Paepe A. Detection and characterisation of an overmodified type III collagen by analysis of non-cutaneous connective tissues in a patient with Ehlers-Danlos syndrome IV. *J Med Genet* 1992;29:375–380.

O'Rourke MF, Pauca A, Jiang X-J. Pulse wave analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:507–522.

Oderich GS, Panneton JM, Bower TC, Lindor NM, Cherry KJ, Noel AA, Kalra M, Sullivan T, Gloviczki P. The spectrum, management and clinical outcome of Ehlers-Danlos syndrome type IV: a 30-year experience. *J Vasc Surg* 2005;42:98–106.

Okada T, Frank M, Pellerin O, Primio MD, Angelopoulos G, Boughenou M-F, Pagny J-Y, Messas E, Sapoval M. Embolization of life-threatening arterial rupture in patients with vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2014;37:77–84.

Ong K-T, Perdu J, De Backer J, Bozec E, Collignon P, emmerich J, Fauret A-L, Fiessinger J-N, Germain DP, Georgesco G. Effect of celiprolol on prevention of cardiovascular events in vascular Ehlers-Danlos syndrome: a prospective randomised, open, blinded-endpoints trial. *The Lancet Elsevier*, 2010;376:1476–1484.

Ong K-T, Plauchu H, Peyrol S, Roux E, Errazuriz E, Khau Van Kien P, Arbeille B, Gaulier A, Georgesco G, Collignon P, Germain DP, Gaveau M-N, Perdu J, Laurent S, Bruneval P, Boutouyrie P. Ultrastructural scoring of skin biopsies for diagnosis of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Virchows Arch Springer-Verlag*, 2012;460:637–649.

Oost JVD. New Tool for Genome Surgery. *Science* 2013;339:768–770.

Paini A, Boutouyrie P, Calvet D, Tropeano A-I, Laloux B, Laurent S. Carotid and aortic stiffness: determinants of discrepancies. *Hypertension* 2006;47:371–376.

Parapia LA, Jackson C. Ehlers-Danlos syndrome--a historical review. *Br J Haematol* 2008;141:32–35.

Parker KH, Jones CJ, Dawson JR, Gibson DG. What stops the flow of blood from the heart? *Heart Vessels Springer-Verlag*, 1988;4:241–245.

- Pein von F, Välikilä M, Schwarz R, Morcher M, Klima B, Grau A, Ala-Kokko L, Hausser I, Brandt T, Grond-Ginsbach C. Analysis of the COL3A1 gene in patients with spontaneous cervical artery dissections. *J Neurol Steinkopff-Verlag*, 2002;249:862–866.
- Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers PH. Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome type IV, the vascular type. *N Engl J Med* 2000;342:673–680.
- Pepin MG, Schwarze U, Rice KM, Liu M, Leistriz D, Byers PH. Survival is affected by mutation type and molecular mechanism in vascular Ehlers-Danlos syndrome (EDS type IV). *Genet Med* 2014;16:881–888.
- Perdu J, Boutouyrie P, Lahlou-Laforêt K, Khau Van Kien P, Denarié N, Mousseaux E, Sapoval M, Julia P, Zinzindohoué F, Touraine P, Dumez Y, Trystram D, Vignal-Clermont C, Gimenez-Roqueplo A-P, Jeunemaitre X, Fiessinger J-N. [Vascular Ehlers-Danlos syndrome]. *Presse Med* 2006;35:1864–1875.
- Pernot M, Fujikura K, Fung-Kee-Fung SD, Konofagou EE. ECG-gated, mechanical and electromechanical wave imaging of cardiovascular tissues in vivo. *Ultrasound in Medicine & Biology* 2007;33:1075–1085.
- Persikov AV, Ramshaw JAM, Kirkpatrick A, Brodsky B. Electrostatic interactions involving lysine make major contributions to collagen triple-helix stability. *Biochemistry* 2005;44:1414–1422.
- Pflumio F, Andrès E, Dervaux T, Muller M, Ubrich M, Geisler F. [Ehlers-Danlos syndrome disclosed by an intramural hematoma of the duodenum]. *Ann Med Interne (Paris)* 2000;151:320–321.
- Pope FM, Martin GR, Lichtenstein JR, Penttinen R, Gerson B, Rowe DW, McKusick VA. Patients with Ehlers-Danlos syndrome type IV lack type III collagen. *Proc Natl Acad Sci USA National Academy of Sciences*, 1975;72:1314–1316.
- Pope FM, Narcisi P, Nicholls AC, Germaine D, Pals G, Richards AJ. COL3A1 mutations cause variable clinical phenotypes including acrogeria and vascular rupture. *Br J Dermatol* 1996;135:163–181.
- Porteus MH, Fischer A. Engineering the immune system to cure genetic diseases, HIV, and cancer. *2012;24:576–579*.
- Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J, Gerard GF. Mutation detection using Surveyor nuclease. *BioTechniques* 2004;36:702–707.
- Rajzer MW, Wojciechowska W, Klocek M, Palka I, Brzozowska-Kiszka M, Kawecka-Jaszcz K. Comparison of aortic pulse wave velocity measured by three techniques: Complior, SphygmoCor and Arteriograph. *Journal of Hypertension* 2008;26:2001–2007.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013;8:2281–2308.
- Raval M, Lee CJ, Phade S, Riaz A, Eskandari M, Rodriguez H. Covered stent use after subclavian artery and vein injuries in the setting of vascular Ehlers-Danlos. *Journal of Vascular Surgery* 2012;55:542–544.

