

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

GENETIQUE

DES CARDIOPATHIES CONOTRONCALES FAMILIALES ET SPORADIQUES

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale De Chimie-Biologie
Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Génétique Moléculaire

présentée
et soutenue publiquement par

Cédric LE CAIGNEC

le 27 Avril 2004, devant le jury ci-dessous

Président du jury : Mr H. LE MAREC, Professeur, Université de Nantes

Rapporteurs : Mr C. FEREC, Professeur, Université de Brest
Mr P. BOUVAGNET, Maître de conférences universitaire-praticien
hospitalier, HDR, Université de Lyon

Examineurs : Mr J.P. MOISAN, Professeur, Institut de Génétique Nantes Atlantique
Mr J.J. SCHOTT, Chargé de recherche 1 INSERM, HDR, Nantes
Mr J.M. RIVAL, Docteur, Service de Génétique Médicale, Nantes

Directeur de Thèse : Mr J.P. MOISAN, Professeur, Institut de Génétique Nantes Atlantique

Sommaire

Introduction générale	9
I. Introduction	11
I.1. Épidémiologie des malformations cardiaques	11
I.2. Éléments d'embryologie cardiaque	13
I.2.1. Formation du tube cardiaque primitif	13
I.2.2. Formation de la boucle cardiaque	16
I.2.3. Développement du conotruncus	17
I.2.4. Rôle des cellules de la crête neurale cardiaque	18
I.2.5. Les cardiopathies conotruncales : anomalie de développement du conotruncus	20
I.3. Aspects génétiques du développement cardiaque	23
I.3.1. Stades précoces de la différenciation cardiaque	23
I.3.2. Fusion des tubes cardiaques primitifs	24
I.3.3. Formation des cavités cardiaques	24
I.3.4. Formation de la boucle cardiaque	25
I.4. Stratégies d'identification de gènes	26
I.4.1. Anomalies chromosomiques, recherche de microdélétion par Hybridation <i>In Situ</i> en Fluorescence (FISH) et Hybridation Génomique Comparative (CGH) array	
I.4.2. Analyse de liaison génétique	28
I.4.3. Approche par gènes candidats	29
I.4.4. Étude d'association-liaison	30

I.5. Génétique des cardiopathies conotruncales chez l’Homme	33
I.5.1. Gènes identifiés à partir des formes syndromiques	33
I.5.1.1. Le syndrome d’Alagille et le gène <i>JAG1</i>	33
I.5.1.1.1. Données cliniques	33
I.5.1.1.2. Données génétiques	36
I.5.1.1.2.1. Clonage du gène <i>JAG1</i>	36
I.5.1.1.2.2. Mutations au sein de <i>JAG1</i>	37
I.5.1.1.2.3. Structure de la protéine JAG1	38
I.5.1.1.2.4. Expression de JAG1	38
I.5.1.1.2.5. Fonction de JAG1 dans la voie Notch	38
I.5.1.1.2.6. Gènes de la voie Notch impliqués en pathologie humaine	39
I.5.1.2. Le syndrome de Holt-Oram et le gène <i>TBX5</i>	41
I.5.1.2.1. Données cliniques	41
I.5.1.2.2. Données génétiques	41
I.5.1.3. Le syndrome 22q11.2 et le gène <i>TBX1</i>	42
I.5.1.3.1. Données cliniques	42
I.5.1.3.2. Données génétiques	43
I.5.2. Gènes identifiés à partir des formes non syndromiques	44
I.5.2.1. Malformations cardiaques et le gène <i>NKX2.5</i>	44
I.5.2.2. Malformations cardiaques et le gène <i>GATA4</i>	45
I.5.2.3. Transposition des gros vaisseaux et les gènes <i>ZIC3</i> et <i>CFC1</i>	46
I.5.2.4. Tétralogie de Fallot et le gène <i>ZFPM2/FOG2</i>	47

II. Résultats et Discussion	48
II.1. Etude des cardiopathies conotruncales familiales et sporadiques	48
II.1.1. Recrutement des patients	48
II.1.1.1. Critères d'inclusion des patients	48
II.1.1.2. Examens réalisés	49
II.1.2. Exploration des familles recrutées	50
II.1.2.1. Identification d'une nouvelle mutation C234Y au sein du gène <i>JAG1</i> grâce à l'étude de la famille B. (Annexe 2 : <i>Familial deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon caused by cysteine substitution in the first EGF-like domain of JAG1. 2002. Le Caignec C et coll. Am J Hum Genet 71 :180-186</i>).	
II.1.2.1.1. Présentation clinique de la famille B	50
II.1.2.1.2. Identification de la mutation C234Y	54
II.1.2.1.3. Arguments en faveur du caractère délétère de la mutation C234Y	57
II.1.2.1.4. Le gène <i>JAG1</i> et la surdité	59
II.1.2.1.5. Suivi clinique et biologique de la famille	61
II.1.2.1.6. Le syndrome d'Alagille et les anomalies rénales	61
II.1.2.2. Exploration des autres familles recrutées	63
II.1.2.2.1. Etude de la famille G.	63
II.1.2.2.2. Etude de la famille L.	64
II.1.2.2.3. Etude de la famille T.	65
II.1.3. Exploration des cas sporadiques	66
II.2. Recrutement de fœtus avec plusieurs malformations dont une malformation cardiaque pour la plupart et exploration par la technique de CGH array	
II.2.1. Recrutement des fœtus	69
II.2.2. Identification de 9 remaniements chromosomiques	70
II.2.2.1. Fœtus FR... porteur d'une microdélétion 22q11.2	70
II.2.2.2. Fœtus BR... porteur d'une délétion 15q terminale	71
II.2.2.3. Fœtus CA... porteur d'une délétion 6q terminale	72
II.2.2.4. Fœtus LA... porteur d'une délétion 16q interstitielle	74
II.2.2.5. Fœtus PA... porteur d'une trisomie 21	74
II.2.2.6. Quatre fœtus avec duplication 10q terminale	75
III. Synthèse et Conclusion	79
III.1. Stades précoces du développement cardiaque	79

III.2. Des programmes transcriptionnels différents selon la région cardiaque	80
III.3. Le champ cardiaque secondaire	82
III.4. Contribution des cellules des crêtes neurales	83
IV. Références bibliographiques	86
V. Annexes	97
Annexe 1.	Projet validé par le CCPPRB portant sur l'étude des malformations cardiaques conotruncales familiales et sporadiques
Annexe 2.	Publication : Familial deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon caused by cysteine substitution in the first EGF-like domain of JAG1. 2002. Le Caignec C et coll. <i>Am J Hum Genet</i> 71 :180-186
Annexe 3.	Projet validé par le comité scientifique du CHU de Nantes portant sur l'étude par technique de CGH array des anomalies génétiques observées chez des fœtus polymalformés
Annexe 4.	Autres articles publiés ou sous presse

Index des figures et tableaux

- Figure 1** Rapport de vraisemblance, en fonction du nombre de loci, appliqué aux tétralopies de Fallot
- Figure 2** Vue dorsale et section transversale d'un embryon au stade présomitique (environ 18 jours) après résection de l'amnios
- Figure 3** Transformation des amas cellulaires angioformateurs en deux tubes cardiaques puis fusion sur la ligne médiane pour former le tube cardiaque primitif
- Figure 4** Tube cardiaque primitif rectiligne
- Figure 5** Courbure du tube cardiaque primitif
- Figure 6** Représentation schématique de la migration des cellules de la crête neurale cardiaque des rhombomères 6-8 à travers les arcs pharyngés 3, 4 et 6
- Figure 7** Représentation schématique du cœur normal et des principales cardiopathies conotruncales
- Figure 8** Image de gauche représentative d'un embryotoxon postérieur visible en périphérie de la cornée et, à droite, image radiographique illustrant l'anomalie vertébrale évocatrice du syndrome d'Alagille : la vertèbre en aile de papillon (flèche)
- Figure 9** Pedigree représentatif de la famille B et présentation clinique des individus malades
- Figure 10** Audiogramme représentatif de la famille B
- Figure 11** Examen tomodensitométrique comparatif réalisé chez la patiente III-6 et chez un individu normal
- Figure 12** Pedigree de la famille B indiquant les haplotypes reconstitués grâce à 3 marqueurs polymorphes (*D20S115*, *D20S186* et *D20S112*) encadrant le gène *JAG1*
- Figure 13** Séquence d'une partie de l'exon 5 du gène *JAG1* indiquant la mutation G701A (C234Y) identifiée au sein de la famille B
- Figure 14** Schéma représentant la structure des protéines JAG1 humaine, Jag1 murine, Serrate et Delta de la Drosophile et la position des mutations faux sens identifiées dans les motifs EGF-like des protéines JAG1 humaine et Jag1 murine
- Figure 15** Alignement de la séquence d'acides aminés du premier motif EGF-like de la protéine JAG1 humaine avec les séquences correspondantes de protéines similaires
- Figure 16** Pedigree représentatif de la famille G
- Figure 17** Pedigree représentatif de la famille L
- Figure 18** Pedigree représentatif de la famille T
- Figure 19** Hybridation *in situ* en fluorescence réalisée grâce à une sonde couvrant *JAG1*
- Figure 20** Représentation schématique du chromosome 20 et la position des sondes utilisées
- Figure 21** Images de CGH array des 4 fœtus avec délétions et du fœtus trisomique 21
- Figure 22** Représentation schématique de la croissance des chambres cardiaques selon la théorie du ballonnement
- Figure 23** Schéma représentant le champ cardiaque secondaire à partir duquel des cellules colonisent la région des gros vaisseaux

Tableau 1 Comparaison des signes cliniques présentés par les individus atteints de la famille B. avec la fréquence des signes cliniques présentés par les patients atteints du syndrome d'Alagille

Tableau 2 Tableau récapitulatif précisant le type de cardiopathie, la localisation chromosomique, les clones délétés en fonction de la technique employée et les résultats obtenus après étude des parents des 9 anomalies identifiées parmi les 55 fœtus polymalformés étudiés

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AGS : Syndrome d'Alagille
BAC : Bacterial artificial chromosome
CAV : Canal atrio-ventriculaire
CGH array : Comparative genomic hybridization array
CIA : Communication interauriculaire
CIV : Communication interventriculaire
cM : Centimorgan
CoA : Coarctation de l'aorte
Cys : Cystéine
CR : Région riche en cystéine
DSL : domaine conservé dans les protéines Delta, Serrate et Lag2
E9 : 9^{ème} jour de vie embryonnaire
EGF : Epidermal growth factor
EP : Embryotoxon postérieur
FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence
HypoVG : Hypoplasie du ventricule gauche
IC : domaine intracellulaire
Kb : Kilobases
Mb : Mégabases
ND : Non disponible
PHRC : Projet hospitalier de recherche clinique
PPS : Sténose périphérique de l'artère pulmonaire
QMPSF : Quantitative multiplex PCR of small fluorescent fragments
R Ao Calc : Rétrécissement aortique calcifié
SA : Semaine d'aménorrhée
SP : Signal peptide
SVP : Sténose valvulaire pulmonaire
Tb vest : Troubles vestibulaires
TM : domaine transmembranaire
ToF : Tétralogie de Fallot
VDDI : Ventricule droit à double issue
YAC : Yeast artificial chromosome

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Jean-Jacques Schott. Ses précieux conseils et la qualité de son analyse scientifique m'ont été d'une grande aide tout au long de cette thèse.

J'aimerais exprimer mes remerciements chaleureux au Docteur Jean-Marie Rival avec qui j'ai travaillé ces trois dernières années au sein de l'unité de cytogénétique du service de génétique médicale, Nantes.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Claude Ferec, au Professeur Le Marec et au Docteur Patrice Bouvagnet qui ont accepté de consacrer du temps à l'examen et à la critique de ce travail, en tant que rapporteurs ou examinateurs.

Je tiens également à remercier les Docteurs Albert David du service de génétique médicale, Nantes, Michèle Lefèvre du service de pédiatrie, Nantes, et Sandrine Marlin du service d'ORL de l'Hôpital Armand Trousseau, Paris, qui ont permis le recrutement de patients mais également pour les discussions enrichissantes que nous avons eues. Je remercie le Professeur Vincent Esnault et le Docteur Angelo Testa du service de Néphrologie, Nantes, pour leur participation au travail sur les anomalies rénales dans le syndrome d'Alagille.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance au Professeur Jean-Paul Moisan pour m'avoir accueilli au sein du LEPA et mon amitié à toute l'équipe du LEPA, en particulier Sébastien Kury et Sylviana Chevalier, et de l'unité de cytogénétique, en particulier le Docteur Michelle Bocéno.

Je remercie amoureusement Morgane Le Foulgoc, ma fiancée, pour son soutien, sa patience et son aide au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Introduction générale

Le terme « maladies cardiovasculaires » englobe des anomalies très variées du cœur et des vaisseaux. Parmi ces pathologies, les malformations cardiaques congénitales occupent une place importante. Plusieurs millions d'enfants dans le monde en sont affectés, avec une sévérité variable. Beaucoup reste à faire, mais l'amélioration de la prise en charge médicale et chirurgicale a permis une réduction significative de la mortalité et de la morbidité d'une majorité d'enfants, y compris pour les malformations les plus sévères.

Le déterminisme de ces malformations est complexe. Des facteurs environnementaux associés à une prédisposition génétique expliquent la plupart des formes observées. Les facteurs génétiques étaient inconnus, il y a encore peu, mais de récents progrès ont conduit à l'identification des premiers gènes à l'origine de cardiopathies congénitales chez l'Homme. Ces nouveaux apports de la recherche sont importants à plusieurs niveaux. Au plan fondamental, ils représentent la première étape avant des études physiopathologiques qui permettront une meilleure compréhension du développement cardiaque normal et pathologique conduisant aux principales anomalies. Au plan clinique, ils sont essentiels aux soignants. Ils permettent de donner un meilleur conseil génétique aux parents d'enfants malades et, de plus en plus, aux patients eux-mêmes qui, opérés, souhaitent une descendance. On estime en effet qu'actuellement 85 % de ces enfants atteignent l'âge adulte.

Nous avons choisi de nous intéresser à un groupe de malformations cliniquement hétérogène, mais qui procède d'une même anomalie de développement : un défaut de la région du conotruncus. Ce travail de recherche visera donc plus particulièrement les malformations conotruncales. Dans la première partie de cette thèse, nous donnerons quelques éléments d'épidémiologie des malformations cardiaques congénitales puis de développement cardiaque au plan embryologique puis génétique. Le contrôle génétique du développement cardiaque est d'une extrême complexité. À titre d'exemple, plus de 150 modèles murins avec mutations induites présentent un développement cardiaque anormal. Ce chapitre ne prétend donc pas être exhaustif, mais centré sur les étapes clés à l'origine des cardiopathies conotruncales. Nous ferons ensuite le point sur les différents gènes impliqués dans les cardiopathies conotruncales isolées et syndromiques chez l'Homme. Il est possible de classer

ces malformations de nombreuses façons. Nous avons choisi de distinguer les malformations conotruncales isolées des formes dites syndromiques. Une forme syndromique est définie par l'association d'une malformation cardiaque à un ou plusieurs autres signes, entrant alors dans le cadre d'un syndrome.

Dans une seconde partie, nous détaillerons et discuterons les résultats obtenus dans le cadre de ce travail réalisé au sein du laboratoire d'Etude du Polymorphisme de l'ADN à la faculté de médecine de Nantes et du service de Génétique Médicale du centre hospitalo-universitaire de Nantes. Ce travail a consisté à recruter, grâce à un Projet Hospitalier de Recherche Clinique, des patients atteints de cardiopathies conotruncales familiales ou sporadiques afin de contribuer à l'identification des bases génétiques de ces malformations. L'étude d'une famille nantaise nous a permis de montrer qu'une mutation faux-sens au sein du gène *JAG1* pouvait conduire à une surdité mixte de sévérité variable associée à une malformation cardiaque et un embryotoxon postérieur. Nous avons ensuite réalisé un travail grâce à une technique novatrice, les puces à ADN ou CGH array (*Comparative Genomic Hybridization array*) sur une série de fœtus présentant plusieurs malformations dont une cardiopathie pour une majorité.

Enfin, je tenterai de faire une synthèse des connaissances portant sur les gènes majeurs impliqués dans les cardiopathies conotruncales et leurs interactions récemment décrites.

I.Introduction

I.1. Épidémiologie des malformations cardiaques

Les malformations cardiaques congénitales, dont la fréquence varie de 4 à 8 pour mille naissances vivantes, représentent une cause majeure de mortalité dans la première année de vie (Grabitz RG et coll. 1988 ; Fixler DE et coll. 1990 ; Ferencz C et coll. 1993). Au sein du large spectre de malformations, la prévalence de chaque forme est très variable. La communication interventriculaire membraneuse est l'anomalie la plus courante avec une prévalence de 9.87 pour 10 000. Les prévalences de la sténose valvulaire pulmonaire et de la coarctation de l'aorte sont respectivement de 3.78 et de 1.39 pour 10 000.

Les étiologies des malformations cardiaques peuvent être classées en quatre groupes :

- les facteurs tératogènes (alcool pendant la grossesse, infections virales telles que la rubéole...)
- les anomalies chromosomiques (trisomie 21, syndrome de Turner...)
- les formes monogéniques (syndrome de Marfan et sténose aortique supra-valvulaire, syndrome de Noonan et sténose de l'artère pulmonaire...)
- les formes multifactorielles, mode de transmission proposé dans la plupart des cas.

L'étiologie des formes multifactorielles est complexe et un terrain de prédisposition génétique associé à des facteurs environnementaux est invoqué. La plus grande étude réalisée à ce jour, the Baltimore-Washington Infant Study 1981-1989, a comparé les caractéristiques familiales, sociales et médicales de 4 390 enfants avec malformation cardiaque à un groupe contrôle de 3 572 enfants de la même région (Ferencz C et coll. 1997). L'étude indique que 3.1 % des germains ont également une malformation cardiaque. Parmi ces malformations, le taux de récurrence est le plus élevé pour la coarctation de l'aorte (6.3 %) et l'hypoplasie du cœur gauche (8.0 %). Une récente étude confirme l'agrégation familiale de certaines cardiopathies congénitales (Loffredo CA et coll. 2004). Dans cette étude, grâce à une évaluation plus fine par échocardiographie des apparentés, le taux de récurrence est estimé à 19.3 % pour les apparentés au premier degré d'un enfant atteint d'hypoplasie du cœur gauche, de 9.4 % en cas de coarctation de l'aorte et de 2.7 % en cas de transposition des gros

vaisseaux. Le taux de récurrence est également plus élevé chez les apparentés au troisième degré.

Un autre travail portant sur 727 patients avec malformation cardiaque sévère opérée avant 1970 a établi un risque de récurrence de 4.1 % chez les enfants de ces patients (Burn J et coll. 1998). Dans le cas des tétralogies de Fallot, l'analyse de ces données suggère une transmission polygénique faisant intervenir un petit nombre de gènes. Un modèle à trois gènes à effet multiplicatif semble le plus probable (Figure 1).

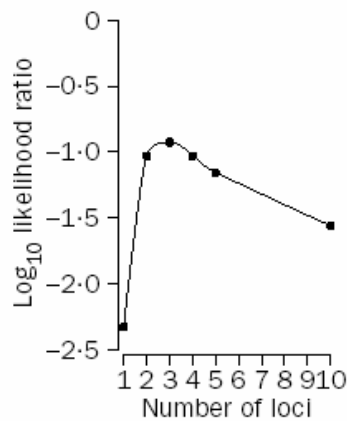


Figure 1 Rapport de vraisemblance en fonction du nombre de loci, appliqué aux tétralogies de Fallot. Le modèle à trois gènes est le plus probable (d'après Burn J et coll. 1998).

Estimer les parts respectives de la prédisposition génétique et des facteurs environnementaux est difficile. Récemment, de nombreux travaux contribuent à la compréhension des facteurs génétiques à l'origine des malformations cardiaques congénitales.

I.2. Éléments d'embryologie cardiaque

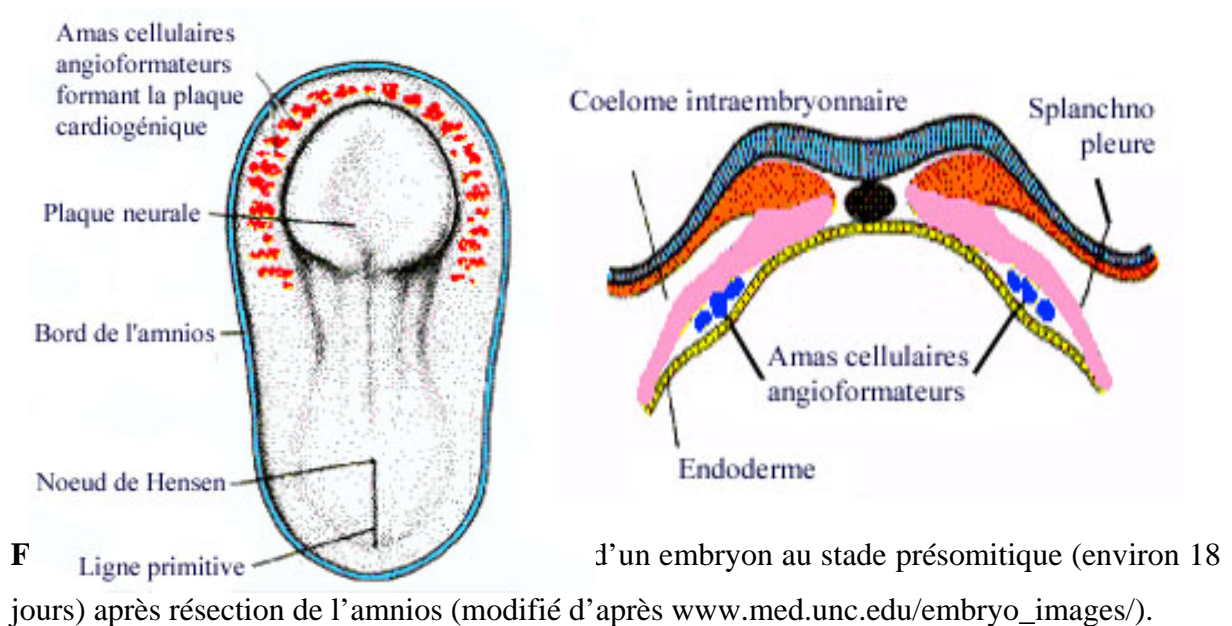
I.2.1. Formation du tube cardiaque primitif

La formation du tube cardiaque primitif et de la boucle cardiaque s'effectue du 15^{ème} jour au 23^{ème} jour de vie intra-utérine.

L'ébauche cardiaque n'apparaît qu'au début de la troisième semaine de vie de l'embryon. Pendant les deux premières semaines de vie intra-utérine, celui-ci ne possède ni cœur ni système circulatoire.

Le cœur dérive du mésoderme ou mésoblaste situé entre l'endoderme, feuillet ventral (entoblaste) et l'ectoderme, feuillet dorsal (ectoblaste). Les cellules du mésoderme se regroupent en amas cellulaires angioformateurs. Ces amas, qui trouvent leur origine de chaque

côté de la ligne primitive, migrent vers la partie céphalique de l'embryon et se rejoignent à l'avant de la plaque neurale pour former un plexus vasculaire en forme de fer à cheval : la plaque cardiogénique (Figure 2).



Secondairement, la plaque cardiogénique est clivée en deux couches, ventrale et dorsale, par la cavité coelomique. La couche dorsale ou somatopleure formera le péricarde. La plus grande partie de la couche ventrale ou splanchnopleure donnera naissance au myocarde. Le coelome intraembryonnaire formera, outre la cavité péricardique, les cavités pleurale et péritonéale. C'est à ce stade que se produit, en raison de la croissance rapide du tube neural (futur cerveau) et de la flexion céphalocaudale de l'embryon, un changement d'orientation de la plaque cardiogénique, qui se trouve en arrière et en position ventrale par rapport à l'ébauche du système nerveux central et à la membrane buccopharyngée. L'ébauche cardiaque, sous forme de deux plaques latérales, va s'invaginer pour acquérir une structure tubulaire (les tubes cardiaques primitifs) et être repoussée en position cervicale, puis thoracique. Dans le même temps, en raison de la croissance rapide des somites, le disque embryonnaire se replie aussi transversalement. Ce phénomène d'enroulement latéral de l'embryon permet le rapprochement des deux tubes cardiaques latéraux, qui vont ensuite fusionner sur la ligne médiane pour former le tube cardiaque primitif (Figure 3). Le processus de fusion entre les deux tubes cardiaques primitifs, situés à l'origine en dehors de la cavité péricardique, s'accompagne de l'invagination de cette dernière. Au point où se produit cette invagination, le tube cardiaque reste attaché temporairement à la paroi dorsale de la cavité péricardique par un feuillet mésoblastique, le mésocarde dorsal.

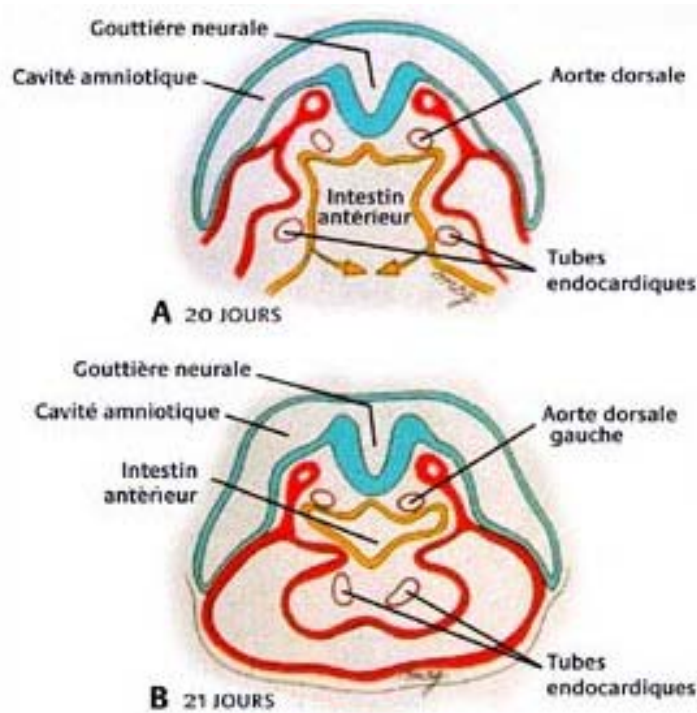


Figure 3 Transf
endocardiques pi

www.uvp5.univ-paris5.fr/campus-gyneco-obst/).

tubes cardiaques ou
que primitif (d'après

À l'origine, le tube cardiaque n'est constitué que d'un endothélium. Dès le 22^{ème} jour, une épaisse masse de mésoblaste vient se disposer autour du tube cardiaque et se différencie en deux couches : le myocarde et la gelée cardiaque. La gelée cardiaque est un épais manteau acellulaire sécrété par le myocarde en voie de développement contenant des glycosaminoglycanes et des protéines. Elle semble remplir un rôle mécanique essentiel lors des premiers moments de l'activité cardiaque. En effet, l'existence d'une zone amorphe, peu compressible, organisée en manchon glissé entre les premières cellules contractiles et le recouvrement interne de la lumière du tube cardiaque produit un effet démultiplicateur de la contraction des premières cellules myocardiques. La formation de tube cardiaque primitif est normalement achevée au 22^{ème} jour du vie intra-utérine. C'est à ce stade que les premières contractions cardiaques vont apparaître. Dès cet instant, le cœur va devoir se développer en même temps qu'assurer son rôle de pompe. À ce stade, le tube cardiaque primitif est encore rectiligne (Figure 4).

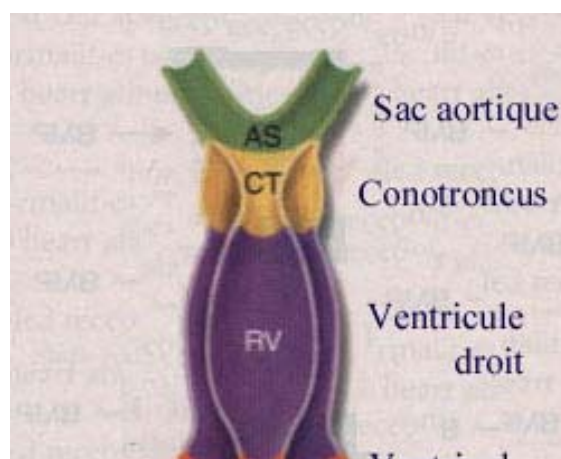


Figure 4 Tube cardiaque primitif rectiligne (modifié d'après Srivastava D et coll. 2000).

I.2.2. Formation de la boucle cardiaque

Au jour 23, le tube cardiaque primitif va s'allonger et s'incurver pour former une boucle à convexité droite (*D-Loop*), initialement en forme de C, puis, après la rupture du mésocarde dorsal, de forme sigmoïde en S. Le second stade de la boucle, ou complétion (*late looping*) implique la convergence des voies d'admission et d'éjection, nécessaire pour que l'alignement se fasse de façon correcte. Lorsque la boucle est complétée, le cœur comporte cinq segments individualisables : oreillette gauche primitive, oreillette droite primitive, ventricule gauche primitif, ventricule droit primitif et conotruncus, reliés entre eux par des jonctions : canal auriculo-ventriculaire, foramen interventriculaire primitif, sillon bulbo-ventriculaire, jonction conotruncale (Figure 5). La suite du développement du cœur consiste en un remaniement de ces cavités et à l'apparition, entre elles, de septa et de valves.

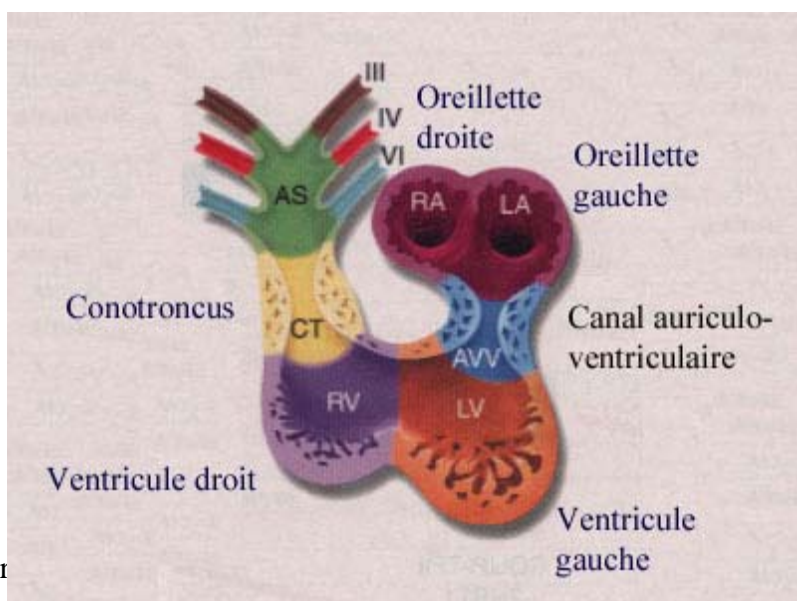


Figure 5 Courbur (modifié d'après Srivastava D et coll. 2000).

I.2.3. Développement du conotruncus

Le conus est la région du cœur, en forme de cône, qui fait suite à la partie distale du ventricule primitif et la relie au troncus, la région entre les deux étant l'emplacement des futures valves semi-lunaires. Son devenir est de donner naissance aux voies d'éjection des deux ventricules.

Le conus a en charge la répartition des entrées et des sorties ventriculaires et réalise ces deux missions par deux mouvements simultanés de migration et de rotation. La migration du cône est un phénomène complexe, qui le porte du flanc droit du cœur successivement vers l'avant, puis vers la gauche, puis vers l'arrière. Il s'insinue entre les deux orifices auriculo-ventriculaires issus du canal atrio-ventriculaire primitif et participe ainsi à la répartition des entrées ventriculaires, avec un effacement du sillon auriculo-conal. Il donne aussi le septum conal ou infundibulaire, qui participe à la formation du septum ventriculaire dans sa portion la plus antérieure et haute. La rotation du cône répartit les sorties ventriculaires. Initialement, le conus est surplombé par le troncus, dont la partie droite, rattachée aux III^o et IV^o arcs, donnera l'aorte. La partie gauche, rattachée au VI^o arc, donnera l'artère pulmonaire. Ainsi, les deux vaisseaux primitifs sont en position de transposition avec une aorte antéro-droite et partent tous deux du futur ventricule droit. Le cœur embryonnaire est un ventricule droit à double issue jusqu'au 40^{ème} jour. La mise en position des deux vaisseaux se fait par une rotation inversée des deux ostia du cône. L'ostium proximal tourne de 90° en sens horaire et l'ostium distal de 150° en sens antihoraire. Les torsions débutent à la 5^{ème} semaine et se terminent à la 6^{ème}. La rotation de l'ostium proximal est due à un glissement de la gelée cardiaque sur le myocarde, et celle de l'ostium distal à une croissance différentielle de la paroi conale.

Le troncus suit passivement les mouvements du cône. Il se tord sur lui-même de 150°, portant l'artère pulmonaire en avant, à droite et en haut. L'aorte vient à gauche et en arrière, et s'abaisse du fait de la croissance différentielle de la paroi du cône. Elle s'approche ainsi du futur ventricule gauche, profitant de l'effacement du sillon auriculo-conal. L'appariement et la fusion de crêtes conotroncales dont le nombre est encore discuté permet le cloisonnement normal en spirale du conus, la connexion ventriculo-artérielle et la disposition normale des vaisseaux (artère pulmonaire antérieure et droite s'enroulant au flanc gauche de l'aorte).

I.2.4. Rôle des cellules de la crête neurale cardiaque

La crête neurale est une structure qui apparaît très tôt dans le développement de l'embryon et qui n'a qu'une existence temporaire. Les cellules dont elle est composée migrent à travers l'organisme et vont se différencier pour former les cellules de divers organes. Seule une région très limitée de la portion crâniale de la crête neurale contient des cellules à destinée cardiaque. Les cellules de la voie d'éjection cardiaque ont donc deux origines. Une fraction des cellules dérive de l'endocarde, l'autre a migré à partir de la crête neurale, par l'intermédiaire des arcs branchiaux III, IV et VI (Figure 6). Les cellules migrant vers la voie d'éjection colonisent les septa truncal, aortopulmonaire et conal et les valves semi-lunaires.

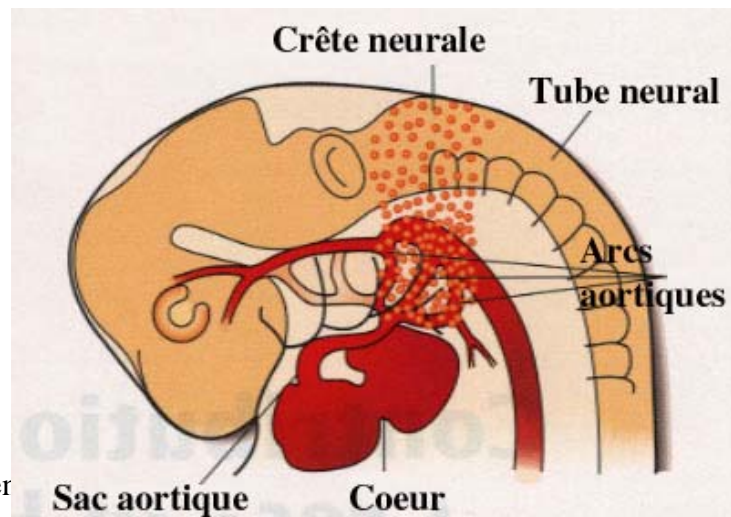


Figure 6 Représente la crête neurale cardiaque des rhombomères 6-8 à travers les arcs pharyngés 3, 4 et 6. Les arcs aortiques 3, 4 et 6 traversent ces arcs pharyngés et se connectent au sac aortique (modifié d'après Kirby ML 1998).

Les cellules de la crête neurale cardiaque contribuent à la morphogénèse cardiaque, mais également à la formation du thymus, de la thyroïde et des glandes parathyroïdes. Les expériences d'ablation de la crête neurale, réalisées sur l'embryon de poulet, ont permis d'en préciser le rôle en étudiant les malformations observées. L'ablation de la crête neurale cardiaque avant que ne se produise la migration cellulaire aboutit à un large éventail de malformations cardiaques, selon l'étendue de l'ablation. Ces malformations peuvent être classées en deux catégories :

- un vaisseau unique par absence de septation de la voie d'éjection (tronc artériel commun ou troncus arteriosus)
- un malalignement au niveau du septum conal (ventricule droit à double issue).

L'ablation totale aboutit presque toujours à un tronc artériel commun. Une ablation partielle conduit à la présence ou l'absence du septum aortopulmonaire, responsable ou non d'un tronc artériel commun. En revanche, il existe toujours une communication interventriculaire associée. La position du vaisseau unique par rapport aux ventricules sous jacents est variable, mais il se trouve le plus souvent au-dessus du ventricule droit. La transposition des gros vaisseaux est exceptionnelle après ablation de la crête neurale. À ces malformations s'associent de façon variable des anomalies des arcs aortiques : interruption de l'arche (ou crosse) aortique, persistance de vaisseaux embryonnaires.

I.2.5. Les cardiopathies conotroncales : anomalie de développement du conotruncus

Les cardiopathies conotroncales constituent un groupe hétérogène de malformations tant sur le plan anatomique que physiologique puisqu'il peut s'agir soit de cardiopathies obstructives du cœur droit à bas débit pulmonaire (tétralogie de Fallot), soit d'obstacle gauche (interruption de la crosse aortique) ou de shunts artériels (tronc artériel commun).

Au cours du développement cardiaque, une mauvaise rotation du septum conal avec bascule antérieure joue un rôle central dans l'apparition de ces cardiopathies. En effet, les quatre éléments de la tétralogie de Fallot ne sont que la conséquence de cette bascule antérieure : communication interventriculaire par malalignement entre le septum conal et le septum musculaire rendant impossible la formation du septum membraneux, sténose infundibulaire par rétrécissement de la voie sous pulmonaire, chevauchement de la communication interventriculaire par l'aorte déplacée antérieurement et hypertrophie ventriculaire droite par égalité de pression systolique entre les deux ventricules. La perturbation de la formation d'une structure embryonnaire provenant, soit de la migration, soit de la différenciation d'un groupe de cellules, dont les cellules de la crête neurale cardiaque, peut conduire à des phénotypes variés allant d'une forme mineure à une forme sévère. Appliquée aux cardiopathies conotroncales, la bascule antérieure du septum conal, quand elle est modérée, donne une communication interventriculaire par malalignement. Plus marquée, elle conduit à une tétralogie de Fallot. Extrême, c'est l'atrésie pulmonaire avec communication interventriculaire. La bascule postérieure du septum conal sous l'aorte, miroir de la bascule antérieure, conduit aux syndromes de coarctation et à l'interruption de la crosse aortique. À côté de ces mécanismes d'asymétrie de septation de la région conotroncale, une

malrotation lors de la septation du conotruncus donnera une malposition des gros vaisseaux, une absence totale de septation un tronc artériel commun et une absence de résorption du conus sous aortique un ventricule droit à double issue (Figure 7).

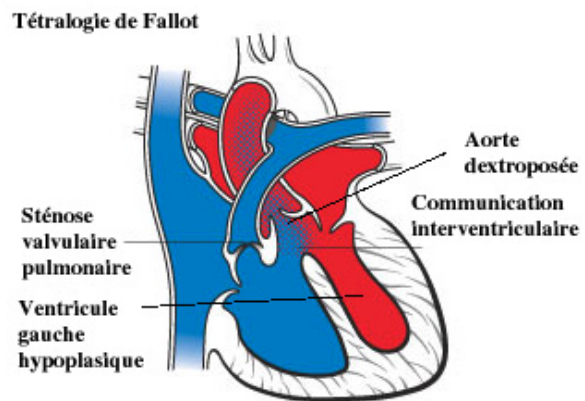
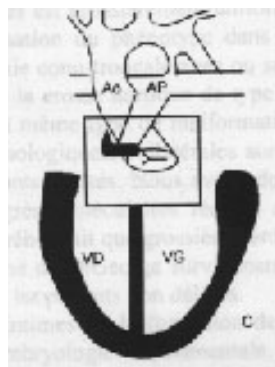
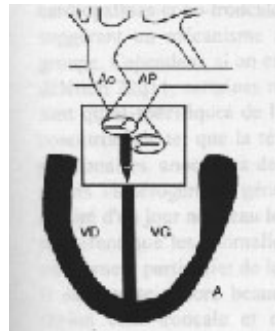


Figure 7 Représentation schématique du cœur normal et des principales cardiopathies conotruncales (modifié d'après Bonnet D 1998 et www.americanheart.org/).

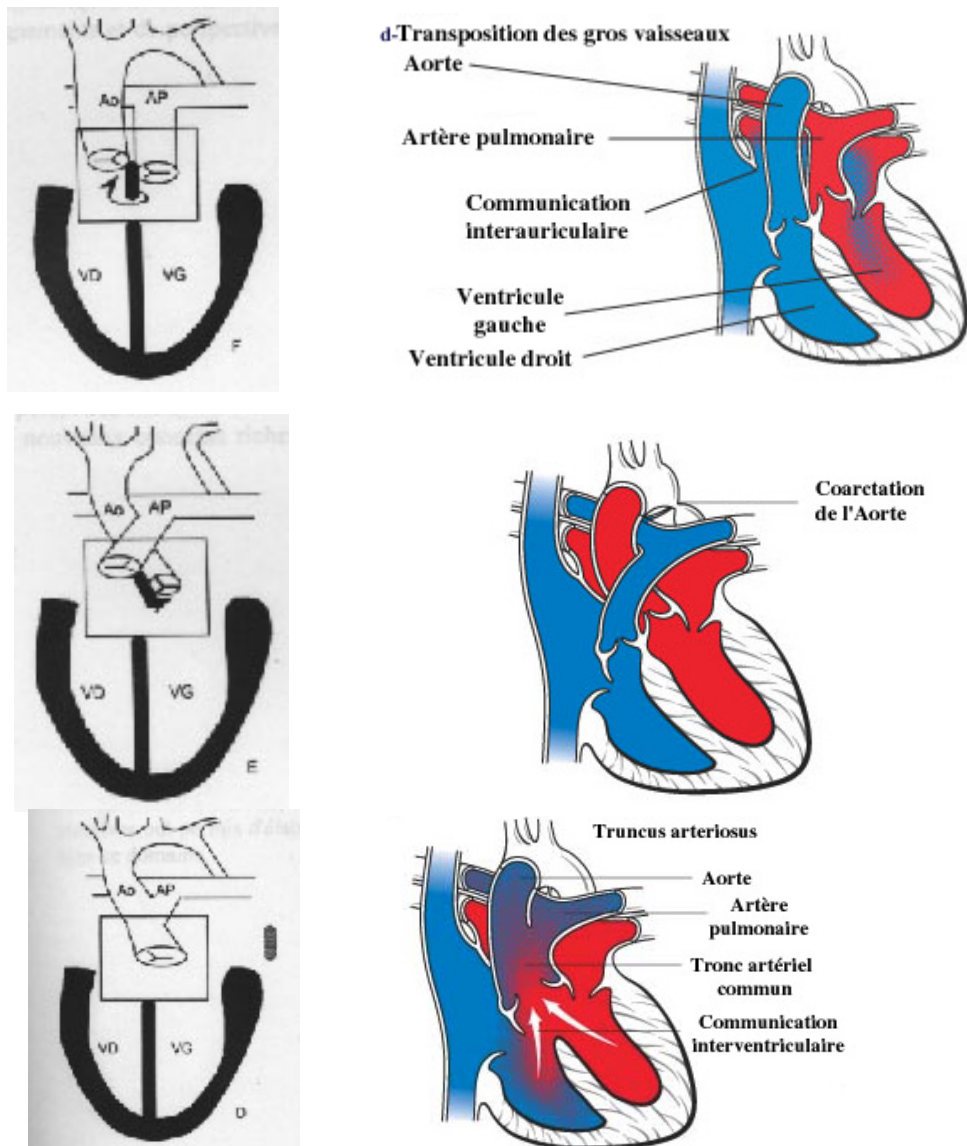


Figure 7 (suite) Représentation schématique du cœur normal et des principales cardiopathies conotruncales (modifié d'après Bonnet D 1998 et www.americanheart.org/).