- Redheuil A, Yu W-C, Wu CO, Mousseaux E, de Cesare A, Yan R, Kachenoura N, Bluemke D, Lima JAC. Reduced ascending aortic strain and distensibility: earliest manifestations of vascular aging in humans. *Hypertension* 2010;55:319–326.
- Reference Values for Arterial Stiffness' Collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *European Heart Journal* 2010;31:2338–2350.
- Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, Schöndorf DC, Wagner L, Glatza M, Höing S, Hargus G, Heck SA, Dhingra A, Wu G, Müller S, Brockmann K, Kluba T, Maisel M, Krüger R, Berg D, Tsytsyura Y, Thiel CS, Psathaki O-E, Klingauf J, Kuhlmann T, Klewin M, Müller H, Gasser T, Schöler HR, Sternecker J. Genetic Correction of a LRRK2 Mutation in Human iPSCs Links Parkinsonian Neurodegeneration to ERK-Dependent Changes in Gene Expression. *Cell stem cell* 2013;12:354–367.
- Reis ED, Martinet OD, Mosimann F. Spontaneous rupture of the oesophagus in an adolescent with type IV Ehlers-Danlos syndrome. *Ehlers-Danlos and spontaneous oesophageal rupture. Eur J Surg* 1998;164:313–316.
- Reneman RS, van Merode T, Brands PJ, Hoeks AP. Inhomogeneities in arterial wall properties under normal and pathological conditions. *J Hypertens Suppl* 1992;10:S35–9.
- Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004978–a004978.
- Ricard-Blum S, Ballut L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:674–697.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F, Van der Rest M. *Unconventional Collagens : Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI and XIX*. Oxford University Press. Oxford, UK: Oxford University Press, 2000.
- Rietzschel ER, De Buyzere ML, Bekaert S, Segers P, De Bacquer D, Cooman L, Van Damme P, Cassiman P, Langlois M, van Oostveldt P, Verdonck P, De Backer G, Gillebert TC, Asklepios Investigators. Rationale, design, methods and baseline characteristics of the Asklepios Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil SAGE Publications*, 2007;14:179–191.
- Roach MR, Burton AC. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Can J Biochem Physiol* 1957;35:681–690.
- Rogers WJ, Hu YL, Coast D, Vido DA, Kramer CM, Pyeritz RE, Reichek N. Age-associated changes in regional aortic pulse wave velocity. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1123–1129.
- Rudd NL, Nimrod C, Holbrook KA, Byers PH. Pregnancy complications in type IV Ehlers-Danlos Syndrome. *Lancet* 1983;1:50–53.
- Sack G. Status dysvascularis; ein Fall von besonderer Zerreißlichkeit der Blut Gefäße. *Dtsch Arch Klin Med*, 1936.
- Safar ME, Henry O, Meaume S. Aortic pulse wave velocity: an independent marker of cardiovascular risk. *Am J Geriatr Cardiol* 2002;11:295–298.
- Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. A transcription activator-like

- effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc* 2012;7:171–192.
- Sato T, Sakuma T, Yokonishi T, Katagiri K, Kamimura S, Ogonuki N, Ogura A, Yamamoto T, Ogawa T. Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports* 2015;5:75–82.
- Schievink WI. Cerebrovascular Involvement in Ehlers-Danlos Syndrome. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2004;6:231–236.
- Schievink WI, Limburg M, Oorthuys JW, Fleury P, Pope FM. Cerebrovascular disease in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Stroke* 1990;21:626–632.
- Schwarze U, Goldstein JA, Byers PH. Splicing defects in the COL3A1 gene: marked preference for 5' (donor) splice-site mutations in patients with exon-skipping mutations and Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet* 1997;61:1276–1286.
- Schwarze U, Schievink WI, Petty E, Jaff MR, Babovic-Vuksanovic D, Cherry KJ, Pepin M, Byers PH. Haploinsufficiency for one COL3A1 allele of type III procollagen results in a phenotype similar to the vascular form of Ehlers-Danlos syndrome, Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Am J Hum Genet* 2001;69:989–1001.
- Selim B, Lane CR, Rubinowitz AN, Siner JM. Spontaneous hemothorax and recurrent hemoptysis in a 26-year-old man with skin lesions. *Chest* 2010;137:480–483.
- Sentongo TA, Lichtenstein G, Nathanson K, Kaplan P, Maller E. Intestinal perforation in Ehlers-Danlos syndrome after enema treatment for constipation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27:599–602.
- Shalhub S, Black JH, Cecchi AC, Xu Z, Griswold BF, Safi HJ, Milewicz DM, McDonnell NB. Molecular diagnosis in vascular Ehlers-Danlos syndrome predicts pattern of arterial involvement and outcomes. *Journal of Vascular Surgery* 2014;60:160–169.
- Shankar S, Shirley E, Burrows NP. Absence of inferior labial or lingual frenula is not a useful clinical marker for Ehlers-Danlos syndrome in the UK. *J Eur Acad Dermatol Venereol* Blackwell Publishing Ltd, 2006;20:1383–1384.
- Shaw LM, Olsen BR. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* 1991;16:191–194.
- Shi EC, Bohane TD, Bowring AC. Prophylactic colectomy in Ehlers-Danlos syndrome with colonic ectasia. *J Pediatr Surg* 1989;24:1187–1188.
- Slingenberg EJ. Complications during intravascular diagnostic manipulations in the Ehlers-Danlos syndrome. *Neth J Surg* 1980;32:56–58.
- Smith LB, Hadoke PWF, Dyer E, Denvir MA, Brownstein D, Miller E, Nelson N, Wells S, Cheeseman M, Greenfield A. Haploinsufficiency of the murine Col3a1 locus causes aortic dissection: a novel model of the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. *Cardiovasc Res* 2011;90:182–190.
- Smith LT, Schwarze U, Goldstein J, Byers PH. Mutations in the COL3A1 gene result in the Ehlers-Danlos syndrome type IV and alterations in the size and distribution of the major