I.3. Aspects génétiques du développement cardiaque

I.3.1. Stades précoces de la différenciation cardiaque

Certains des signaux qui initient la différenciation des précurseurs du mésoderme en cardiomyocytes ont été identifiés. Une attention toute particulière a été portée aux facteurs de transcription de la famille NK. Une mutation homozygote du gène *tinman* de la Drosophile, un facteur de transcription de la famille NK, est responsable d'une absence complète de développement cardiaque (Harvey RP et coll. 1996). Le gène *GATA4* est également essentiel aux premiers stades de la différenciation cardiaque. Un facteur de transcription *GATA* est défini par la présence d'un motif en doigt de zinc capable de reconnaître une séquence d'ADN « GATA ». Les gènes de la drosophile *pannier* et *tinman*, homologues des gènes des familles *GATA* et *NK* chez l'Homme, sont capables, en synergie, d'induire une différenciation des cellules non-myocardiques en cardiomyocytes (Gajewski K et coll. 2001).

Parmi les nombreux autres gènes qui font actuellement l'objet d'études, deux sont également importants aux premiers stades de la formation cardiaque : *SRF* (*Serum Response Factor*) et le facteur de transcription myocardin. L'expression de *SRF* n'est pas spécifiquement cardiaque, mais sa présence est nécessaire à la formation du mésoderme permettant une différenciation cardiaque (Arsenian S et coll. 1998). De nombreux gènes d'expression cardiaque possèdent des sites de liaison potentiels à *SRF*. L'action de *SRF* est augmentée de plus de 1000 fois par la protéine myocardin, dont l'expression est essentiellement cardiaque (Wang D et coll. 2001). L'expression d'un mutant dominant négatif de myocardin dans des embryons de *Xenope* interfère avec la différenciation des cellules myocardiques laissant penser que myocardin joue un rôle important dans le développement cardiaque.

Des gènes des familles *BMP* (*Bone Morphogenetic Protein*), *FGF* (*Fibroblast Growth Factor*) et *Wnt* (*Wingless*), par le biais d'interactions complexes, jouent également un rôle essentiel en stimulant ou inhibant la différenciation des cellules cardiaques. Ainsi, les protéines *BMP* issues de l'endoderme stimulent la différenciation en cardiomyocytes tandis que les molécules *Wnt* provenant du tube neural inhibent cette différenciation (Schultheiss TM et coll. 1997 ; Marvin MJ et coll. 2001 ; Schneider VA et coll. 2001 ; Tzahor E et coll. 2001). Le champ cardiaque est caractérisé par un gradient élevé de protéines *BMP* et un faible gradient de molécules *Wnt*.

I.3.2. Fusion des tubes cardiaques primitifs

Le facteur de transcription *GATA4* est important pour la fusion des tubes cardiaques primitifs (Kuo CT et coll. 1997 ; Molkenin JD et coll. 1997). Les gènes *GATA1*, 2 et 3 sont importants dans le développement du système hématopoïétique (Orkin SH et coll. 1992 ; Weiss MJ et coll. 1995), tandis que *GATA4*, 5 et 6 sont exprimés dans le cœur (Laverriere AC et coll. 1994 ; Charron F et coll. 1999). L'inactivation de *GATA4* chez la souris est responsable d'une mort embryonnaire précoce. Les tubes cardiaques primitifs sont présents, mais leur fusion ne se fait pas (Kuo CT et coll. 1997 ; Molkenin JD et coll. 1997).

Des sites de liaison potentiels GATA sont retrouvés dans les régions promotrices de nombreux gènes dont l'expression est cardiaque. Ainsi *GATA4*, en synergie avec *NKX2.5* et *SRF* est capable d'activer des gènes dont l'expression est cardiaque (Durocher D et coll. 1997 ; Sepulveda JL et coll. 1998). Des facteurs associés à *GATA4*, dont *FOG2* (*Friend of GATA*) et *NFAT3* (*nuclear factor of activated T cells 3*) ont été identifiés comme partenaires potentiels d'hétérodimérisation de *GATA4* (Molkenin JD et coll. 1998).

I.3.3. Formation des cavités cardiaques

Les quatre cavités cardiaques sont morphologiquement différentes à des stades très précoces du développement. Ces différences ne sont pas seulement liées à des facteurs hémodynamiques mais également à des expressions géniques particulières. De nombreux facteurs de transcription ont un profil d'expression spécifique d'une cavité cardiaque et participent au développement de chacune d'elles.

Les facteurs de transcription *dHand* (*Hand2*) et *eHand* (*Hand1*) possédant un motif helix-loop-helix sont nettement plus exprimés dans les ventricules droit et gauche, respectivement, au moment du développement embryonnaire de la souris (Srivastava D et coll. 1995). Des embryons dont le gène *dHand* est inactivé présentent un ventricule droit peu développé, alors que le tissu est correctement différencié (Srivastava D et coll. 1997). Le facteur de transcription *Mef2* est essentiel à une bonne croissance des deux ventricules mais pas des oreillettes (Lin Q et coll. 1997). L'inactivation du gène *Tbx5* chez la souris conduit à une hypoplasie des oreillettes et du ventricule gauche avec un développement normal du ventricule droit et des gros vaisseaux (Bruneau BG et coll. 2001). Le développement des

ventricules est également sous le contrôle du gène à homéoboîte *Irx4* dont l'expression est principalement ventriculaire (Bao ZZ et coll. 1999). Des patients avec hypoplasie du ventricule droit et/ou gauche pourraient présenter des mutations au sein de ces gènes. Enfin, *Tbx5* contrôle l'expression de gènes dans le canal atrioventriculaire, mais est contrebalancé par une autre protéine de la famille T-Box, *Tbx2* (Habets PE et coll. 2002). Les mécanismes par lesquels ces facteurs de transcription affectent différentes structures du cœur ne sont pas clairement identifiés, mais impliquent probablement l'activation ou la répression de gènes cibles importants dans le développement spécifique des cavités cardiaques.

I.3.4. Formation de la boucle cardiaque

Une légère perturbation à cette étape critique du développement cardiaque peut être responsable d'une malformation cardiaque congénitale sévère et explique la probable implication de nombreux gènes. Par ailleurs, l'hétérogénéité phénotypique observée au sein de familles avec mutation de *NKX2.5* illustre le rôle essentiel des gènes modificateurs, des facteurs environnementaux, des polymorphismes génétiques ou d'événements stochastiques dans la sévérité et le type de malformation. L'inactivation de *Nkx2.5* chez la souris perturbe la formation de la boucle cardiaque. *Nkx2.5* est orthologue au gène *tinman* de la mouche *Drosophila melanogaster* (Bodmer R 1993). Chez la mouche, *tinman* est nécessaire à la formation de la structure qui correspond au cœur chez les mammifères (Harvey RP et coll. 1996). De nombreux gènes de la famille NKX ont des profils d'expression communs chez les mammifères, mais *Nkx2.5* semble jouer un rôle unique dans le développement cardiaque. Ce gène est exprimé dès les premiers stades de la différenciation du cardiomyocyte. Le tube cardiaque primitif se forme normalement chez les embryons de souris mutés, mais ceux-ci meurent en milieu de gestation en raison d'une mauvaise formation de la boucle cardiaque (Lyons I et coll. 1995).

I.4. Stratégies d'identification de gènes

I.4.1. Anomalies chromosomiques, recherche de microdélétion par Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) et Hybridation Génomique Comparative (CGH) array

Depuis plusieurs années, l'étude d'anomalies chromosomiques permet l'identification de gènes responsables de maladies ou de syndromes génétiques. Les translocations

réciroques en apparence équilibrées peuvent interrompre un gène. Ce gène n'est alors plus fonctionnel et explique un phénotype anormal. Des méthodes de clonage positionnel basées sur l'utilisation de sondes d'ADN génomique marquées – cosmide, BAC (*bacterial artificial chromosome*), ou YAC (*yeast artificial chromosome*) – permettent la mise en évidence du point de cassure, lieu d'interruption du gène. Les autres remaniements chromosomiques explorés consistent en des délétions ou plus rarement des duplications chromosomiques. La délétion emporte un ou plusieurs gènes. Cette stratégie permet une première localisation chromosomique d'un gène responsable d'une maladie.

Les anomalies chromosomiques responsables d'un syndrome polymalformatif intégrant une malformation cardiaque sont très variées. Plusieurs études réalisées grâce aux données de la littérature ont tenté d'identifier les anomalies chromosomiques récurrentes associées à une malformation cardiaque (Johnson MC et coll. 1997 ; van Karnebeek C et coll. 1999). Ainsi, une cardiopathie est souvent associée à la microdélétion 22q11.2. L'observation d'enfants porteurs d'une délétion dans la région chromosomique 20p12 a conduit à l'identification du gène *JAG1*. De la même façon, le syndrome de « San Luis valley » décrit des enfants polymalformés avec délétion 8p terminale et duplication 8q terminale, résultat d'une inversion péricentrique parentale (Gelb BD et coll. 1991). Par la suite, d'autres enfants présentant un tableau proche incluant une malformation cardiaque volontiers conotruncale, lié à une délétion 8p terminale, ont permis de suspecter qu'un gène important dans le développement cardiaque siégeait dans cette région chromosomique (Reddy KS et coll. 1999 ; Giglio S et coll. 2000). Récemment, des mutations du gène *GATA4* ont été identifiées chez des patients de plusieurs familles confirmant cette suspicion (Garg V et coll. 2003). De nombreux gènes ayant un rôle dans le développement cardiaque restent cependant à identifier. Par exemple, la délétion 3p terminale est souvent associée à une malformation cardiaque, mais le ou les gènes impliqués ne sont pas encore clonés.

L'identification de nouveaux gènes par FISH reste laborieuse. Elle impose de disposer de cellules techniques en cytogénétique et de tester un grand nombre de sondes marquées. Le temps et l'argent nécessaire en limitent l'intérêt. En revanche, la technique des puces à ADN (CGH array) constitue une alternative prometteuse. Tout récemment, des améliorations techniques décisives ont été réalisées. Le principe de la technique est le suivant. Sur une lame (puce), sont déposés des fragments d'ADN (clones) balisant l'ensemble du génome (par exemple, à raison d'une sonde tous les millions de bases) ou permettant de tester des régions préférentiellement délétées ou dupliquées dans les syndromes polymalformatifs. Parallèlement, les ADN du patient à tester et d'un sujet contrôle sont marqués de deux

fluorochromes de couleurs différentes. Une cohybridation de ces deux ADN est ensuite réalisée sur la puce. Cette technique permet de tester plusieurs centaines ou milliers de régions en un seul temps. Cette approche par puce à ADN permet un diagnostic rapide par la mise en évidence d'un remaniement de petite taille impliquant un ou plusieurs des multiples clones fixés sur la puce. L'étude d'enfants ou de fœtus avec plusieurs malformations dont une anomalie cardiaque pourrait contribuer à identifier des régions chromosomiques au sein desquelles siègent des gènes importants dans le développement du cœur.

Cette approche a été validée par plusieurs études préliminaires. L'une d'elles a consisté à rechercher par CGH array un remaniement subtélomérique préalablement identifié par la technique de FISH chez 20 patients avec retard mental associé ou non à des malformations (Veltman JA et coll. 2002). La technique a permis de retrouver les anomalies connues mais également d'identifier 3 remaniements subtélomériques supplémentaires non détectés par FISH. Un autre travail a permis de caractériser la délétion 1p36. Vingt-cinq patients avec délétion 1p36 connue ont été testés grâce à une puce sur laquelle 97 clones de la région 1p36 ont été déposés (Yu W et coll. 2003). Les remaniements connus ont été confirmés ainsi que des remaniements plus complexes passés inaperçus, confirmant ainsi l'intérêt de cette approche.

I.4.2. Analyse de liaison génétique

Un gène responsable d'une maladie génétique peut être localisé par une étude de liaison génétique grâce à des marqueurs polymorphes dans une famille où existe une ségrégation mendélienne du trait phénotypique. La puissance de cette approche, qui a permis de localiser un grand nombre de locus morbides, a été significativement améliorée par le développement d'une carte génétique de très haute résolution, fondée sur le polymorphisme d'un grand nombre de locus microsatellites hautement informatifs, et couvrant l'ensemble du génome humain à raison d'un marqueur tous les 2 à 10 centiMorgans (cM) (Cohen D et coll. 1993 ; Dib C et coll. 1996).

Les analyses de liaison génétique permettent de déterminer un intervalle de quelques centiMorgans, c'est-à-dire de quelques millions de paires de bases, à l'intérieur duquel le gène se situe avec une probabilité élevée. Il s'agit, dans ce cas, d'une distance génétique calculée à partir des méioses informatives où l'on a constaté une coségrégation du marqueur et de la

maladie et du nombre de recombinaisons observées entre le locus de la maladie et le locus du marqueur dans une ou plusieurs familles atteintes de la même maladie.

Le *lod score*, Z , est le logarithme des probabilités que les locus soient liés (pour une fraction de recombinaison θ) plutôt que non liés (fraction de recombinaison 0,5) (Morton NE 1955). Les *lod scores* sont calculés en examinant les méioses, chacune à leur tour, et en comparant la vraisemblance des génotypes observés avec les différentes hypothèses de liaison (avec une fraction de recombinaison θ) ou de non-liaison. Pour un test unique, les *lod scores* de +3 et -2 sont les critères pour une liaison ou une exclusion.

Cette analyse de liaison est très efficace, mais pour qu'elle atteigne un bon niveau de signification, il faut disposer d'un nombre élevé de méioses, ce qui implique une famille étendue avec plusieurs générations d'individus. Dans le cas des malformations cardiaques, les difficultés sont nombreuses. La petite taille des familles, la létalité précoce, le diagnostic clinique parfois difficile ou la pénétrance incomplète sont autant d'obstacles à l'identification de nouveaux gènes par analyse de liaison génétique. En raison de la grande hétérogénéité génétique, il n'est pas envisageable de combiner les données de plusieurs familles.

I.4.3. Approche par gènes candidats

Par cette approche, un gène candidat est supposé être responsable d'une affection, et l'hypothèse est ensuite testée en recherchant les preuves que ce gène candidat soit effectivement associé à la maladie. Ces approches peuvent être fondées sur des propriétés particulières du produit du gène candidat, évocatrices de son implication dans la pathogénie. Ainsi, des gènes candidats peuvent être suggérés pour certaines maladies, sans connaître la localisation chromosomique du gène de la pathologie (approche gène candidat indépendante de la position) mais par leur profil d'expression ou leurs fonctions.

Cependant, l'hypothèse d'un gène candidat est plus solide si l'on peut montrer qu'il est localisé au niveau de la même région chromosomique que le gène de la maladie. Cette approche positionnelle de gène candidat dominera complètement l'identification des gènes morbides dans les prochaines années, simplement du fait de la rapidité avec laquelle les localisations chromosomiques sont établies et par le nombre croissant de gènes connus ou prédits par bioinformatique.

Si un phénotype animal présente une similarité étroite avec une maladie humaine, il peut être lié à des mutations du gène animal orthologue au gène de la maladie humaine. Si le gène humain est inconnu et que le gène animal est connu, la connaissance de l'orthologue animal peut donc être utilisée pour aider à identifier et à caractériser le gène humain. Un tel modèle animal peut être spontané ou être créé artificiellement par irradiation aux rayons X ou par mutation chimique. Bien qu'utile, cette approche est moins générale que l'on pourrait espérer, car les mutations des gènes orthologues chez l'Homme et la souris produisent souvent des phénotypes différents. La cartographie du génome de la souris permet de dégager des régions chromosomiques homologues homme-souris, régions synténiques. Lorsqu'une localisation chromosomique est connue pour un gène d'intérêt chez la souris, il est possible de prédire la localisation de ce gène chez l'Homme. Cependant, la synténie peut être mal conservée, rendant cette prédiction difficile.

I.4.4. Étude d'association-liaison

La recherche de telles associations est une des voies possibles pour identifier des gènes de susceptibilité aux maladies communes. Les études cas-témoins consistent à comparer la fréquence d'un marqueur génétique chez les sujets atteints et chez les témoins. L'analyse statistique est fondée sur la table de contingence où figurent, pour les cas et les témoins, les fréquences de chaque génotype ou de chaque allèle au locus considéré. Le prérequis de cette analyse est que les cas et les témoins soient choisis au hasard dans une même population panmictique, sans critères de sélection autres que ceux correspondant à la maladie. Le marqueur utilisé peut être un polymorphisme sans relation causale avec la pathologie ou bien une mutation dans un gène candidat. L'un des problèmes majeurs des études cas-témoins est la possibilité de résultats positifs dus, non pas à une relation réelle entre le marqueur analysé et la pathologie, mais à un biais de sélection des deux groupes lorsque le groupe étudié et le groupe contrôle sont tirés de deux sous-populations génétiquement distinctes.

Afin de résoudre ce problème, des méthodes ont été proposées permettant d'étudier l'association entre le marqueur et la pathologie à l'intérieur de familles contenant au moins un sujet atteint (Schaid DJ et coll. 1993). La même provenance génétique des allèles portés par

les cas et les témoins permet alors d'éviter les principaux biais des études cas-témoins portant sur des sujets non apparentés.

On peut ainsi créer un témoin interne fictif, porteur d'un génotype constitué des deux allèles que le sujet atteint n'a pas hérités de ses deux parents. Cette méthode fondée sur la mesure d'un risque relatif (méthode HRR pour *haplotype relative risk*) se limite à l'étude des familles nucléaires comportant un enfant atteint et nécessite de connaître le génotype des parents (Falk CT et coll. 1987). Ces études par rapport aux études standard cas-témoins supposent 50% de travail supplémentaire car trois sujets (proband et parents) doivent être typés dans chaque famille. Ce type d'étude est parfois limité dans les maladies à révélation tardive où les parents peuvent être décédés ce qui n'est pas le cas des malformations cardiaques présentes dès la naissance.

Les associations alléliques entraînées par un déséquilibre de liaison se retrouvent uniquement lorsqu'une proportion significative des chromosomes, apparemment indépendants que l'on examine dans une population correspond en fait à des copies du même chromosome ancestral. À ce jour, la recherche d'un déséquilibre de liaison sur la totalité du génome n'est statistiquement pas réalisable et est restreinte à des régions chromosomiques ou à des locus candidats, dans lesquels une raison préalable existe pour suspecter une association. Les associations alléliques permettent de réduire un intervalle chromosomique et facilitent ainsi la recherche d'un gène de prédisposition.

I.5. Génétique des cardiopathies conotruncales chez l'Homme

I.5.1. Gènes identifiés à partir des formes syndromiques

I.5.1.1. Le syndrome d'Alagille et le gène *JAG1*

Le syndrome d'Alagille ou dysplasie artériohépatique, initialement décrite par Alagille et collaborateurs en 1969 puis par Watson et Miller en 1973, est une anomalie de développement touchant différents organes dont le foie, le cœur, l'œil, les vertèbres et la face. L'incidence est estimée à 1/100 000 naissances et la transmission est autosomique dominante avec une expressivité phénotypique très variable.

I.5.1.1.1. Données cliniques

Cinq critères de diagnostic sont reconnus comme majeurs : choléstase chronique en rapport avec une paucité des voies biliaires intrahépatiques, cardiopathie congénitale, anomalies vertébrales, embryotoxon postérieur et faciès évocateur. La présence de 3 critères majeurs parmi les 5 suffit au diagnostic (Krantz ID et coll. 1997).

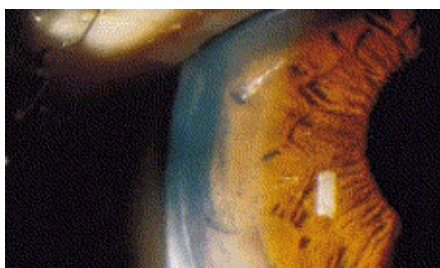
La grande majorité des patients symptomatiques présentent dans l'enfance des manifestations hépatiques avec choléstase responsable d'épisodes d'ictère le plus souvent séparés par des périodes de rémission durant lesquelles persiste généralement un prurit permanent, d'intensité variable. Le prurit, parfois très invalidant, se manifeste rarement avant l'âge de 3 mois, mais est présent chez la grande majorité des enfants dans leur troisième année de vie. Le foie est hypertrophié dans tous les cas et une splénomégalie est notée dans plus du tiers des cas. Des xanthomes isolés ou extensifs, apparaissant progressivement vers l'âge de 2 ans, se développent dans plus du quart des cas, témoins de la persistance d'une choléstase sévère. L'atteinte hépatique est extrêmement variable au sein d'une même famille. Un parent d'un enfant atteint, porteur de la même mutation, peut n'avoir aucune manifestation hépatique. L'évolution vers la cirrhose et l'insuffisance hépatique n'est pas rare. La transplantation hépatique est nécessaire pour environ 15 % des patients (2 % des transplantations hépatiques pédiatriques). Un retard de croissance est rapporté chez 50 à 90 % des patients, par malnutrition liée à une mauvaise solubilisation et absorption de lipides et de vitamines liposolubles.

Les analyses biologiques mettent en évidence une augmentation de la bilirubine conjuguée, des phosphatases alcalines, du cholestérol et des gamma-glutamyl transpeptidases. La biopsie hépatique retrouve habituellement une paucité des voies biliaires intrahépatiques.

Une malformation cardiaque congénitale est présente chez plus de 90 % des patients. La forme classique consiste en une sténose périphérique des branches de l'artère pulmonaire. D'autres malformations cardiaques sont mises en évidence : communication interventriculaire, communication interauriculaire, sténose aortique ou coarctation aortique. Des malformations cardiaques complexes dont la tétralogie de Fallot peuvent être responsables de décès précoces.