- collagen fibrils of the dermis. *J Invest Dermatol* 1997;108:241–247.
- Solomon JA, Abrams L, Lichtenstein GR. GI manifestations of Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2282–2288.
- Soucy KG, Ryoo S, Benjo A, Lim HK, Gupta G, Sohi JS, Elser J, Aon MA, Nyhan D, Shoukas AA, Berkowitz DE. Impaired shear stress-induced nitric oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular stiffness. *J Appl Physiol* 2006;101:1751–1759.
- Sprink T, Metje J, Hartung F. Plant genome editing by novel tools: TALEN and other sequence specific nucleases. *Curr Opin Biotechnol* 2015;32:47–53.
- Steinmann B, Royce PM, Superti-Furga A. The Ehlers-Danlos Syndrome. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders Wiley*, 2003. pp. 431–523.
- Steppan J, Tran H, Benjo AM, Pellakuru L, Barodka V, Ryoo S, Nyhan SM, Lussman C, Gupta G, White AR, Daher JP, Shoukas AA, Levine BD, Berkowitz DE. Alagebrium in combination with exercise ameliorates age-associated ventricular and vascular stiffness. *Exp Gerontol* 2012;47:565–572.
- Stillman AE, Painter R, Hollister DW. Ehlers-Danlos syndrome type IV: diagnosis and therapy of associated bowel perforation. *Am J Gastroenterol* 1991;86:360–362.
- Superti-Furga A, Gugler E, Gitzelmann R, Steinmann B. Ehlers-Danlos syndrome type IV: a multi-exon deletion in one of the two COL3A1 alleles affecting structure, stability, and processing of type III procollagen. *J Biol Chem* 1988;263:6226–6232.
- Superti-Furga A, Steinmann B. Impaired secretion of type III procollagen in Ehlers-Danlos syndrome type IV fibroblasts: correction of the defect by incubation at reduced temperature and demonstration of subtle alterations in the triple-helical region of the molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;150:140–147.
- Sutton-Tyrrell K, Najjar SS, Boudreau RM, Venkitachalam L, Kupelian V, Simonsick EM, Havlik R, Lakatta EG, Spurgeon H, Kritchevsky S, Pahor M, Bauer D, Newman A, Health ABC Study. Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well-functioning older adults. *Circulation* 2005;111:3384–3390.
- Sykes EM. Colon perforation in Ehlers-Danlos syndrome. Report of two cases and review of the literature. *Am J Surg* 1984;147:410–413.
- Tae H-J, Marshall S, Zhang J, Wang M, Briest W, Talan MI. Chronic treatment with a broad-spectrum metalloproteinase inhibitor, doxycycline, prevents the development of spontaneous aortic lesions in a mouse model of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;343:246–251.
- Tanter M, Fink M. Ultrafast imaging in biomedical ultrasound. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2014;61:102–119.
- Tonnessen BH, Sternbergh WC, Mannava K, Money SR. Endovascular repair of an iliac artery aneurysm in a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV. *J Vasc Surg* 2007;45:177–179.