Les manifestations ophtalmologiques les plus fréquentes consistent en des défauts de la chambre antérieure de l'œil (embryotoxon postérieur, anomalies d'Axenfeld ou de Rieger). L'embryotoxon postérieur, visible uniquement par un examen à la lampe à fente, est rapporté chez plus de 89 % des patients et est, par conséquent, un signe diagnostique important (Figure 8). Anomalie de clivage de la chambre antérieure de l'œil, il s'agit de la proéminence anormale de la ligne de Schwalbe. La ligne de Schwalbe est une ligne formée par la jonction de la membrane de Descemet avec l'uvée à l'angle de la chambre antérieure. Cette anomalie mineure de la chambre antérieure de l'œil n'est retrouvée que dans 10 % environ de la population générale. D'autres anomalies oculaires, moins fréquentes, ont été rapportées dont une microcornée, un kératocône, une dystrophie maculaire congénitale, une pupille ectopique, une anomalie du disque optique. Ces anomalies oculaires aident également au diagnostic. Pour la majorité des patients, le pronostic visuel est bon.

L'anomalie squelettique la plus fréquente est la vertèbre « en ailes de papillon » (Figure 8). Elle est le résultat d'un défaut de fusion des arcs vertébraux antérieurs intéressant une ou plusieurs vertèbres dorsales. Ce signe, retrouvé chez 70 % des patients atteints de syndrome d'Alagille, n'a pas de conséquence sur la statique vertébrale. L'incidence de cette anomalie est inconnue dans la population générale, mais elle est rarement retrouvée fortuitement.



31



Figure 8 Image de gauche représentative d'un embryotoxon postérieur visible en périphérie de la cornée (d'après Hingorani M et coll. 1999) et, à droite, image radiographique illustrant l'anomalie vertébrale évocatrice du syndrome d'Alagille : la vertèbre en aile de papillon (flèche).

La dysmorphie faciale présentée par les patients consiste en un front bombé, un hypertélorisme discret, une racine du nez aplatie avec un enfoncement des globes oculaires, un nez étroit avec une pointe bulbeuse et un petit menton. Cet ensemble donne un aspect triangulaire au visage. Le fait que la dysmorphie faciale soit un élément typique du syndrome plutôt qu'un signe secondaire à la choléstase chronique est encore débattu.

Un retard mental (QI entre 60 et 80) était noté dans des séries anciennes de patients. Dans les séries plus récentes, ce signe n'est pas retrouvé et serait lié à un diagnostic plus précoce et à une meilleure prise en charge néonatale.

I.5.1.1.2. Données génétiques

I.5.1.1.2.1. Clonage du gène *JAG1*

Le caractère génétique de la maladie ainsi que sa transmission autosomique dominante avec une expressivité variable ont été suggérés très tôt grâce à l'observation de cas familiaux (Alagille D et coll. 1969 ; Watson GH et coll. 1973). Les analyses de ségrégation portant sur plusieurs familles ont confirmé la transmission autosomique dominante. La majorité des patients atteints du syndrome a un caryotype normal. Une délétion interstitielle du bras court du chromosome 20 était cependant notée chez plusieurs patients indiquant la présence d'un gène majeur dans la région. Deux équipes ont identifié le gène *JAG1*, responsable du

syndrome d'Alagille (Li L et coll. 1997 ; Oda T et coll. 1997). Dans un premier temps, l'étude de patients présentant une microdélétion dans la région 20p12 a permis de réduire la région minimale critique au sein de laquelle est localisé le gène. Puis, l'analyse d'un gène candidat, *JAG1*, préalablement cloné chez le rat, a conduit à l'identification de mutations tronquantes chez plusieurs patients non apparentés suggérant un mécanisme d'haploinsuffisance à l'origine de la maladie.

I.5.1.1.2.2. Mutations au sein de *JAG1*

Une mutation est identifiée chez 60 à 75 % des patients avec un diagnostic clinique formel de syndrome d'Alagille (Krantz ID et coll. 1998 ; Yuan ZR et coll. 1998 ; Crosnier C et coll. 1999, 2001 ; Onouchi Y et coll. 1999 ; Pilia G et coll. 1999 ; Heritage ML et coll. 2000 ; Colliton RP et coll. 2001 ; Giannakudis J et coll. 2001 ; Spinner NB et coll. 2001). Les délétions complètes du gène sont retrouvées dans 3 à 7 % des cas. Près du 3/4 des mutations (168/233) conduisent à un décalage du cadre de lecture puis à un codon stop prématuré. Des mutations faux sens différentes ont été identifiées dans 13 % (23/233) des cas. Une mutation d'épissage est retrouvée dans 15 % des cas. Les mutations *de novo* représentent 60 à 70 % de l'ensemble des mutations. Ces résultats sont compatibles avec un mécanisme d'haploinsuffisance à l'origine du syndrome.

Une famille dont plusieurs membres présentent une cardiopathie congénitale à type de tétralogie de Fallot, mais également de sténose de l'artère pulmonaire ou de communication interventriculaire a conduit à l'identification d'une nouvelle mutation faux-sens, G274D, au sein de *JAG1* (Eldadah ZA et coll. 2001). Une étude fonctionnelle a confirmé que cette mutation perturbait modérément l'activité de la protéine et suggère que le développement cardiaque est plus sensible à des perturbations du dosage de cette protéine que le foie (Lu F et coll 2003). Le rôle de *JAG1* au sein des cardiopathies conotruncales isolées a été évalué sur une série de malades et a permis la mise en évidence de deux mutations, 684insG et del(20)(p11.23p12) dans la séquence codante du gène (Krantz ID et coll. 1999). Une réévaluation clinique retrouve cependant des signes de syndrome d'Alagille qui n'avaient pas été identifiés auparavant. Ce gène ne joue probablement pas un rôle majeur dans le déterminisme de ces malformations lorsqu'elles sont isolées, mais y participe probablement.

I.5.1.1.2.3. Structure de la protéine JAG1

JAG1 est une protéine transmembranaire avec un domaine extracellulaire large, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire relativement courts. Le domaine extracellulaire comprend trois motifs conservés : un domaine DSL (un acronyme pour les régions conservées dans les gènes *Drosophila delta*, *serrate* et *C. elegans lag 2* (Lindsell CE et coll. 1995), 16 motifs EGF et une région riche en cystéine (CR).

I.5.1.1.2.4. Expression de JAG1

Le gène *JAG1* est exprimé dans de nombreux tissus d'origine mésenchymateuse (foie, cœur, rein) et dans des structures épithéliales (rétine, oreille interne, système nerveux central) au cours du développement embryonnaire humain (Crosnier C et coll. 2000). L'expression au cours du développement cardiaque de *JAG1* a également été bien étudiée chez la souris et l'Homme. Une expression importante est mise en évidence dans le conotruncus, les gros vaisseaux dont l'aorte, l'artère pulmonaire et ses branches et le septum atrial (Loomes KM et coll. 1999 ; Crosnier C et coll. 2000).

I.5.1.1.2.5. Fonction de JAG1 dans la voie Notch

La voie Notch est une voie de signalisation impliquée dans la différenciation cellulaire (Lindsell CE et coll. 1996 ; Lissemore JL et coll. 1999). Cette voie a d'abord été décrite chez la *Drosophile* où les récepteurs transmembranaires Notch interagissent avec les ligands de la famille DSL (Delta, Serrate et Lag-2) pour participer à la différenciation cellulaire de nombreux tissus (Artavanis-Tsakonas S et coll. 1995). Une voie similaire existe chez *C. elegans* et chez les vertébrés où des interactions complexes sont identifiées entre les récepteurs Notch et leurs ligands dans de nombreux organes (Weinmaster G et coll. 1997).

À ce jour, 4 récepteurs Notch (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3* et *Notch4*) et 5 ligands (*Jagged1*, *Jagged2*, *Delta-like-1 (Dll1)*, *Dll2*, *Dll3* et *Dll4*) sont connus chez les mammifères. Les interactions spécifiques ligand-récepteur sont partiellement identifiées et sont variables selon le tissu examiné. *Notch1* et *Notch2* sont essentiels à un développement embryonnaire normal. L'inactivation de l'un ou l'autre gène est responsable d'une mort embryonnaire chez la souris en milieu de gestation (Swiatek PJ et coll. 1994 ; Conlon RA et coll. 1995 ; Hamada

Y et coll.1999). Chez le rat, *Notch1* et *Notch2* ont des profils d'expression distincts mais parfois superposés dans le système nerveux, le rein et la glande surrénale (Weinmaster G et coll. 1992). L'expression de *Notch3* au cours du développement est majeure dans le neuroépithélium et se superpose à *Notch1* et *Notch2* dans certaines régions du système nerveux central (Lardelli M et coll. 1994). Une expression importante de *Notch4* est détectée dans le poumon, le cœur et le rein, essentiellement dans les cellules endothéliales (Uyttendaele H et coll. 1996).

I.5.1.1.2.6. Gènes de la voie Notch impliqués en pathologie humaine

Le gène *JAG1*, ligand de NOTCH, est responsable du syndrome d'Alagille dont nous avons détaillé le rôle plus haut.

Le gène *NOTCH1* a été cloné grâce à une translocation récurrente t(7;9)(q34;q34.3) retrouvée dans des leucémies lymphoblastiques T (*TAN-1 pour translocation-associated Notch homolog-1*) (Ellisen LW et coll. 1991). La translocation met en contact le promoteur du récepteur β des cellules T (TCR β) avec le domaine cytoplasmique de *Notch1* et conduit à l'activation de la voie *Notch*. *Notch2* et *Notch4* ont également été impliqués dans des processus néoplasiques chez le chat et la souris, respectivement (Robbins J et coll. 1992 ; Rohn JL et coll. 1996).

Le CADASIL (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*) est une maladie vasculaire de l'adulte qui se caractérise par des infarctus cérébraux dans la substance blanche entraînant une paralysie pseudobulbaire et une démence de type sous-corticale. L'âge moyen d'apparition des symptômes est de 45 ans et le décès intervient vers 65 ans. L'incidence n'est pas connue, mais la maladie est probablement sous-diagnostiquée. Cette affection est transmise selon un mode autosomique dominant. Des mutations dans *NOTCH3* sont retrouvées chez la plupart des patients atteints de CADASIL (Joutel A et coll. 1996). La majorité des mutations sont des mutations faux-sens supprimant ou ajoutant une cystéine dans un des 34 motifs EGF de la protéine. Ces mutations ont probablement un effet sur la conformation de la protéine. Un mécanisme d'haploinsuffisance mais également un gain de fonction pourraient expliquer le phénotype observé.

Les dysostoses spondylocostales constituent un groupe de maladies caractérisées par de multiples anomalies de la segmentation vertébrale, telles qu'hémivertèbres ou fusions vertébrales. Des transmissions autosomiques dominante et récessive ont été rapportées. Des mutations tronquantes au sein du gène *delta-like 3 (Dll3)* sont responsables de dysostose spondylocostale de transmission autosomique récessive (Bulman MP et coll. 2000).

Les récepteurs Notch pourraient jouer un rôle dans certaines pathologies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer (Selkoe D et coll. 2003). Les récepteurs Notch subissent un clivage avant d'être dirigé dans le noyau de la cellule et agir en facteur de transcription. Or, ce clivage est réalisé par la protéine Presenillin impliquée dans des processus neurodégénératifs, ce qui laisse penser un possible rôle des protéines de la voie Notch dans ces maladies.

I.5.1.2. Le syndrome de Holt-Oram et le gène *TBX5*

I.5.1.2.1. Données cliniques

Le syndrome de Holt-Oram est une anomalie de développement caractérisée par des anomalies squelettiques intéressant le membre supérieur et une malformation cardiaque congénitale (Holt M et coll. 1960). L'anomalie cardiaque la plus fréquente est une communication interauriculaire de type ostium secundum, suivie d'une communication interventriculaire et d'une communication interauriculaire de type ostium primum. Des malformations cardiaques complexes dont la tétralogie de Fallot sont observées. Des troubles du rythme cardiaque sont également rapportés dont le bloc auriculo-ventriculaire. Les anomalies squelettiques variées uni ou bilatérales intéressent préférentiellement le rayon radial avec anomalies du pouce (aplasie ou triphalangisme), agénésie ou hypoplasie radiale voire phocomélie (Huang T 2002, pour une revue). La transmission est autosomique dominante à pénétrance complète mais l'expressivité est très variable. L'incidence est estimée à 1/100 000.

I.5.1.2.2. Données génétiques

La majorité des patients atteints du syndrome présente une mutation au sein du gène *TBX5* localisé en 12q2 (Basson CT et coll. 1997 ; Li QY et coll. 1997). Les mutations conduisent souvent à une protéine tronquée et un mécanisme d'haploinsuffisance est évoqué à l'origine du syndrome.

Afin de mieux comprendre le rôle de *TBX5* dans le développement du cœur et des membres, des études cliniques portant sur des patients atteints du syndrome de Holt-Oram ont tenté d'établir des corrélations génotype-phénotype. Les mutations tronquantes sont, pour la plupart, responsables de malformations cardiaques et des membres sévères. En revanche, plusieurs observations ont conduit à suggérer que certaines mutations faux-sens sont à l'origine de phénotypes distincts : la mutation Gly80Arg observée dans une seule grande famille est responsable de malformations cardiaques sévères mais d'anomalies mineures des membres tandis que les mutations Arg237Gln et Arg237Trp ont été associées à des anomalies sévères des membres, mais des anomalies cardiaques mineures (Basson CT et coll. 1999).

L'intérêt de ces études est cependant limité par le faible nombre de patients. Un travail récent portant sur 55 malades suggère que ni le type ni la localisation de la mutation ne

permette de prédire la présentation clinique (Brassington AM et coll. 2003). Parmi les 23 patients étudiés avec mutation faux-sens au sein de *TBX5*, 6 présentent une mutation intéressant le résidu Arginine en position 237. Un seul de ces 6 patients a une atteinte sévère des membres et deux autres ont une atteinte cardiaque grave. Au total, sur l'ensemble des 20 patients étudiés avec malformation cardiaque et atteinte des membres et liés à une mutation faux-sens, seuls 2 ont une présentation clinique en accord avec les prédictions qui suggèrent qu'une mutation dans la région carboxy-terminale est responsable d'une atteinte sévère des membres tandis qu'une mutation dans la partie amino-terminale est responsable d'une atteinte préférentiellement cardiaque.

I.5.1.3. Le syndrome 22q11.2 et le gène *TBX1*

I.5.1.3.1. Données cliniques

Le syndrome de DiGeorge (DiGeorge A 1965) est, en général, porté en période néonatale devant un ensemble malformatif associant une hypoplasie du thymus et des parathyroïdes, une cardiopathie congénitale de type conotruncal et une dysmorphie faciale discrète mais caractéristique. Le syndrome vélocardiofacial associe dans sa forme complète une cardiopathie congénitale de type conotruncal, une fente palatine ou une insuffisance vélaire, une dysmorphie faciale et des troubles de l'apprentissage. Il est actuellement admis que ces deux syndromes représentent deux formes d'expression clinique d'une même entité à différents âges de la vie (Lindsay EA 2001, pour une revue).

L'évolution est en grande partie conditionnée par la nature des malformations congénitales. L'hypocalcémie fréquemment observée en période néonatale disparaît en général, mais quelques enfants peuvent présenter une hypoparathyroïdie persistante nécessitant un traitement. L'insuffisance vélopharyngée, responsable d'une voix nasonnée est fréquente même en l'absence de fente palatine. Elle peut avoir une incidence sur les troubles du langage. La plupart de ces enfants présentent des troubles de l'apprentissage, qui sont majorés par le retard de langage. Il existe peu de données objectives sur le pronostic mental à long terme. Une étude récente portant sur une série de 37 patients a retrouvé un retard mental significatif (QI < 70) chez 40 à 50 % des enfants (Swillen A et coll. 1997). Ce retard est en général léger ou modéré. Un profil neuropsychologique particulier avec déficit de la mémoire visio-spatiale est rapporté (Bearden CE et coll. 2001 ; Woodin M et coll. 2001). L'importance

des troubles du développement psychomoteur n'est pas corrélée à la sévérité des malformations.

I.5.1.3.2. Données génétiques

Une microdélétion au locus 22q11.2 est présente chez plus de 95 % des patients. L'incidence de la microdélétion 22q11.2 dans la population est estimée à 1/5000 naissances. La microdélétion 22q11.2 se transmet selon un mode dominant et dans 10 à 20 % des cas, l'un des deux parents est porteur de cette microdélétion. Cependant, dans la plupart des cas, l'accident chromosomique survient *de novo*. Cette délétion s'étend sur 3 mégabases et plusieurs gènes de la région sont connus. La microdélétion 22q11.2 est rarement responsable de cardiopathie conotruncale isolée. Une étude portant sur 628 malformations conotruncales non syndromiques a montré qu'une seule était liée à une microdélétion 22q11.2 (Marino B et coll. 2001).

Le gène *TBX1*, situé dans la région délétée, semble être impliqué dans le phénotype cardiaque. Son inactivation, à l'état hétérozygote, chez la souris, est à l'origine de malformations cardiaques conotruncales (Jerome LA et coll. 2001 ; Lindsay EA et coll. 2001 ; Merscher S et coll. 2001). Les souris homozygotes pour une mutation inactivatrice de *Tbx1* présentent, en plus des anomalies cardiaques, hypoplasie du thymus et des glandes parathyroïdes, anomalies de la face, vertèbres anormales et fente palatine. Ces résultats sont en faveur d'un rôle majeur de *Tbx1* dans l'étiologie du syndrome 22q11.2, en particulier dans les malformations cardiaques.

Afin d'évaluer le rôle de *TBX1* chez l'Homme, une mutation du gène a été recherchée par plusieurs équipes, au total chez plus de 250 patients, présentant un tableau évocateur de syndrome 22q11.2 sans microdélétion (Gong W et coll. 2001 ; Lindsay EA et coll. 2001 ; Conti E et coll. 2003). Aucune mutation formelle n'a été mise en évidence. En revanche, une étude portant sur 235 patients présentant un tableau de syndrome 22q11.2 a récemment été réalisée au Japon (Yagi H et coll. 2003). Parmi ces patients, une grande majorité présente une microdélétion au locus 22q11.2 (222/235) et seuls 13 ne sont pas délétés. Le séquençage de *TBX1* chez ces 13 patients a conduit à l'identification de 3 mutations différentes au sein de la séquence codante, 2 dans des cas sporadiques et 1 dans une forme familiale. Les 3 patients ont un phénotype caractéristique, excepté l'absence de difficultés d'apprentissage presque

constamment retrouvées dans la microdélétion. Cette notion demande à être confirmée mais est en accord avec l'absence d'expression de *Tbx1* dans le cerveau de la souris. Il semble très probable que *TBX1* joue un rôle majeur dans le phénotype du syndrome 22q11.2.

I.5.2. Gènes identifiés à partir des formes non syndromiques

I.5.2.1. Malformations cardiaques et le gène *NKX2.5*

Plusieurs familles, dont certains membres présentent une malformation cardiaque congénitale principalement à type de communication interauriculaire associée à un bloc de conduction auriculoventriculaire, ont conduit à l'identification du premier gène responsable de cardiopathie congénitale non syndromique, *NKX2.5* (Schott JJ et coll. 1998). Les autres malformations cardiaques plus rarement observées sont à type de communication interventriculaire, tétralogie de Fallot, sténose aortique supra-avalvulaire, valve tricuspide anormale ou maladie d'Ebstein. Une approche par analyse de liaison a permis la mise en évidence d'une région chromosomique candidate en 5q35. Ce gène était connu pour être important dans le développement cardiaque dans d'autres espèces. La transmission au sein de ces familles est autosomique dominante.

L'étude de formes sporadiques de tétralogie de Fallot réalisée sur 114 patients sans microdélétion 22q11.2 a montré qu'une mutation au sein de *NKX2.5* était retrouvée dans 4 % des cas (Goldmuntz E et coll. 2001). D'autres travaux récents ont conduit à l'identification de nouvelles mutations chez des patients avec communication interauriculaire sans bloc auriculo-ventriculaire ou présentant une hypoplasie du cœur gauche associé à une communication auriculo-ventriculaire (Ikeda Y et coll. 2002 ; Watanabe Y et coll. 2002 ; Elliott DA et coll. 2003).

I.5.2.2. Malformations cardiaques et le gène *GATA4*

Une approche différente a conduit à l'identification d'un second gène responsable de cardiopathie congénitale non syndromique. Plusieurs observations décrivent des sujets avec délétion de la partie terminale du bras court du chromosome 8 atteints de malformations dont souvent une cardiopathie conotruncale (van Karnebeek CD et coll. 1999) qui rend très probable la présence d'un ou plusieurs gènes intervenant dans le développement cardiaque au

sein de cette région chromosomique. L'étude fine par FISH a permis de réduire l'intervalle minimum critique à 5-cM (Giglio S et coll. 2000). Au sein de la région, un candidat intéressant, le facteur de transcription *GATA4*, joue un rôle dans le développement cardiaque en particulier dans la fusion des deux tubes primitifs d'origine mésodermique (Pehlivan T et coll. 1999).

L'analyse d'une grande famille au sein de laquelle plusieurs membres présentent une malformation cardiaque a conduit à l'identification d'une mutation au sein du gène *GATA4*. Après un séquençage de *NKX2.5* et de *TBX5* négatif, une analyse de liaison a permis la mise en évidence d'une liaison au locus 8p22-23. Le gène *GATA4* localisé dans la région constituait un excellent candidat. Une mutation faux sens G296S a été retrouvée chez tous les patients atteints de la maladie. L'étude d'une seconde famille a conforté le rôle de ce gène dans les malformations cardiaques chez l'Homme par l'identification d'une seconde mutation entraînant un décalage du cadre de lecture (E359del) (Garg V et coll. 2003).

I.5.2.3. Transposition des gros vaisseaux et les gènes *ZIC3* et *CFC1*

Les transpositions des gros vaisseaux et les ventricules droits à double issue rendent compte de 5 et 2 % des cardiopathies congénitales, respectivement (Ferencz C et coll. 1993). Ces malformations sont le plus souvent isolées, mais peuvent également être associées à un défaut de latéralité thoracique et/ou abdominal (hétérotaxie).

L'évaluation de plusieurs familles avec hétérotaxie liée au chromosome X a conduit à l'identification de mutations au sein du gène *ZIC3* (Gebbia M et coll. 1997). Une mutation tronquante de *ZIC3* a également été identifiée au sein d'une famille dont plusieurs membres ont présenté une transposition des gros vaisseaux isolée sans anomalies de latéralité (Megarbane A et coll. 2000).

Des mutations au sein du gène *CFC1* ont également été identifiées chez des patients avec anomalies de latéralité et malformation cardiaque dont une transposition des gros vaisseaux (Bamford RN et coll. 2000). Une étude portant sur 86 patients avec transposition des gros vaisseaux ou ventricule droit à double issue sans hétérotaxie associée a permis la mise en évidence de 2 mutations au sein de *CFC1*.

Ces résultats mettent en lumière les liens entre anomalies de latéralité et cardiopathie conotruncale isolée et suggèrent un rôle important de ces gènes dans le développement

cardiaque. Au-delà des transpositions des gros vaisseaux classiques ou des ventricules droits à double issue, ces gènes pourraient expliquer d'autres formes de cardiopathies conotruncales.

I.5.2.4. Tétralogie de Fallot et le gène *ZFPM2/FOG2*

La protéine *ZFPM2/FOG2* est exprimée précocement au cours du développement cardiaque et agit en co-régulateur du facteur de transcription *GATA4* (Svensson EC et coll. 1999 ; Tevosian SG et coll. 2000). La souris mutée pour le gène *ZFPM2/FOG2* présente un ensemble de malformations cardiaques congénitales dont la tétralogie de Fallot et l'atrésie tricuspide (Svensson EC et coll. 2000 ; Tevosian SG et coll. 2000).

Une équipe a recherché la présence de mutations au sein du gène *ZFPM2/FOG2* sur 47 patients avec tétralogie de Fallot, dont 8 avec atrésie pulmonaire sans microdélétion 22q11.2 (Pizzuti A et coll. 2003). Deux mutations faux-sens, E30G et S657G, ont été identifiées chez deux malades non apparentés. Les mutations altèrent deux résidus amino-acides conservés au cours de l'évolution et ne sont pas retrouvées chez 120 chromosomes témoins. Malgré des parents cliniquement normaux, les mutations sont héritées. La mutation E30G est retrouvée chez le père tandis que la mutation S657G chez la mère. Les interactions entre *ZFPM2/FOG2* et *GATA4* ont permis la réalisation d'études fonctionnelles permettant de tester ces deux mutations. Celles-ci indiquent une baisse d'activité légère pour la mutation S657G. En revanche, aucune modification n'est retrouvée avec la mutation E30G qui semble être un polymorphisme neutre. Ces résultats sont intéressants, mais seule la mise en évidence de nouvelles mutations formellement délétères confirmera le rôle joué par le gène *ZFPM2/FOG2* dans le développement cardiaque chez l'Homme.

II. Résultats et Discussion

II.1. Etude des cardiopathies conotruncales familiales et sporadiques

II.1.1. Recrutement des patients

Notre étude a nécessité la mise en place d'un Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC), d'une durée estimée à 3 ans. Le projet a été validé dans un premier temps par le comité scientifique du CHU de Nantes. Le financement obtenu a contribué à sa réalisation. Dans un second temps, le protocole de recherche, sans bénéfice individuel direct, a reçu un avis favorable du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB), région des pays de la Loire, Nantes (Annexe 1). Le protocole prévoit l'étude génétique des formes sporadiques et familiales de cardiopathies conotruncales.

II.1.1.1. Critères d'inclusion des patients

Pour les cas sporadiques, nous nous intéressons aux formes classiques de cardiopathies conotruncales (tétralogie de Fallot, atrésie pulmonaire à septum ouvert, tronc artériel commun, interruption de l'arche aortique, crosse aortique à droite, ventricule droit à double issue, sténose de l'artère pulmonaire).

Deux situations sont envisagées :

- dans la première, la malformation est déjà connue du patient, confirmée par échocardiographie et peut avoir déjà été opérée. La malformation cardiaque peut être isolée ou s'associer à d'autres signes et constituer un syndrome,

- dans la deuxième situation, la malformation peut avoir été diagnostiquée en période anténatale et avoir entraîné une interruption médicale de grossesse en raison de la sévérité de la cardiopathie.

Pour les cas familiaux, nous nous intéressons aux familles associant une personne qui présente une forme classique de cardiopathie conotruncale (tétralogie de Fallot, atrésie pulmonaire à septum ouvert, tronc artériel commun, interruption de l'arche aortique, crosse aortique à droite, ventricule droit à double issue, sténose de l'artère pulmonaire) à un apparenté du 1^{er} degré avec une cardiopathie quel que soit son type ou à un apparenté du 2^{ème}

degré ou plus présentant une cardiopathie conotruncale classique. Ces malformations cardiaques peuvent être isolées ou s'associer à d'autres signes et constituer un syndrome.

II.1.1.2. Examens réalisés

Dans les formes familiales, seuls les sujets pour lesquels il persiste un doute diagnostique bénéficieront d'une échographie cardiaque de référence. Un seul audiogramme sera réalisé en cas de suspicion de surdité. Une prise de sang sera faite aux patients et aux apparentés sains.

Dans les formes sporadiques, une prise de sang sera réalisée à l'enfant malade et à ses parents. Aucune échographie supplémentaire ne sera réalisée aux enfants malades en plus de celles faisant partie du suivi normal du patient. Les parents et la fratrie de l'enfant bénéficieront d'une auscultation cardiaque. Dans un premier temps, il ne sera pas réalisé d'échocardiographie aux parents et à la fratrie du patient. Si une anomalie génétique est mise en évidence chez le patient, il sera réalisé, dans un second temps, une échocardiographie chez les parents et la fratrie.

Dans le cadre de ce protocole, les patients ne bénéficieront pas d'un suivi supplémentaire que celui faisant parti du suivi normal du patient.

Une prise de sang sera réalisée aux enfants présentant une cardiopathie conotruncale. Un premier tube sur EDTA permettra les études de génétique moléculaire et un second tube sur Héparinate de Lithium permettra la réalisation d'un caryotype et la recherche d'une microdélétion 22q11.2 par hybridation *in situ* en fluorescence si ceux-ci n'ont pas été déjà réalisés. Les enfants présentant une microdélétion au locus 22q11.2 sont exclus de l'étude. Pour les grossesses interrompues, un prélèvement de tissu fœtal conservé à -80 C au moment de l'examen fœtopathologique sera utilisé.

II.1.2. Exploration des familles recrutées

II.1.2.1. Identification d'une nouvelle mutation C234Y au sein du gène *JAG1* grâce à l'étude de la famille B. (Annexe 2 : *Familial deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon caused by cysteine substitution in the first EGF-like domain of JAG1*. 2002. Le Caignec C et coll. *Am J Hum Genet* 71 :180-186).

II.1.2.1.1. Présentation clinique de la famille B

Nous avons étudié une famille de la région nantaise, connue depuis de nombreuses années des services de cardiologie, dont plusieurs membres ont une cardiopathie conotruncale (Figure 9). Le propositus, Jacques (II-7), présente une tétralogie de Fallot avec sténose sévère des branches de l'artère pulmonaire. La sévérité de la malformation et les possibilités chirurgicales limitées il y a plus de quarante ans n'ont pas permis de traitement chirurgical. Le patient II-7 a eu quatre enfants, un garçon et trois filles. Sa fille la plus âgée (III-6), au plan cardiaque, n'a présenté qu'une communication interventriculaire isolée qui s'est fermée spontanément. En revanche, sa fille la plus jeune (III-8) a eu une tétralogie de Fallot sévère traitée avec succès par chirurgie. Ses deux autres enfants sont cliniquement sans particularités.

Jacques appartient à une fratrie de six garçons. Son frère aîné (II-1) a présenté une sténose périphérique des branches de l'artère pulmonaire associée à une communication interventriculaire. Deux autres frères (II-2 et II-3) ont présenté une sténose périphérique des branches de l'artère pulmonaire isolée. L'un d'eux (II-3) a eu trois enfants. Son fils aîné a eu une sténose périphérique des branches de l'artère pulmonaire isolée. Une de ces deux filles est décédée d'une leucémie aiguë lymphoblastique à l'âge de 2 ans et demi. L'examen autopsique du cœur a mis en évidence une sténose périphérique des branches de l'artère pulmonaire isolée. Enfin, sa fille la plus jeune (III-3) ne présente aucun problème. Les deux derniers frères de Jacques (II-5 et II-9) sont sans particularités. Cette première évaluation clinique de la famille a permis d'établir que la transmission se fait de façon autosomique dominante de façon certaine sur deux générations et probablement sur trois. Au total, sept patients présentant une malformation cardiaque et sept personnes saines ont été évalués cliniquement. Une quinzième personne avec sténose périphérique des artères pulmonaires est décédée d'une leucémie n'a pu être intégrée à l'étude. Une échocardiographie a été réalisée chez les quatre sujets (II-9, III-3, III-5 et III-7) pour lesquels le diagnostic était incertain.

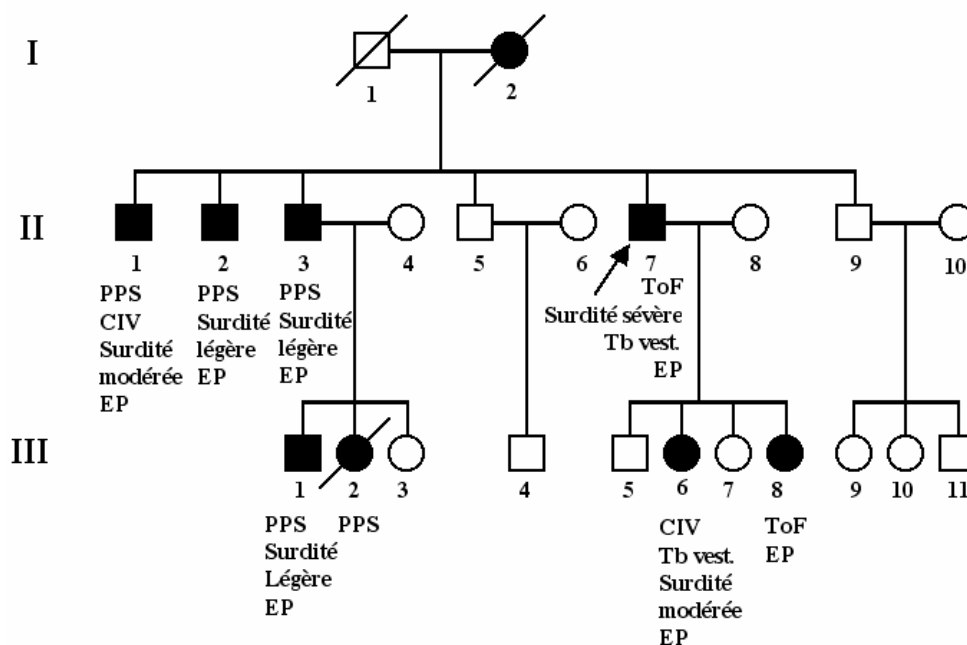
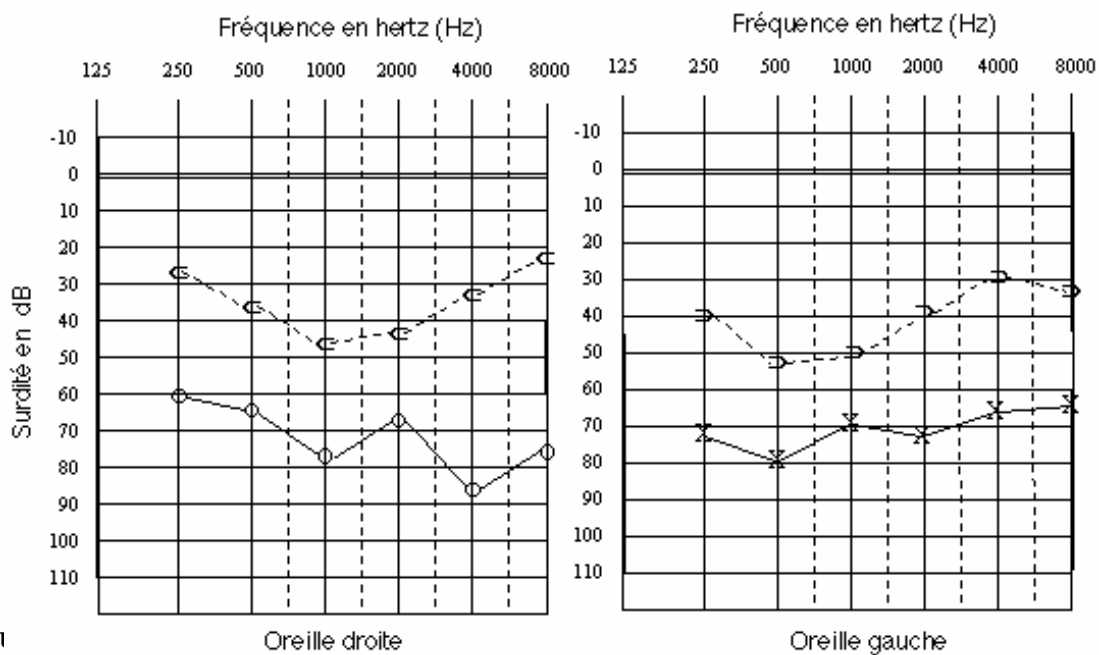


Figure 9 Pedigree représentatif de la famille B et présentation clinique des individus malades. Les symboles noirs indiquent les individus malades, les symboles blancs indiquent les individus cliniquement sains. La flèche indique le proband. PPS : Sténose Périphérique de l'artère Pulmonaire ; CIV : Communication Interventriculaire ; EP : Embryotoxon Postérieur ; ToF : Tétralogie de Fallot ; Tb vest : Troubles vestibulaires.

De façon surprenante, l'interrogatoire, complété par un examen clinique, a permis de montrer que plusieurs membres étaient atteints de surdité. Deux patients, Jacques et sa fille III-6, bénéficiaient d'un appareillage auditif. À ce moment, il était encore difficile d'affirmer que cardiopathie et surdité co-ségrégeaient. Un audiogramme a donc été réalisé chez tous les membres de la famille et les audiogrammes anciens réanalysés (Figure 10). Six sur les sept patients présentant une cardiopathie avaient une surdité associée tandis qu'aucun membre sain n'avait de difficultés d'audition. Seule la jeune fille (III-8) avec tétralogie de Fallot ne présente pas de surdité. Au sein de la famille, la surdité est mixte et de sévérité variable affectant préférentiellement les fréquences moyennes.



Fig

Tableau 1 Comparaison des signes cliniques présentés par les individus atteints de la famille B. avec la fréquence des signes cliniques présentés par les patients atteints du syndrome d'Alagille.

II.1.2.1.2. Identification de la mutation C234Y

Plusieurs gènes dont *NKX2.5* et *JAG1* chez l'Homme ou *TBX1* et *NTF3* chez la souris sont mutés dans des cardiopathies syndromiques ou non (Donovan MJ et coll. 1996 ; Schott JJ et coll. 1998 ; Eldadah ZA et coll. 2001 ; Jerome LA et coll. 2001 ; Lindsay EA et coll. 2001 ; Merscher S et coll. 2001). À notre connaissance, aucun gène n'expliquait de façon évidente cette association inhabituelle. Parmi ces gènes, *JAG1* était candidat. La cardiopathie classique du syndrome d'Alagille consiste en une sténose périphérique des branches de l'artère pulmonaire, mais des tétralologies de Fallot sont également observées. En revanche, la surdité est inattendue et par ailleurs à l'interrogatoire, aucun membre de la famille n'a présenté de signe d'atteinte hépatique. Nous souhaitons donc exclure ces quelques gènes candidats avant une analyse complète du génome.

Un prélèvement sanguin a été réalisé chez les 14 personnes de la famille. Le caryotype d'un sujet atteint est normal et la recherche de microdélétion 22q11.2 négative. L'analyse des quelques gènes candidats sélectionnés a permis d'exclure une liaison à *NKX2.5*, *TBX1* et *NTF3*. En revanche, une liaison était mise en évidence dans la région de *JAG1* aux loci D20S115, D20S186 et D20S112 (Figure 12). Un calcul de *lod score* donne un résultat maximum à 3.01 à 0% de recombinaison au locus D20S186 (Lathrop GM et coll. 1984).

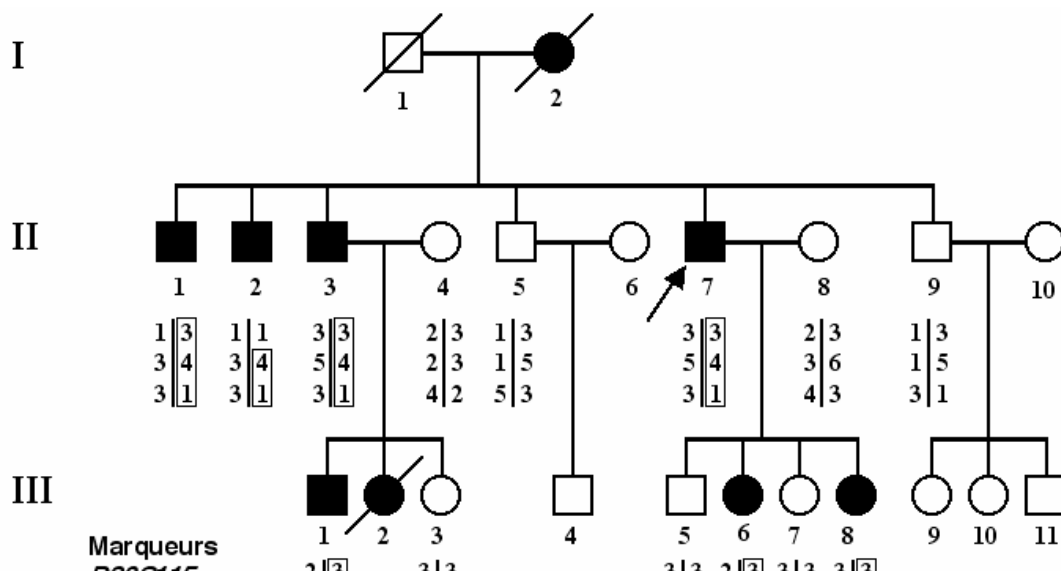


Figure 12 Pedigree de la famille B indiquant les haplotypes reconstitués grâce à 3 marqueurs polymorphes (*D20S115*, *D20S186* et *D20S112*) encadrant le gène *JAG1*. L'haplotype commun aux individus malades est encadré.

Le séquençage du gène réalisé à partir d'amorces publiées antérieurement (Krantz ID et coll. 1998) a ensuite permis l'identification d'une nouvelle mutation faux-sens, G701A (C234Y), dans l'exon 5 du gène au sein du premier motif EGF de la protéine (Figure 13).

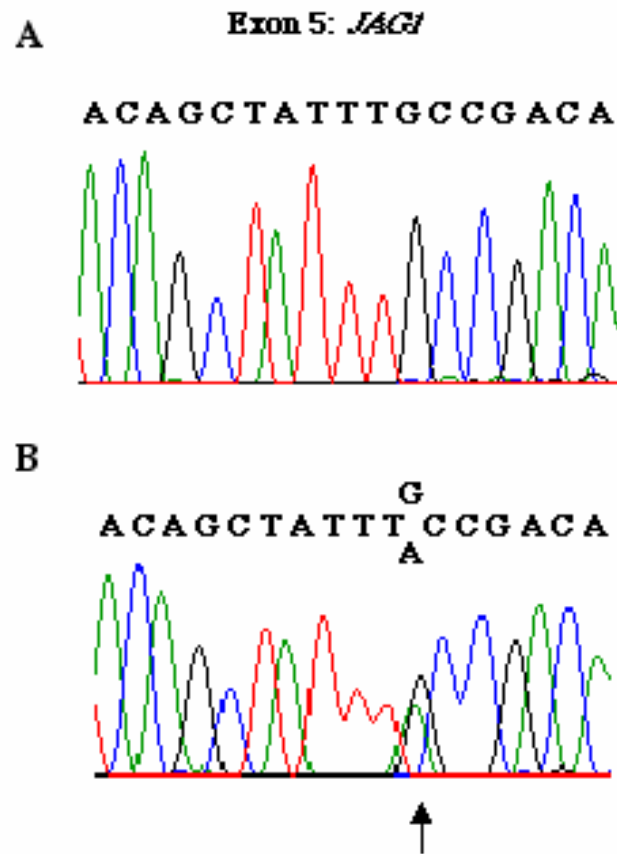


Figure 13 Séque
(C234Y) identifié

sain (II-8). B : Séquence d'un individu malade (II-7) avec superposition de l'allèle normal et de l'allèle morbide porteur de la mutation.

t la mutation G701A
normaux d'un individu

Hétérozygote G→A

II.1.2.1.3. Arguments en faveur du caractère délétère de la mutation C234Y

La mutation est présente chez les 7 individus malades et absente chez les 7 personnes saines. Le séquençage de l'exon 5 de plus de 100 chromosomes témoin n'a pas retrouvé de variation à cette base.

Le domaine extracellulaire de la protéine JAG1 est constitué dans sa partie intermédiaire de 16 motifs EGF-like. Au sein de chaque motif, 6 résidus cystéine créent trois ponts dissulfures (Aoyama T et coll. 1993 ; Downing AK et coll. 1996). Les ponts dissulfures permettent une conformation tridimensionnelle protéique stable, importante dans la fixation de calcium et les interactions protéine-protéine (Schrijver I et coll. 1999). Parmi les 16 motifs EGF-like de la protéine JAG1, une forte affinité entre le récepteur Notch et les deux premiers motifs a été montrée (Shimizu K et coll. 1999). La perte d'un résidu cystéine conservé au sein d'un motif EGF-like est observée dans d'autres maladies génétiques dont la maladie de Marfan ou le CADASIL. La majorité des mutations de *JAG1* conduit à des protéines tronquées. Seules 26 mutations faux-sens sont décrites dont 12 dans les motifs EGF-like (Figure 14). Les mutations faux-sens des motifs EGF-like sont regroupées dans deux régions, entre les motifs 1 et 6 et dans le motif 13. Huit mutations sur les 9 décrites créent ou suppriment un résidu cystéine. La mutation C234Y remplace la première des 6 cystéines par une tyrosine au sein du premier motif EGF de la protéine JAG1. Ce changement d'acide aminé est très probablement responsable d'une modification de la structure tridimensionnelle de la protéine par rupture du premier pont affectant ainsi sa fonction.