- Touboul D, Gennisson J-L, Nguyen T-M, Robinet A, Roberts CJ, Tanter M, Grenier N. Supersonic shear wave elastography for the in vivo evaluation of transepithelial corneal collagen cross-linking. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:1976–1984.
- Tromp G, de Paepe A, Nuytinck L, Madhatheri S, Kuivaniemi H. Substitution of valine for glycine 793 in type III procollagen in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Hum Mutat Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*, 1995;5:179–181.
- Tromp G, Kuivaniemi H, Shikata H, Prockop DJ. A single base mutation that substitutes serine for glycine 790 of the alpha 1 (III) chain of type III procollagen exposes an arginine and causes Ehlers-Danlos syndrome IV. *J Biol Chem* 1989a;264:1349–1352.
- Tromp G, Kuivaniemi H, Stolle C, Pope FM, Prockop DJ. Single base mutation in the type III procollagen gene that converts the codon for glycine 883 to aspartate in a mild variant of Ehlers-Danlos syndrome IV. *J Biol Chem* 1989b;264:19313–19317.
- Valton J, Cabaniols J-P, Galetto R, Delacote F, Duhamel M, Paris S, Blanchard DA, Lebuhotel C, Thomas S, Moriceau S, Demirdjian R, Letort G, Jacquet A, Gariboldi A, Rolland S, Daboussi F, Juillerat A, Bertonati C, Duclert A, Duchateau P. Efficient strategies for TALEN-mediated genome editing in mammalian cell lines. *Methods* 2014;69:151–170.
- van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, Filipovsky J, Huybrechts S, Mattace-Raso FUS, Protogerou AD, Schillaci G, Segers P, Vermeersch S, Weber T, Artery Society, European Society of Hypertension Working Group on Vascular Structure and Function, European Network for Noninvasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *Journal of Hypertension*. 2012. pp. 445–448.
- van den Berg JS, Limburg M, Kappelle LJ, Pals G, Arwert F, Westerveld A. The role of type III collagen in spontaneous cervical arterial dissections. *Ann Neurol Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*, 1998;43:494–498.
- Vissing H, D'Alessio M, Lee B, Ramirez F, Byers PH, Steinmann B, Superti-Furga A. Multiexon deletion in the procollagen III gene is associated with mild Ehlers-Danlos syndrome type IV. *J Biol Chem* 1991;266:5244–5248.
- Vogel BE, Doelz R, Kadler KE, Hojima Y, Engel J, Prockop DJ. A substitution of cysteine for glycine 748 of the alpha 1 chain produces a kink at this site in the procollagen I molecule and an altered N-proteinase cleavage site over 225 nm away. *J Biol Chem* 1988;263:19249–19255.
- Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 2009;89:957–989.
- Watanabe A, Kosho T, Wada T, Sakai N, Fujimoto M, Fukushima Y, Shimada T. Genetic aspects of the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome (vEDS, EDSIV) in Japan. *Circ J* 2007;71:261–265.
- Watanabe A, Shimada T. Vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. *J Nippon Med Sch* 2008;75:254–261.

- Watanabe A, Wada T, Tei K, Hata R, Fukushima Y, Shimada T. A Novel Gene Therapy Strategy for Vascular Ehlers-Danlos Syndrome by the Combination with RNAi Mediated Inhibition of a Mutant Allele and Transcriptional *Molecular Therapy* 2005;11:S240.
- Weber FP. Ehlers-Danlos Syndrome. *Proc R Soc Med Royal Society of Medicine Press*, 1936;30:30–31.
- Weis MA, Hudson DM, Kim L, Scott M, Wu JJ. Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly. *Journal of Biological ...* 2010.
- Wilkinson IB, McEniery CM, Schillaci G, Boutouyrie P, Segers P, Donald A, Chowienczyk PJ. ARTERY Society guidelines for validation of non-invasive haemodynamic measurement devices: Part 1, arterial pulse wave velocity. *Artery Res* 2010;4:34–40.
- Wolinsky H, Glagov S. Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media. *Circulation Research* 1964;14:400–413.
- Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circulation Research* 1967;20:99–111.
- Wordsworth P, Ogilvie D, Akhras F, Jackson G, Sykes B. Genetic segregation analysis of familial mitral valve prolapse shows no linkage to fibrillar collagen genes. *Br Heart J BMJ Group*, 1989;61:300–306.
- Wu J-J, Weis MA, Kim LS, Carter BG, Eyre DR. Differences in chain usage and cross-linking specificities of cartilage type V/XI collagen isoforms with age and tissue. *J Biol Chem* 2009;284:5539–5545.
- Wu Y, Kuivaniemi H, Tromp G, Strobel D, Romanic AM, Prockop DJ. Temperature sensitivity of aberrant RNA splicing with a mutation in the G+5 position of intron 37 of the gene for type III procollagen from a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Hum Mutat* 1993;2:28–36.
- Yoneda A, Okada K, Okubo H, Matsuo M, Kishikawa H, Naing BT, Watanabe A, Shimada T. Spontaneous colon perforations associated with a vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. *Case Rep Gastroenterol* 2014;8:175–181.
- Yost BA, Vogelsang JP, Lie JT. Fatal hemoptysis in Ehlers-Danlos syndrome. Old malady with a new curse. *Chest* 1995;107:1465–1467.
- Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2005;25:932–943.