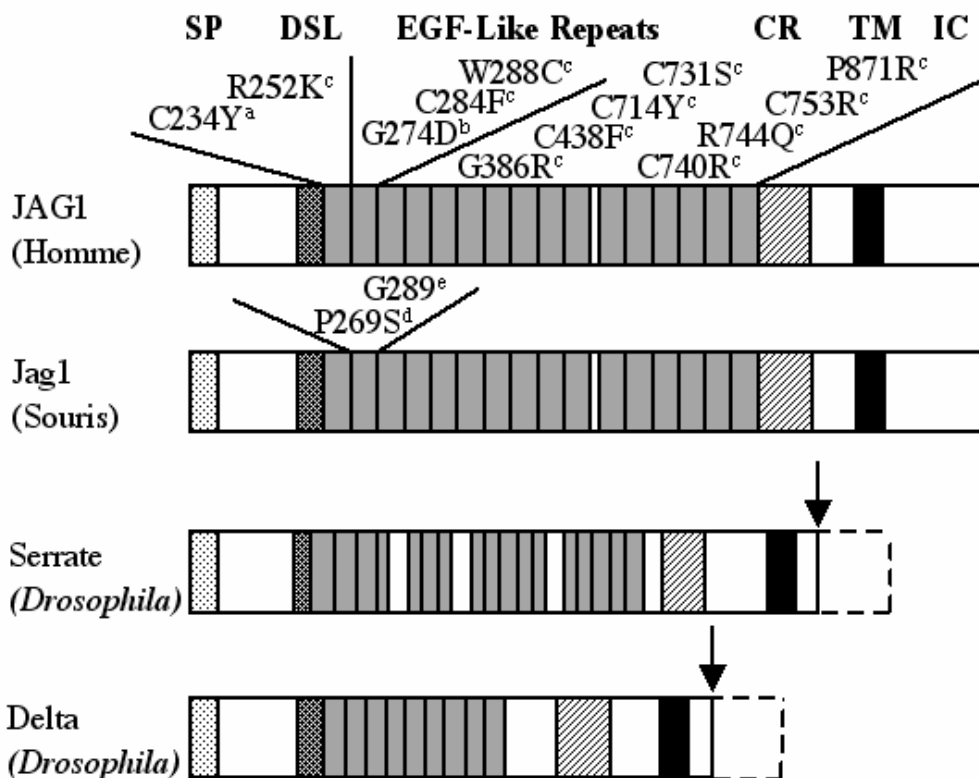


Figure murine, Serrate et Delta de la Drosophile et la position des mutations faux-sens identifiées dans les motifs EGF-like des protéines JAG1 humaine et Jag1 murine. Les flèches indiquent une délétion terminale de Serrate ou Delta. La signification des lettres en exposant est la suivante : a : mutation décrite dans la famille B ; b : mutation décrite dans une famille associant tétralogie de Fallot et faciès caractéristique (Eldadah et coll. 2001); c : mutations faux-sens décrites chez des patients avec syndrome d’Alagille ; d : mutation décrite chez le mutant murin *Slalom* ; e : mutation décrite chez le mutant murin *Headturner*. SP : Signal Peptide ; DSL : domaine conservé dans les protéines Delta, Serrate et Lag2 ; CR : Région riche en Cystéine ; TM : domaine Transmembranaire ; IC : domaine Intracellulaire.

La première cystéine des motifs EGF-like de la protéine JAG1 ou d’orthologues est un acide aminé très conservé au cours de l’évolution, signe de son importance. Ainsi, elle est conservée chez d’autres vertébrés dont la souris, le poulet, le poisson zébrafish, ou le xénope mais également chez la drosophile. Chez l’Homme, cette cystéine est également conservée dans JAG2, protéine dont la structure est proche de celle de JAG1 (Figure 15).

Homo sapiens	JAG1	EGF1	CRQG--CSPKHGSC ^c KLPGDC ^c RCQYGWQGLY ^c CDK
Homo sapiens	JAG2	EGF1	CKQG--CNLLHGGCTVPGE ^c CRCSY ^c GWQGRFC ^c DE
Homo sapiens	JAG1	EGF2	CIPHPGCVHGI - - CNEPWQCL ^c ETNWWGGQL ^c CDK
Mouse	Jag1	EGF1	CRQG--CSPKHGSC ^c KLPGDC ^c RCQYGWQGLY ^c CDK
Gallus	C-Serrate 2	EGF1	CKQG--CNLLHGGCSVPGE ^c CK ^c CHY ^c GWQGQY ^c CDE

Figure 15 Alignement de la séquence d'acides aminés du premier motif EGF-like de la protéine JAG1 humaine avec les séquences correspondantes du premier motif EGF-like de la protéine JAG2 humaine, du second motif EGF-like de la protéine JAG1 humaine et de motifs EGF-like d'autres espèces. Notez la grande conservation de la première cystéine des motifs EGF-like.

II.1.2.1.4. Le gène *JAG1* et la surdité

Nous décrivons un phénotype original associant surdité et malformation cardiaque liée à une nouvelle mutation au sein de *JAG1*. La surdité a été décrite chez quelques patients atteints de syndrome d'Alagille avec délétion chromosomique cytogénétiquement visible en 20p (Anad F et coll. 1990). En revanche, la surdité n'est décrite dans aucune des grandes séries de patients avec syndrome d'Alagille. Ces données suggéraient que la surdité était liée à un syndrome des gènes contigus (Krantz ID et coll. 1997).

Plusieurs arguments viennent cependant conforter l'implication de cette protéine dans la surdité :

- JAG1 est exprimée dans l'oreille interne chez l'Homme et d'autres espèces (Crosnier C et coll. 2000).
- Le mutant murin *Headturner* présente des troubles vestibulaires liés à une mutation faux-sens, G289D, dans *Jag1* (Kiernan AE et coll. 2001). Des anomalies de l'organe de Corti avec diminution du nombre de cellules ciliées externes ainsi qu'absence de l'ampoule postérieure et parfois antérieure et aplasie des canaux semi-circulaires correspondants sont également notées. Malgré ces anomalies, le mutant *Headturner* n'est pas sourd, bien que des troubles non statistiquement significatifs aux potentiels évoqués auditifs aient été notés. Un phénotype murin similaire, *Slalom*, également porteur d'une mutation faux sens, P269S, présente des troubles vestibulaires (Tsai H et coll. 2001).

- Des malformations sévères des os temporaux de quatre patients atteints de syndrome d'Alagille ont été mises en évidence lors d'examens autopsiques. Ces patients présentent une aplasie partielle ou complète des canaux semi-circulaires antérieurs ou postérieurs. La cochlée est retrouvée raccourcie dans un cas. L'audiogramme d'un patient révèle une surdité mixte modérée (Okuno T et coll. 1990).
- Enfin, plusieurs membres d'une grande famille atteints de syndrome d'Alagille étaient atteints de surdité (LaBrecque DR et coll. 1982). Les caryotypes étaient normaux. Un père et deux de ses enfants avaient une surdité de transmission légère et au moins deux autres membres de la famille étaient connus pour avoir des difficultés d'audition.

L'association cardiopathie conotruncale et surdité est rare et, à notre connaissance, n'a jamais été constatée au CHU de Nantes. En revanche, en un an, 6 patients suivis dans le service d'ORL spécialisé dans les surdités à l'hôpital d'enfants Armand-Trousseau, Paris ont pu être inclus dans l'étude. Aucune mutation n'a été identifiée après séquençage de la région codante de *JAG1*. Ces résultats négatifs indiquent que *JAG1* ne joue pas un rôle majeur dans l'apparition de l'association cardiopathie conotruncale et surdité.

Nous n'avons pas évalué le rôle de *JAG1* dans les surdités non syndromiques, génétiquement très hétérogènes. Il est en effet très probable que ce gène soit peu représenté parmi les nombreux autres gènes déjà connus.

II.1.2.1.5. Suivi clinique et biologique de la famille

Le diagnostic de ce phénotype original a conduit à une nouvelle évaluation clinique des patients atteints de la famille. Un bilan complet à la recherche des autres signes de syndrome d'Alagille a été réalisé. Une radiographie du rachis de face et de profil n'a montré aucune anomalie vertébrale. Un examen ophtalmologique a retrouvé un embryotoxon postérieur asymptomatique chez tous les individus mutés. Les patients n'ont ni retard de croissance, ni retard mental. Il n'est pas noté non plus de dysmorphie faciale caractéristique, mais ce signe est particulièrement subjectif. Le bilan biologique, comprenant ionogramme sanguin, urée, créatinine, bilirubine totale et conjuguée, transaminases, gamma-glutamyl transférase et phosphatase alcaline, est normal.

À distance du diagnostic, le suivi hépatique clinique et biologique des patients est normal. En revanche, une insuffisance rénale est découverte chez le patient II-1 (Créatinine à

190 microM pour une normale 65 à 105 microM) et chez le patient II-3 (Créatinine à 142 microM).

II.1.2.1.6. Le syndrome d'Alagille et les anomalies rénales

Des anomalies rénales variées sont décrites dans le syndrome d'Alagille. La mésangioliipidose glomérulaire est cependant l'anomalie la plus spécifique. Elle se traduit par des dépôts lipidiques dans la matrice mésangiale et la membrane basale glomérulaire (Chung-Park M et coll. 1982 ; Habib R et coll. 1987). Il a été suggéré que ces dépôts lipidiques sont la conséquence de la choléstase chronique, pratiquement constante dans le syndrome d'Alagille, et qu'ils participent à l'installation des troubles rénaux.

Or, les patients de la famille que nous décrivons ne présentent pas de dysfonction hépatique laissant penser que l'anomalie rénale est le résultat d'un défaut de développement plutôt qu'un trouble secondaire. Par ailleurs, l'ARN messager de *JAG1* est fortement exprimé dans le rein (Crosnier C et coll. 2000). Plus encore, des modèles murins mutés pour *Jag1* ou *Notch* conduisent à des anomalies rénales, en particulier glomérulaires, suggérant que la protéine Jag1 est essentielle à un développement rénal normal (McCright B et coll. 2001).

Nous avons ainsi complété le bilan rénal chez tous les membres de la famille. Une bandelette urinaire a, dans un premier temps, été utilisée pour à la recherche d'une protéinurie ou d'une hématurie discrète chez toutes les personnes malades et saines de la famille. Toutes les personnes non mutées ont une bandelette normale tandis que tous les individus porteurs de la mutation ont une protéinurie. Dans un second temps, cette protéinurie a été confirmée et précisée chez tous les individus porteurs de la mutation grâce à une protéinurie des 24 heures. Elle semble s'aggraver avec l'âge et évoluer vers l'insuffisance rénale. Parallèlement, une biopsie rénale a été réalisée chez deux personnes de la famille (II-1 et II-3). Celles-ci montrent l'absence de lésions spécifiques mais également l'absence de dépôts lipidiques.

Nos résultats suggèrent que les anomalies rénales liées à JAG1 sont le résultat de troubles du développement rénal et pas seulement secondaire à la choléstase. Un article rapportant ce travail est en cours de rédaction en collaboration avec le service de néphrologie du CHU de Nantes.

II.1.2.2. Exploration des autres familles recrutées

Trois autres familles sont en cours d'étude selon les mêmes principes.

II.1.2.2.1. Etude de la famille G.

La famille G. est représentée par un couple sans antécédents, en particulier cardiaque. Parmi les cinq enfants de ce couple, un seul ne présente aucune atteinte cardiaque (II-2) tandis que deux présentent une tétralogie de Fallot (patients II-1 et II-4), l'un d'entre eux étant décédé de complications cardiaques (II-4). Le plus jeune (II-5) présente une communication interventriculaire isolée. Enfin, une grossesse a été interrompue (II-3) en raison du diagnostic d'une tétralogie de Fallot au-delà de toute ressource thérapeutique (Figure 16). Ces malformations cardiaques semblent non syndromiques. Une transmission autosomique récessive est compatible avec le pedigree. Un mosaïcisme germinale ou un défaut de pénétrance chez l'un des deux parents cliniquement sain sont également des mécanismes possibles bien que moins probables.

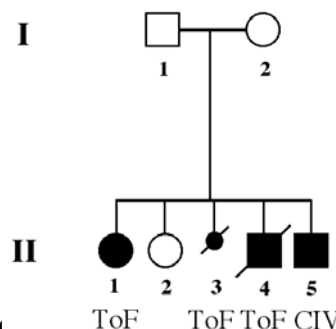


Figure 16 Pedigree représentatif de la famille G. Les symboles noirs indiquent les individus malades, les symboles blancs indiquent les individus cliniquement sains. ToF : Tétralogie de Fallot ; CIV : Communication Interventriculaire.

La petite taille de la famille ne permet pas d'envisager d'analyse de liaison. En revanche, le séquençage des quelques gènes candidats, *NKX2.5*, *TBX1*, *TBX5* a été réalisé grâce à l'ADN du patient II-1, mais aucune mutation n'a été identifiée.

II.1.2.2.2. Etude de la famille L.

La famille L. au sein de laquelle plusieurs membres présentent une cardiopathie de forme variable est également en cours d'exploration (Figure 17). Plusieurs enfants décédés à

la naissance avaient une tétralogie de Fallot (III-12 et III-15) tandis que d'autres présentent une sténose valvulaire pulmonaire (IV-12 et IV-13), une coarctation de l'aorte (IV-14) ou une communication interauriculaire large nécessitant une intervention chirurgicale (IV-15). Au sein de cette famille, il est très probable qu'un gène majeur explique l'agrégation excessive de malformations cardiaques.

Figure 17 Pedigree représentatif de la famille L. Les symboles noirs indiquent les individus malades, les symboles blancs indiquent les individus cliniquement sains, les symboles gris les individus pour lesquels le statut est incertain. ToF : Tétralogie de Fallot ; CIA : Communication Interauriculaire ; SVP : Sténose Valvulaire Pulmonaire ; CoA : Coarctation de l'Aorte ; R Ao Calc : Rétrécissement Aortique Calcifié ; ? : Patient non évalué cliniquement.

Cette famille illustre les difficultés d'analyses de liaison à la recherche de gènes impliqués dans les malformations cardiaques. La première difficulté est le défaut de pénétrance. L'examen clinique complété par une échocardiographie des sujets III-11 et III-17 est strictement normal et pourtant ils ont au moins un enfant atteint. Cette difficulté a pour conséquence de ne pouvoir inclure que les individus cliniquement atteints et les sujets « conducteurs obligatoires » dont les sujets III-11 et III-17. En revanche, le statut sain ou atteint des autres personnes ne pouvant être déterminé, leur inclusion n'est pas possible (ex : sujet III-1). La deuxième difficulté est liée au fait que certains sujets atteints sont décédés jeunes ou à la naissance de la malformation cardiaque et que leur ADN n'est pas disponible. L'étude de cette famille a, par ailleurs, été pénalisée par le refus de participation des patients III-13, III-14 et IV-14.

A l'inverse, une approche gène candidat est envisageable. Ainsi, le séquençage des quelques gènes candidats, *NKX2.5*, *TBX1*, *TBX5* a été réalisé grâce à l'ADN du patient IV-12. Aucune mutation n'a été identifiée. La petite taille des familles, les défauts de pénétrance et la non-accessibilité de certains prélèvements réduisent les chances de succès d'une analyse de liaison appliquée à cette famille.

II.1.2.2.3. Etude de la famille T.

Enfin, une quatrième famille, T., dont plusieurs membres (I-2, II-2 et II-3) présentent une sténose de l'artère pulmonaire sans autre signe associé est également en cours d'étude (Figure 18). La sténose de l'artère pulmonaire étant la malformation cardiaque retrouvée le plus fréquemment dans le syndrome d'Alagille, nous avons réalisé le séquençage du gène *JAG1*. Aucune mutation n'a été identifiée.

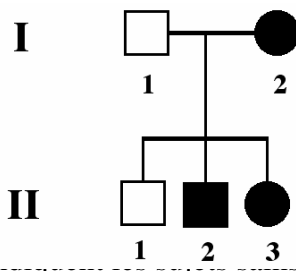


Figure 18 Pedigree représentant la famille T. Les symboles noirs indiquent les individus malades, les symboles blancs indiquent les individus sains.

II.1.3. Exploration des cas sporadiques

Tom examiné dans le service de Génétique Médicale du CHU de Nantes à l'âge de 18 mois présente une malformation cardiaque associant communication interauriculaire de type ostium secundum de 4-5 mm, communication interventriculaire musculaire de 1-2 mm, canal artériel étroit et isthme aortique réduit, d'un diamètre de 2-3 mm, compliquée d'un trouble du rythme cardiaque de type Wolf-Parkinson-White traité par Cardarone. Un pied bot varus équin droit, une imperforation bilatérale des canaux lacrymaux et un retard des acquisitions psychomotrices (niveau 9-10 mois pour un âge de 18 mois) ainsi que des vertèbres en ailes de papillon (C1, D4, D6, D7, D8, D9, D11 et D12) sont observés (Figure 8). Il n'est cependant pas noté d'embryotoxon postérieur ni de dysmorphie faciale évocatrice. Le bilan biologique comprenant un bilan hépatique est normal. En revanche, le caryotype sanguin met en évidence une translocation réciproque équilibrée 46,XY,t(1;6)(p31;q16). Les caryotypes parentaux normaux précisent que la translocation est *de novo*.

Deux principales explications à ce tableau peuvent être proposées :

- un nouveau syndrome lié à un gène interrompu ou à une délétion infracytogénétique au point de cassure de la translocation
- une mutation ou un remaniement chromosomique sans lien avec la translocation t(1;6). La translocation serait alors une association fortuite.

Avant de réaliser le clonage du point de cassure à l'aide de sondes BAC fluorescentes, nous avons souhaité éliminer le gène *JAG1*, localisé en 20p12. En effet, l'anomalie vertébrale de cette atteinte peut faire évoquer un syndrome d'Alagille. Le séquençage de la région codante de *JAG1* n'a mis en évidence aucune mutation. En revanche l'hybridation *in situ* en fluorescence réalisée grâce à une sonde BAC couvrant *JAG1* (RP5-1099D15) a montré une délétion de *JAG1* sur l'un des deux chromosomes 20 (Figure 19). Cette délétion est absente chez les parents, indiquant un remaniement *de novo*.

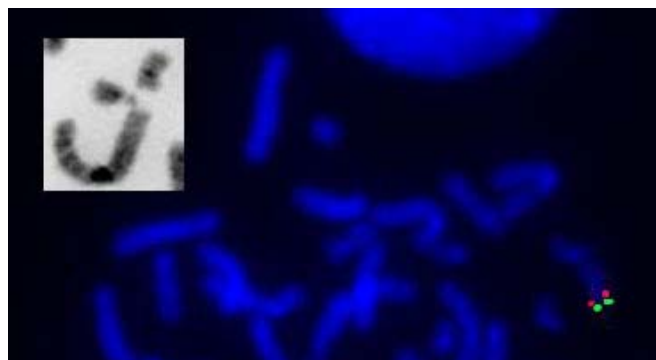


Figure 19 Hybridation *in situ* en fluorescence réalisée grâce à une sonde marquée en orange couvrant *JAG1* (RP5-1099D15) montrant une délétion de *JAG1* sur l'un des deux chromosomes 20 et une sonde verte centromérique (RP5-1098F8) présente en deux exemplaires. La flèche indique la sonde délétée

Dans un second temps, afin de préciser la taille de la délétion, nous avons réalisé plusieurs hybridations *in situ* en fluorescence. Parmi les 2 sondes centromériques utilisées, la sonde RP1-278O22 distante de 100 kb est délétée tandis que la sonde RP5-1098F8 distante de 1.5 Mb est présente en deux exemplaires. Parmi les 2 sondes télomériques la sonde RP11-430K20 distante de 1.5 Mb est délétée tandis que la sonde RP5-1121J18 distante de 3 Mb est présente en deux exemplaires (Figure 20). Dans cette situation, la translocation réciproque n'a pas de lien avec le tableau malformatif.

Chromosome 20

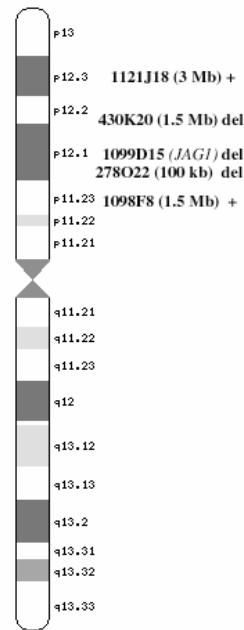


Figure 20 Représentation schéma en hybridation *in situ* en fluorescence et leur distance respective par rapport à *JAG1* sont indiqués. del : sonde déléetée ; + : sonde non déléetée. numéros des sondes utilisées

Cette observation est intéressante à plusieurs égards. Les délétions de *JAG1* sont rares et le tableau clinique associant un syndrome de Wolf-Parkinson-White n'est, à notre connaissance, pas décrit dans le syndrome d'Alagille. Il est difficile de savoir si ce trouble du rythme est primaire ou au contraire secondaire à la malformation cardiaque. Enfin, cette association fortuite de deux évènements rares (une translocation réciproque *de novo* et une délétion *de novo* intéressant un chromosome différent de ceux qui sont impliqués dans la translocation) illustre certains pièges rencontrés.

Pendant la période 01.01.2001-31.12.2003, notre protocole prévoyait l'inclusion d'enfants présentant une tétralogie de Fallot sporadique. Nous souhaitions pouvoir disposer d'une centaine de prélèvements sanguins d'enfants malades et de leurs parents respectifs. Ces échantillons nous auraient été très utiles pour tester de nouveaux gènes candidats voire d'envisager des études d'association-liaison. Malheureusement, nous n'avons pu recueillir que 4 cas sporadiques. Ce volet du travail représente incontestablement un échec.

II.2. Recrutement de fœtus avec plusieurs malformations dont une malformation cardiaque pour la plupart et exploration par la technique de CGH array

II.2.1. Recrutement des fœtus

Une seconde étude consistant à explorer un groupe de fœtus polymalformés par la technique de CGH array a été menée. Le PHRC a reçu un avis favorable du conseil scientifique du CHU de Nantes (Annexe 3). Le financement de consommables à hauteur de 60 000 € a permis la réalisation du projet. Des lames produites par la société Vysis sont commercialisées depuis quelques mois. Plus de 300 sondes différentes dispersées sur tout le génome y sont déposées. Nous disposons au laboratoire du système de lecture (scanner laser) et d'analyse de ces lames (Genosensor, Vysis). Cette approche par puce à ADN permet un diagnostic rapide par la mise en évidence d'un remaniement de petite taille impliquant un ou plusieurs des 300 clones fixés sur la puce.

Cette étude rétrospective réalisée par CGH array a porté sur 55 fœtus (mort fœtale *in utero*, interruption médicale de grossesse), enfants morts nés ou décédés dans la période néonatale précoce, porteurs d'un syndrome polymalformatif pour lesquels au moins un tissu congelé est disponible et pour lesquels aucun diagnostic n'a pu être établi. Parmi ces 55 fœtus, 40 présentent un syndrome polymalformatif intégrant une anomalie cardiaque. La mise en évidence d'une étiologie chromosomique infracytogénétique a deux intérêts. L'un immédiat pour le conseil génétique. L'identification d'un remaniement parental équilibré permet en effet une meilleure estimation d'un éventuel risque de récurrence. Le second intérêt est de concentrer les efforts de recherche des gènes du développement dans les régions chromosomiques les plus fortement associées à une malformation cardiaque.

II.2.2. Identification de 9 remaniements chromosomiques

II.2.2.1. Foetus FR... porteur d'une microdélétion 22q11.2

Il s'agit de la première grossesse d'un couple dont la femme a développé une maladie de Crohn, ne nécessitant actuellement pas de traitement, sans autres particularités. L'échographie réalisée à 22 SA met en évidence un anamnios en rapport avec une agénésie rénale bilatérale. Après interruption médicale de grossesse, l'examen fœtopathologique a confirmé l'agénésie rénale bilatérale associée à d'autres malformations : une interruption complète de l'arche aortique avec artère sous clavière droite rétro-œsophagienne mais absence de communication interventriculaire, une hypoplasie thymique majeure, une agénésie utérine,

vaginale et probablement tubaire bilatérale avec des bandelettes ovariennes allongées. Le caryotype est normal 46,XX. Une recherche de microdélétion 22q11.2 est recherchée mais n'est pas contributive en raison d'un faible nombre de cellules analysables.

La technique de CGH array a permis la mise en évidence d'une délétion au locus 22q11.2 avec 3 clones délétés (RP1-157 E19, RP1-238 C15, RP11-316 L10) (Figure 21). La recherche de microdélétion chez les parents est négative précisant le caractère *de novo* du remaniement.

L'agénésie rénale unilatérale est parfois observée dans la microdélétion 22q11.2 (Ryan AK et coll. 1997). A notre connaissance, une seule observation rapporte une agénésie rénale d'un côté et un rein dysplasique de l'autre associés à des anomalies de la sphère génitale (Devriendt K et coll. 1997). Les ovaires apparaissaient allongés, l'utérus, les trompes et la portion proximale du vagin étaient également absents. Dans cette observation, la dysmorphie faciale évocatrice du père a fait évoquer aux auteurs de l'article une microdélétion 22q11.2 confirmée par la FISH.

Ce second cas de microdélétion 22q11.2 avec anomalies rénales et génitales renforce l'idée du spectre phénotypique étendu de ce remaniement.

II.2.2.2. Fœtus BR... porteur d'une délétion 15q terminale

Le couple est sans particularités en dehors d'une hypofertilité masculine liée à une oligoasthénospermie sévère. Une grossesse est cependant obtenue après insémination artificielle avec sperme du conjoint. L'échographie réalisée à 11 SA et 4 jours met en évidence une clarté nucale à 6.1 mm avec œdème de la région thoraco-abdominale. Le caryotype obtenu après biopsie de trophoblaste est normal 46,XX. À 22,5 SA un retard de croissance intra-utérin sévère, une malformation cardiaque à type de ventricule droit à double issue avec hypoplasie du ventricule gauche et de la valve mitrale, des pieds bots bilatéraux et un oligoamnios sont notés. Devant la sévérité du tableau, une interruption médicale de grossesse est décidée avec le couple. L'examen fœtopathologique confirme les anomalies observées en anténatal. Des anomalies du situs abdominal à type de dextro-isomérisme (foie médian, asplénie, mésentère commun), une hypotrophie rénale majeure avec reins microkystiques, une microvessie, un utérus bifide hypoplasique et une hypotrophie ovarienne bilatérale sont également observés.

La technique de CGH array a permis la mise en évidence d'une délétion 15q terminale intéressant deux clones (CTD-2353 N21, RP1-154 P1) (Figure 21). Les caryotypes parentaux

sont normaux et la FISH réalisée grâce au clone RP1-154 P1 ne met pas en évidence de remaniement intéressant les chromosomes 15 indiquant une délétion 15q terminale *de novo* chez le fœtus. Le conseil génétique est rassurant, l'anomalie étant très probablement accidentelle. Récemment, après une grossesse spontanée, le couple a eu un enfant en bonne santé. Le tableau observé dans la délétion 15q26-qter associe retard de croissance intra-utérin sévère, microcéphalie, dysmorphie faciale, anomalies rénales, hypoplasie pulmonaire et retard mental (Nagai T et coll. 2002). Le fœtus que nous décrivons présente certains éléments de la description classique, mais également des anomalies génitales, cardiaques et de situs abdominal. Ceci laisse penser qu'un gène impliqué dans la latéralisation pourrait être localisé dans cette région chromosomique.

II.2.2.3. Fœtus CA... porteur d'une délétion 6q terminale

Le couple est jeune et sans particularités. Madame CA... a eu un garçon en bonne santé d'une première union. Elle a ensuite donné naissance à une fille en bonne santé avec son conjoint actuel.

La troisième grossesse de découverte tardive obtenue après échec de contraception n'a été suivie que tardivement. L'échographie réalisée à 20 SA et 4 jours met en évidence une hernie diaphragmatique gauche avec déviation du cœur à droite, ascension de l'estomac et de l'intestin grêle dans le thorax. Une hypoplasie du cervelet, une dysmorphie faciale avec microrétrognathisme, un anneau aortique plus petit que l'anneau pulmonaire, des pieds en varus équins et une brachymésophalangie bilatérale sont également notés. Un caryotype sur amniocytes est normal 46,XY. Devant la sévérité du tableau, une interruption médicale de grossesse est décidée avec le couple. L'examen foetopathologique confirme les anomalies anténatales. Une hypoplasie modérée du ventricule gauche et une hypoplasie pulmonaire sévère sont également notées. L'examen du cerveau est évocateur d'une hypoplasie néo-ponto-cérébelleuse.

Le couple a mené une quatrième grossesse au cours de laquelle une amniocentèse est réalisée en raison d'une estimation du risque de trisomie 21 obtenu par dosage des marqueurs sériques maternels anormal (1/248). Le caryotype fœtal effectué sur amniocytes est normal 46,XX. L'échographie de 30 SA a relevé une hypoplasie du cervelet associée à une dilatation ventriculaire évolutive à 20 mm. L'interruption médicale de grossesse est décidée avec le couple. L'examen foetopathologique confirme les anomalies cérébrales à type d'hypoplasie ponto-cérébelleuse et d'hydrocéphalie triventriculaire modérée sans autre anomalie associée.

La technique de CGH array réalisée sur le premier fœtus met en évidence une délétion d'un seul clone (RP1-57H24) correspondant à l'extrémité 6q terminale (Figure 21). Le caryotype réalisé chez les parents est normal. En revanche, la FISH réalisée grâce à cette même sonde est normale chez le père, mais indique une délétion chez la mère sur un des deux chromosomes. La présence de la délétion présente chez le fœtus et la mère pourrait laisser penser qu'elle n'est qu'un polymorphisme neutre sans lien avec la pathologie. Deux arguments plaident cependant en faveur d'un rôle joué par la délétion dans le phénotype observé. Tout d'abord, la sonde 6q terminale n'est pas connue pour être polymorphe. À ce jour, plusieurs milliers de patients ont été testés grâce à cette sonde et nous n'avons pas connaissance de polymorphisme associé à cette sonde. Ensuite, la hernie diaphragmatique a été décrite chez 2 enfants avec délétion 6q terminale (Schwartz MF et coll. 1984 ; Krassikoff N et coll. 1990).

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer un rôle de cette délétion dans le phénotype observé :

- Une variabilité d'expression phénotypique bien connue d'autres microdélétions dont le syndrome 22q11.2. La délétion serait identique chez la mère et les fœtus mais la mère n'exprimerait pas de signes
- Un gène s'exprimant à l'état récessif. La délétion chez la mère serait responsable d'une haploinsuffisance d'un ou de plusieurs gènes. Le père serait porteur d'une mutation au sein d'un gène de la région. Le fœtus aurait hérité d'un allèle délété de la mère et de la mutation héritée du père sur l'autre allèle
- Une taille variable de la délétion. Elle peut être de petite taille chez la mère et de plus grande taille chez les fœtus. Les délétions ne sont pas visibles en cytogénétique classique qui n'est donc d'aucune aide. Nous ne disposons pas de suffisamment de métaphases du premier fœtus pour réaliser des hybridations *in situ* en fluorescence à partir de sondes étagées de la partie terminale du bras long du chromosome 6 pour répondre à cette question. La seule possibilité serait de pouvoir disposer d'une lame de CGH array sur laquelle quelques dizaines de sondes de la région seraient déposées. Actuellement, nous ne disposons pas de ce matériel et il nous est difficile de poursuivre ces investigations.

II.2.2.4. Fœtus LA... porteur d'une délétion 16q interstitielle

Il s'agit de la première grossesse d'un couple jeune sans particularités. L'échographie réalisée à 12.5 SA met en évidence un pli cervical mesuré à 4 mm avec une image liquidienne intra-pelvienne anormale pouvant correspondre à une vessie. Le caryotype réalisé sur villosités choriales est normal 46,XY. À 20 SA, une nouvelle échographie retrouve une cardiopathie et des anomalies rénales qui conduisent le couple à demander l'interruption médicale de grossesse. L'examen foetopathologique réalisé au décours révèle une dysmorphie faciale avec un nez court, une grande bouche aux lèvres fines et des oreilles bas implantées. Une malformation cardiaque consistant en une atrésie pulmonaire orificielle associée à une communication interventriculaire et interauriculaire, une polysplénie, deux reins dysplasiques multikystiques avec méga-uretères, une très grosse vessie, une paroi abdominale amincie et une artère ombilicale unique sont également observés.

La technique de CGH array met en évidence une délétion interstitielle sur le bras long du chromosome 16. Deux clones voisins sont délétés : les clones RP6-200H22 en 16q23.2 et RP11-43L5 en 16q24.2-q24.3 (Figure 21). La distance physique estimée entre ces deux clones grâce aux nouvelles cartes génétiques (www.ensembl.org/) est d'environ 5.1 Mb. Une FISH réalisée grâce à ces deux clones chez les parents montre l'absence de remaniement de la région indiquant qu'il ne s'agit très probablement pas d'un polymorphisme neutre mais bien d'une délétion responsable de la pathologie observée.

II.2.2.5. Fœtus PA... porteur d'une trisomie 21

Il s'agit de la première grossesse d'un couple jeune sans particularités. Les échographies des premier et deuxième trimestres sont normales. En revanche, l'échographie réalisée à 32 SA met en évidence, de façon isolée, une longueur fémorale en deçà des autres valeurs. Le caryotype fœtal n'est pas réalisé et le fœtus décède naturellement à 38 SA. L'examen foetopathologique révèle une dysmorphie faciale avec craniosténoses métopique et coronale, une protrusion des globes oculaires, un discret hypertélorisme, un nez plat, une légère macroglossie et des oreilles mal ourlées en rotation postérieure. Les mains sont anormales avec brachymésophalangie bilatérale et polydactylie préaxiale droite. Le cœur présente une large communication auriculo-ventriculaire avec isthme aortique étroit. Le caryotype sur tissu fœtal n'a pu être obtenu en raison d'une absence de pousse cellulaire.

La technique de CGH array met en évidence une trisomie 21 grâce à 5 clones du chromosome 21 présents en trois copies (Figure 21). Un excès de polydactylie préaxiale semble être associé à la trisomie 21 (Castilla EE et coll. 1998). Les observations rapportées sont cependant rares (Ramanan AV et coll. 1999). Les données échographiques anténatales, les anomalies identifiées à l'examen fœtopathologique en particulier la polydactylie préaxiale et la craniosténose, deux signes rarement associés à cette anomalie chromosomique, et l'échec du caryotype n'ont pas conduit au diagnostic de trisomie 21 avant l'analyse par puce à ADN. Les caryotypes parentaux sont normaux indiquant une trisomie 21 *de novo* chez le fœtus. Le conseil génétique donné au couple est rassurant. L'anomalie est très probablement accidentelle, le risque de récurrence est faible. Cette observation illustre également la difficulté de diagnostic de maladies pourtant fréquentes lorsque la présentation est inhabituelle.

II.2.2.6. Quatre fœtus avec duplication 10q terminale

Une duplication 10q terminale est mise en évidence chez 4 fœtus. Les clones CTD-2545L18 et GS1-261B16 apparaissent en trois copies. L'étude des parents est en cours. Le rôle de cette duplication n'est pas clairement établi, mais la duplication 10q terminale est retrouvée chez près de 10% de sujets d'une population témoin. Il est probable que ces polymorphismes n'aient pas de rôle dans ces malformations. Ceci reste cependant à démontrer, un travail a en effet montré que la taille de la délétion pouvait être différente chez l'enfant et la mère ou le père indiquant un possible rôle du remaniement (Waggoner D et coll. 2003).

Toutes les anomalies identifiées par technique de CGH array ont été confirmés par la technique de QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Small Fluorescent Fragments*) en collaboration avec le Dr Saugier-Veber et le Pr Frébourg, INSERM EMI 9906, IRFMP, Faculté de Médecine, Rouen. Cette technique repose sur une PCR quantitative fluorescente et permet l'identification de délétion ou duplication de courts fragments, préférentiellement choisis au sein de séquences codantes conservées. Cette approche, bien que nouvelle, est validée par plusieurs travaux récents (Casilli F et coll. 2002 ; Jacquet H et coll. 2002 ; Bougeard G et coll. 2003). Cette confirmation par QMPSF a été obtenue avant de reprendre contact avec les parents pour lesquels nous avons identifié un remaniement chez leur fœtus.

Les résultats obtenus par notre étude (Tableau 2), bien qu'intéressants, ne permettent cependant pas l'identification de nouveaux gènes impliqués dans les cardiopathies conotruncales. Le nombre restreint de clones déposés sur la lame employée ne permet pas une couverture suffisante du génome. Une lame de seconde génération, sur laquelle est déposée plus de 3000 clones, soit un clone tous les mégabases, pourrait en revanche contribuer à l'identification de nouveaux gènes. Cette lame est en cours de développement dans quelques laboratoires dans le monde. Nous sommes en relation avec l'une d'elles, l'équipe de J. Vermesch à Louvain en Belgique, dans l'espoir de développer certaines collaborations.

	Cardiopathie	Localisation chromosomique	Clones délétés en fonction de la technique employée			Parents
			CGH array	FISH	QMPFSF	
Fœtus FR...	Interruption arche aortique	del 22q11.2	RP1-157 E19 RP1-238 C15 RP11-316 L10	Tuple 1	TBX1	Normaux <i>(de novo)</i>
Fœtus BR...	VDDI HypoVG	del 15qter	CTD-2353 N21 RP1-154 P1	RP1-154 P1	BLP2 FLJ25005	Normaux <i>(de novo)</i>
Fœtus CA...	HypoVG Anneau Ao petit	del 6qter	RP1-57 H24	ND	TBP DLL1	Mère délétée
Fœtus LA...	CIA, CIV Atrésie art. pulm	del 16q	RP6-200 H22 RP11-43 L5	ND	CDH13 WVVOX	Normaux <i>(de novo)</i>
Fœtus PA...	CAV Isthme aortique étroit	trisomie 21	RP1-98 L15 CTC-337 K2 RP11-119 A10 RP1-304 J23 RP11-746 N23 RP11 135 B17	ND	HRMT1 L1	Normaux <i>(de novo)</i>
Fœtus TR...	Normal	dup 10qter	CTD-2545 L18 GSI-261 B16	ND	CYP2E Loc93426	En attente
Fœtus VI...	Normal	dup 10qter	CTD-2545 L18 GSI-261 B16	ND	CYP2E Loc93426	En attente
Fœtus GU...	Normal	dup 10qter	CTD-2545 L18 GSI-261 B16	ND	CYP2E Loc93426	En attente
Fœtus FA...	CIV	dup 10qter	CTD-2545 L18 GSI-261 B16	ND	CYP2E Loc93426	En attente

Ta
chi

obtenus après étude des parents des 9 anomalies identifiées parmi les 55 fœtus polymalformés étudiés.

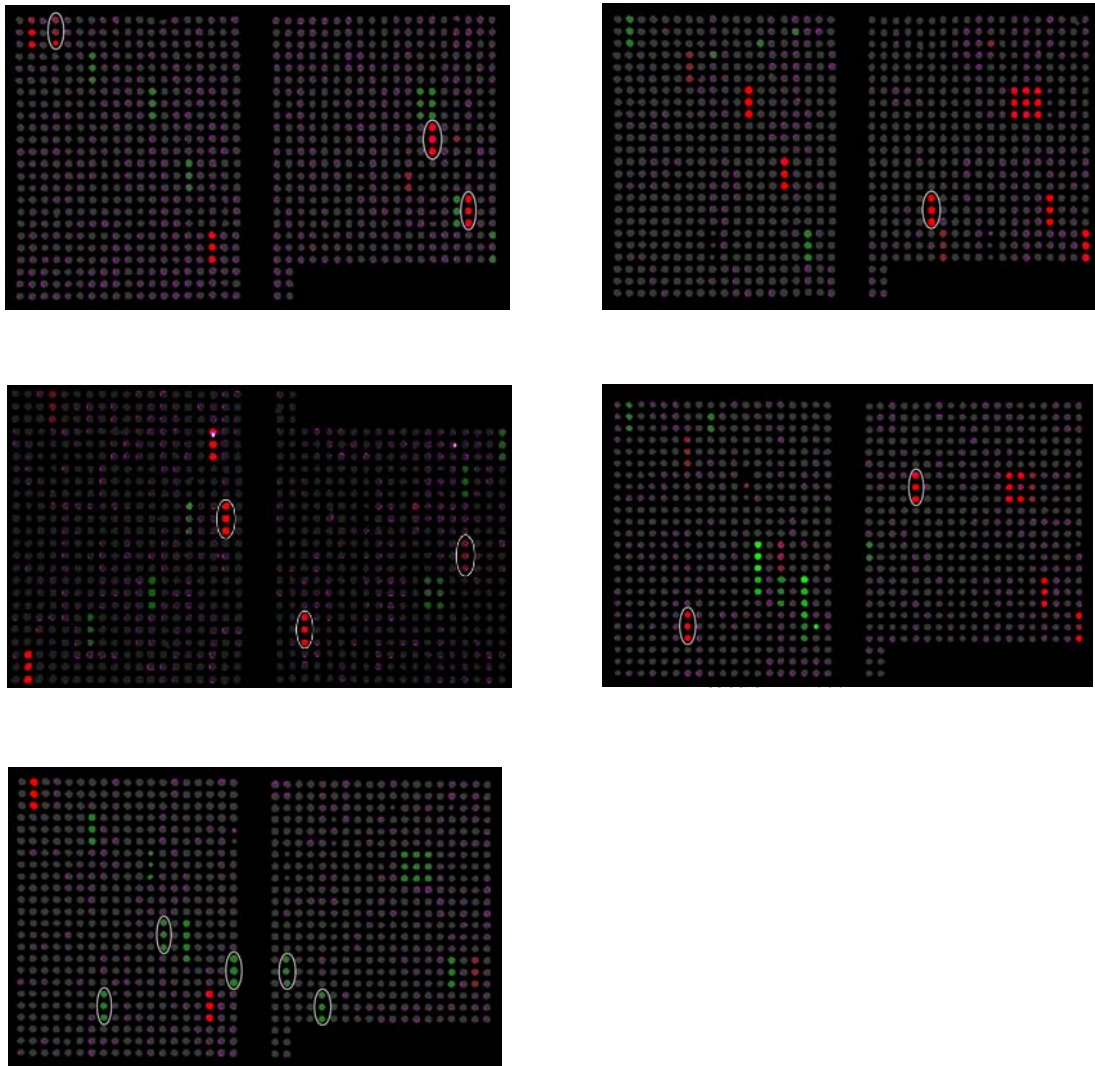


Figure 21 Images de CGH array des 4 fœtus avec délétions et du fœtus trisomique 21. Les clones délétés ou dupliqués sont entourés d'un cercle blanc. Les clones contrôles apparaissent en rouge ou en vert et ne sont pas cerclés. Les clones pour lesquels le ratio est normal (proche de 1) apparaissent en gris.

III. Synthèse et Conclusion

La fréquence élevée et la grande variabilité des malformations cardiaques congénitales sont le reflet de la complexité de l'embryogenèse du cœur. La récente identification de formes monogéniques de cardiopathies complexes a profondément modifié notre vision de ces anomalies que l'on pensait surtout liées à des facteurs environnementaux. La mise à jour des premières interactions moléculaires initie une compréhension plus globale du développement cardiaque normal, mais également pathologique conduisant aux cardiopathies conotruncales.

Dans ce chapitre, je vais tenter de faire la synthèse des récentes données embryologiques moléculaires.

III.1. Stades précoces du développement cardiaque

Ainsi, l'expression de *Nkx2.5* au sein de la plaque cardiogénique, appelée également champs cardiaques primaires morphorégulateurs, est un des premiers indicateurs de la différenciation cardiaque. Un champ morphorégulateur peut être défini comme une région dynamique pourvue d'un potentiel de développement (Jacobson AG et coll. 1988). De façon expérimentale, un champ se traduit par la possibilité qu'a un groupe de cellules extrait d'une région progénitrice de se différencier en une structure particulière *in vitro*. La voie de signalisation Notch semble intervenir dans la différenciation de cellules localisées en périphérie de la plaque cardiogénique en cellules myocardiques (Rones MS et coll. 2000). L'expression de *Serrate*, un des ligands de Notch, est réprimée dans les cellules myogéniques au moment de la différenciation grâce à une boucle de régulation négative qui est activée en réponse à la signalisation *Serrate/Notch*. Il semble que la voie de signalisation Notch soit importante dans la détermination des domaines myogéniques et non-myogéniques. Il est tentant de faire le lien avec les mutations identifiées au sein de *JAG1*, un des ligands de Notch chez l'Homme, responsables de malformations conotruncales. Un défaut dans cette voie de signalisation entraînerait une perturbation de la différenciation des cellules myogéniques à des stades précoces du développement cardiaque.

III.2. Des programmes transcriptionnels différents selon la région cardiaque

Puis, la fusion sur la ligne médiane des deux tubes cardiaques latéraux constitués de cellules différenciées myocardiques et endothéliales conduit à la formation du tube cardiaque primitif. Or, très précocement, des cellules de différentes régions de la plaque cardiogénique sont destinées à donner naissance aux ventricules, oreillettes et gros vaisseaux du cœur adulte. Ceci se traduit par l'expression très localisée et très précoce, dès le stade du tube cardiaque primitif, de certains facteurs de transcription. Cependant, les différences morphologiques de ces structures cardiaques n'apparaissent pas avant la courbure cardiaque. Au plan moléculaire, après la courbure cardiaque, on observe une expression différente de certains gènes au niveau de la courbure externe ou interne du tube cardiaque primitif indiquant deux programmes transcriptionnels différents. La courbure interne et les gros vaisseaux conservent le programme transcriptionnel du tube cardiaque primitif tandis qu'en périphérie, le long de la courbure externe, le myocarde s'expand, se trabécule et développe un système de conduction performant grâce à un programme transcriptionnel différent. Ceci a conduit à proposer un modèle de ballonnement « ballooning » où des marqueurs génétiques particuliers sont stimulés le long de la courbure externe du tube cardiaque primitif (Christoffels VM et coll. 2000 ; Moorman AF et coll. 2000) (Figure 22).

Par ailleurs, ces programmes sont également différents selon la région, droite ou gauche, du tube cardiaque primitif. Un second niveau de programme transcriptionnel intervient donc, particulier à chaque future région cardiaque, oreillettes droite et gauche, ventricules droit et gauche et gros vaisseaux.

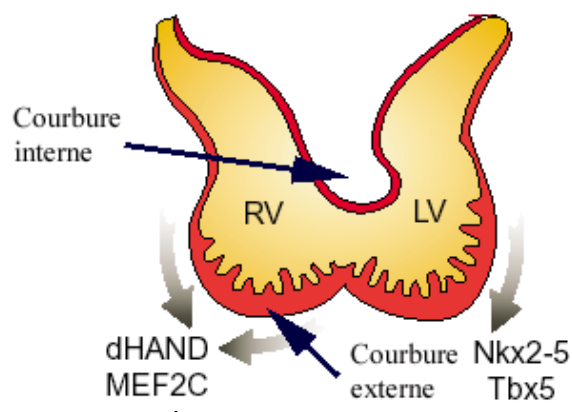


Figure 22 Représente la théorie du ballonnement. Un programme génétique particulier contrôle le ballonnement du cœur le long de la courbure externe tandis qu'un programme distinct contrôle le

développement du cœur le long de la courbure interne. Les facteurs de transcription possiblement impliqués dans la croissance sont indiqués (modifié d'après McFadden D et coll. 2002).

Plusieurs modèles murins invalidés pour certains gènes étayaient cette hypothèse. Les souris homozygotes *knock out* (KO) pour les gènes *MEF2C* ou *dHand* ne développent pas de ventricule droit et de gros vaisseaux corrects et meurent à E9.5-11.5 (Lin Q et coll. 1997 ; Srivastava D et coll. 1997). De même, les souris homozygotes KO pour *Nkx2.5* meurent à E9.5-11.5 et présentent un ventricule unique n'exprimant pas *eHand*, un marqueur du ventricule gauche (Lyons I et coll. 1995 ; Biben C et coll. 1997 ; Tanaka M et coll. 1999). De la même façon, des souris invalidées à la fois pour *Nkx2.5* et *dHand* présentent une absence de développement ventriculaire (Yamagishi H et coll. 2001). Enfin, des souris invalidées pour le gène *TBX5* présentent des anomalies similaires du ventricule gauche (Bruneau BG et coll. 2001). Dans ces exemples, la formation du tube cardiaque primitif n'est pas altérée, suggérant un défaut dans un programme transcriptionnel contrôlant le développement de régions particulières du cœur. Il est intéressant de noter que *Nkx2.5* et *Tbx5* interagissent en synergie pour activer la transcription d'ANF (*atrial natriuretic factor*) et de la connexine 40 fournissant un début d'explication aux phénotypes partiellement communs aux souris KO pour les gènes *Nkx2.5* et *Tbx5* (Bruneau BG et coll. 2001 ; Hiroi Y et coll. 2001).

III.3. Le champ cardiaque secondaire

Une donnée récente vient s'ajouter aux notions classiques de développement cardiaque. Récemment, deux équipes indépendantes ont montré qu'une partie des cellules des gros vaisseaux dérivent d'un champ cardiaque secondaire distinct des champs cardiaques primaires (Kelly RG et coll. 2001 ; Waldo KL et coll. 2001). L'ajout de ces cellules au pôle artériel du cœur est responsable d'une augmentation de longueur du tube cardiaque au moment de la courbure cardiaque. Le mésoderme pharyngé et splanchnique est une source de ces cellules précurseurs et, tout comme les cellules des champs cardiaques primaires, elles expriment *BMP2*, *Nkx2.5* et *GATA4* (Figure 23). Ceci suggère que des programmes transcriptionnels similaires à ceux des champs cardiaques primaires sont utilisés pour générer le champ cardiaque secondaire. La mise en évidence de mutations au sein des gènes *NKX2.5* et *GATA4* a permis de montrer qu'elles étaient une des causes possibles aux malformations cardiaques conotruncales non syndromiques chez l'Homme. Plus encore, l'étude de formes

mutées de *TBX5*, *GATA4* et *NKX2.5* a permis de montrer une interaction entre *GATA4* et *NKX2.5* mais aussi entre *TBX5* et *GATA4* (Hiroi Y et coll. 2001 ; Garg V et coll. 2003). Il est probable que *TBX5*, *GATA4* et *NKX2.5* fonctionnent au sein d'un complexe permettant la régulation d'un groupe de gènes important dans la mise en place des cavités cardiaques et des gros vaisseaux.

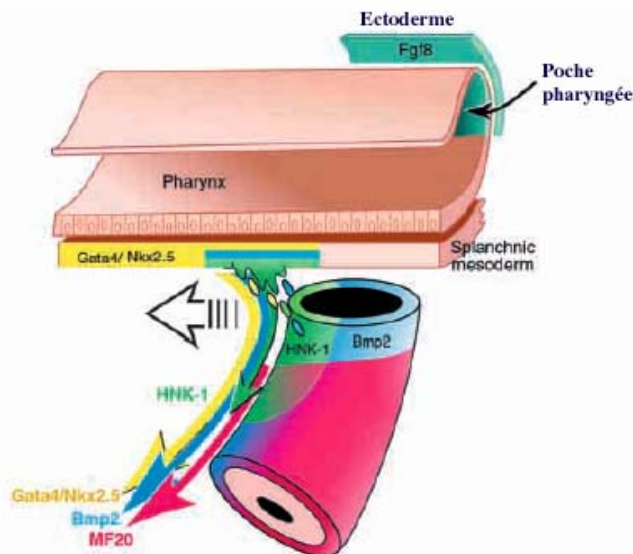


Figure 23 Schéma représentant le cnamp cardiaque secondaire à partir duquel des cellules colonisent la région des gros vaisseaux (modifié d'après Waldo KL et coll. 2001).

III.4. Contribution des cellules des crêtes neurales

La contribution des cellules de la crête neurale cardiaque est également essentielle au développement du cœur. Les études de la région 22q11.2 ont permis de montrer l'importance de certains gènes dans les malformations conotruncales. Elles ont conduit à l'identification du gène *TBX1*, dont l'inactivation est responsable chez la souris d'anomalies proches de celles observées dans la microdélétion 22q11.2 chez l'Homme. La caractérisation des gènes régulés par *Tbx1* sera importante dans la compréhension de cette voie de signalisation.

Les interactions moléculaires impliquées dans les cellules des crêtes neurales sont peu connues mais jouent probablement un rôle majeur dans la genèse de ces malformations conotruncales. Deux voies de signalisation sont cependant identifiées : la voie semaphorin3C et la voie des endothélines.

Les souris mutées pour *neuropilin1*, *semophorin3C* et *plexinA2* présentent des malformations cardiaques dont un tronc artériel commun ou une interruption de l'arche aortique (Kawasaki T et coll. 1999 ; Brown CB et coll. 2001 ; Feiner L et coll. 2001). Un nombre réduit de cellules des crêtes neurales est présent dans la région des gros vaisseaux au moment du développement chez les souris mutées pour *semophorin3C*, suggérant que cette voie régule la migration des cellules des crêtes neurales des arcs pharyngés vers les gros vaisseaux.

Des mutations au sein de la voie de signalisation de l'*endothelin1* sont responsables d'anomalies intéressant la face et le cœur proches de celles observées en cas d'ablation de la crête neurale chez la souris (Clouthier DE et coll. 1998). Or, les gènes *dHand* et *eHand* sont exprimés par les cellules des crêtes neurales et leur expression est réprimée dans les souris mutées pour *endothelin1* ou son récepteur (Thomas T et coll. 1998). Des liens complexes existent donc entre des gènes dont nous avons déjà discuté *dHand* et *eHand* (importants dans la mise en place des cavités cardiaques) et les cellules de la crête neurale.

Le développement cardiaque est d'une extrême complexité. Plusieurs populations cellulaires participent à cette complexité. Le cœur est le résultat d'un assemblage de cellules de la plaque cardiogénique et du champ cardiaque secondaire. Puis, les cellules des crêtes neurales contribuent à sa formation. De nombreux gènes aux interactions complexes interviennent à chacune de ces étapes. Ces gènes ont des fonctions très variées. Certains interviennent dans la différenciation cellulaire, d'autres sont des facteurs de transcription ou encore participent au maintien d'une migration cellulaire normale. À ce jour, il est difficile d'estimer leur nombre, mais ils sont probablement plusieurs dizaines à intervenir. Dans la plupart des cas, un seul gène n'est pas suffisant pour qu'apparaisse la maladie mais la combinaison de quelques gènes, chacun d'eux faiblement prédisposant, permet son apparition. La complexité est liée au fait que ce sont, par exemple, trois gènes anormaux parmi plusieurs dizaines qui conduisent à une même malformation. Les combinaisons possibles sont donc extrêmement nombreuses. Indiscutablement, la compréhension de cette complexité est un challenge à relever ces prochaines années, challenge cependant facilité par le séquençage du génome humain et d'autres organismes.

Le travail réalisé au cours de cette thèse nous a conduit à étudier une famille de la région nantaise dont plusieurs membres présentent un phénotype original associant une cardiopathie congénitale, une surdité mixte et un embryotoxon postérieur. Une approche gène candidat a permis l'identification d'une nouvelle mutation faux-sens, C234Y, au sein du premier motif EGF de la protéine JAG1 montrant que cette protéine pouvait être responsable de surdité chez l'Homme. D'autres familles ont été explorées par cette même approche, mais aucune nouvelle mutation n'a été identifiée. Nous avons également étudié 55 fœtus polymalformés, dont une majorité avec cardiopathie, grâce à une nouvelle technique : la CGH array. Neuf anomalies ont été identifiées, quatre délétions, une trisomie 21, et quatre duplications subtélomériques 10q. Ces résultats confirment l'intérêt de cette approche, mais

ne permettent cependant pas l'identification de nouveaux gènes impliqués dans les cardiopathies conotruncales. Le nombre restreint de clones déposés sur la lame employée ne permet pas une couverture suffisante du génome. Une lame de seconde génération, sur laquelle est déposée plus de 3000 clones, soit un clone tous les mégabases, pourrait en revanche contribuer à l'identification de nouveaux gènes.

Une meilleure connaissance de la génétique des malformations cardiaques est essentielle à un bon conseil génétique destiné aux malades et permettra également un dépistage plus performant.

IV. Références bibliographiques

- Alagille D, Borde J, Habib EC, Dommergues JP (1969) Biliary surgery of prolonged cholestasis in young infants. Surgical data in 128 cases. *Arch Fr Pediatr* 26:37-49
- Anad F, Burn J, Matthews D, Cross I, Davison BC, Mueller R, Sands M, Lillington DM, Eastham E (1990) Alagille syndrome and deletion of 20p. *J Med Genet* 27:729-37
- Aoyama T, Tynan K, Dietz HC, Francke U, Furthmayr H (1993) Missense mutations impair intracellular processing of fibrillin and microfibril assembly in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet* 2:2135-40
- Arsenian S, Weinhold B, Oelgeschlager M, Ruther U, Nordheim A (1998) Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J* 17:6289-99
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME (1995) Notch signaling. *Science* 268:225-32
- Bamford RN, Roessler E, Burdine RD, Saplakoglu U, dela Cruz J, Splitt M, Goodship JA, Towbin J, Bowers P, Ferrero GB, Marino B, Schier AF, Shen MM, Muenke M, Casey B (2000) Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene *CFC1* are associated with human left-right laterality defects. *Nat Genet* 26:365-9
- Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL (1999) Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. *Science* 283:1161-4
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE (1997) Mutations in human *TBX5* [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* 15:30-5
- Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, Bruzzone R, Quadrelli R, Lerone M, Romeo G, Silengo M, Pereira A, Krieger J, Mesquita SF, Kamisago M, Morton CC, Pierpont ME, Muller CW, Seidman JG, Seidman CE (1999) Different *TBX5* interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2919-24
- Bearden CE, Woodin MF, Wang PP, Moss E, McDonald-McGinn D, Zackai E, Emmanuel B, Cannon TD (2001) The neurocognitive phenotype of the 22q11.2 deletion syndrome : selective deficit in visual-spatial memory. *J Clin Exp Neuropsychol* 23:447-64
- Biben C, Harvey RP (1997) Homeodomain factor *Nkx2-5* controls left/right asymmetric expression of *bHLH* gene *eHand* during murine heart development. *Genes Dev* 11:1357-69
- Bodmer R (1993) The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* 118:719-29
- Bonnet D (1998) Les cardiopathies conotruncales. In : IX^{ème} journée de la Société Française de Foetopathologie. pp.13-15
- Bougéard G, Brugieres L, Chompret A, Gesta P, Charbonnier F, Valent A, Martin C, Raux G, Feunteun J, Bressac-de Paillerets B, Frebourg T (2003) Screening for *TP53* rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the *TP53* gene. *Oncogene* 22:840-6
- Brassington AM, Sung SS, Toydemir RM, Le T, Roeder AD, Rutherford AE, Whitby FG, Jorde LB, Bamshad MJ (2003) Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by *TBX5* genotype. *Am J Hum Genet* 73:74-85
- Brown CB, Feiner L, Lu MM, Li J, Ma X, Webber AL, Jia L, Raper JA, Epstein JA (2001) *PlexinA2* and semaphorin signaling during cardiac neural crest development. *Development* 128:3071-80
- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG (2001) A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell* 106:709-21

- Bulman MP, Kusumi K, Frayling TM, McKeown C, Garrett C, Lander ES, Krumlauf R, Hattersley AT, Ellard S, Turnpenny PD (2000) Mutations in the human delta homologue, *DLL3*, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat Genet* 24:438-41
- Burn J, Brennan P, Little J, Holloway S, Coffey R, Somerville J, Dennis NR, Allan L, Arnold R, Deanfield JE, Godman M, Houston A, Keeton B, Oakley C, Scott O, Silove E, Wilkinson J, Pembrey M, Hunter AS (1998) Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study. *Lancet* 351:311-6
- Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, Tosi M (2002) Rapid detection of novel *BRCA1* rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat* 20:218-26
- Castilla EE, Rittler M, Dutra MG, Lopez-Camelo JS, Campana H, Paz JE, Orioli IM (1998) Survival of children with Down syndrome in South America. ECLAMC-Downsurv Group. Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations. *Am J Med Genet* 79:108-11
- Charron F, Nemer M (1999) GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol* 10:85-91
- Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, Bao ZZ, Palmer S, Biben C, Harvey RP, Moorman AF (2000) Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol* 223:266-78
- Chung-Park M, Petrelli M, Tavill AS, Hall PW 3rd, Henoch MS, Dahms BB (1982) Renal lipidosis associated with arteriohepatic dysplasia (Alagille's syndrome). *Clin Nephrol* 18:314-20
- Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M (1998) Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 125:813-24
- Cohen D, Chumakov I, Weissenbach J (1993) A first-generation physical map of the human genome. *Nature* 366:698-701
- Colliton RP, Bason L, Lu FM, Piccoli DA, Krantz ID, Spinner NB (2001) Mutation analysis of *Jagged1* (*JAG1*) in Alagille syndrome patients. *Hum Mutat* 17:151-2
- Conlon RA, Reaume AG, Rossant J (1995) *Notch1* is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121:1533-45
- Conti E, Grifone N, Sarkozy A, Tandoi C, Marino B, Digilio MC, Mingarelli R, Pizzuti A, Dallapiccola B (2003) DiGeorge subtypes of nonsyndromic conotruncal defects: evidence against a major role of *TBX1* gene. *Eur J Hum Genet* 11:349-51
- Crosnier C, Attie-Bitach T, Encha-Razavi F, Audollent S, Soudy F, Hadchouel M, Meunier-Rotival M, Vekemans M (2000) *JAGGED1* gene expression during human embryogenesis elucidates the wide phenotypic spectrum of Alagille syndrome. *Hepatology* 32:574-81
- Crosnier C, Driancourt C, Raynaud N, Dhorne-Pollet S, Pollet N, Bernard O, Hadchouel M, Meunier-Rotival M (1999) Mutations in *JAGGED1* gene are predominantly sporadic in Alagille syndrome. *Gastroenterology* 116:1141-8
- Crosnier C, Driancourt C, Raynaud N, Hadchouel M, Meunier-Rotival M (2001) Fifteen novel mutations in the *JAGGED1* gene of patients with Alagille syndrome. *Hum Mutat* 17:72-3
- Devriendt K, Moerman P, Van Schoubroeck D, Vandenberghe K, Fryns JP (1997) Chromosome 22q11 deletion presenting as the Potter sequence. *J Med Genet* 34:423-5

- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380:152-4
- DiGeorge A (1965) A new concept of the cellular basis of immunity. *J Pediatr* 67:907-8
- Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, Hempstead BL (1996) Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet* 14:210-3
- Downing AK, Knott V, Werner JM, Cardy CM, Campbell ID, Handford PA (1996) Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell* 85:597-605
- Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M (1997) The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J* 16:5687-96
- Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC (2001) Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene. *Hum Mol Genet* 10:163-9
- Elliott DA, Kirk EP, Yeoh T, Chandar S, McKenzie F, Taylor P, Grossfeld P, Fatkin D, Jones O, Hayes P, Feneley M, Harvey RP (2003) Cardiac homeobox gene NKX2-5 mutations and congenital heart disease: associations with atrial septal defect and hypoplastic left heart syndrome. *J Am Coll Cardiol* 41:2072-6
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J (1991) TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66:649-61
- Falk CT, Rubinstein P (1987) Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet* 51:227-33
- Feiner L, Webber AL, Brown CB, Lu MM, Jia L, Feinstein P, Mombaerts P, Epstein JA, Raper JA (2001) Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption. *Development* 128:3061-70
- Ferencz C, Rubin JD, Loffredo CA, Magee CA (1993) Epidemiology of congenital heart disease : the Baltimore-Washington Infant Study, 1981-1989. Mt Kisco, NY : Futura Publishing Co
- Ferencz C, Loffredo CA, Correa-Villasenor A, Wilson PD (1997) Genetic and environmental risk factors of major cardiovascular malformations : the Baltimore-Washington Infant Study, 1981-1989. Armonk, NY : Futura Publishing Co
- Fixler DE, Pastor P, Chamberlin M, Sigman E, Eifler CW (1990) Trends in congenital heart disease in Dallas County births. 1971-1984. *Circulation* 81:137-42
- Gajewski K, Zhang Q, Choi CY, Fossett N, Dang A, Kim YH, Kim Y, Schulz RA (2001) Pannier is a transcriptional target and partner of Tinman during *Drosophila* cardiogenesis. *Dev Biol* 233:425-36
- Garg V, Kathiriyai IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada K, Joo K, Matsuoka R, Cohen JC, Srivastava D (2003) GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424:443-7
- Gebbia M, Ferrero GB, Pilia G, Bassi MT, Aylsworth A, Penman-Splitt M, Bird LM, Bamforth JS, Burn J, Schlessinger D, Nelson DL, Casey B (1997) X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nat Genet* 17:305-8
- Giannakudis J, Ropke A, Kujat A, Krajewska-Walasek M, Hughes H, Fryns JP, Bankier A, Amor D, Schlicker M, Hansmann I (2001) Parental mosaicism of JAG1 mutations in families with Alagille syndrome. *Eur J Hum Genet* 9:209-16

- Giglio S, Graw SL, Gimelli G, Pirola B, Varone P, Voullaire L, Lerzo F, Rossi E, Dellavecchia C, Bonaglia MC, Digilio MC, Giannotti A, Marino B, Carrozzo R, Korenberg JR, Danesino C, Sujansky E, Dallapiccola B, Zuffardi O (2000) Deletion of a 5-cM region at chromosome 8p23 is associated with a spectrum of congenital heart defects. *Circulation* 102:432-7
- Gelb BD, Towbin JA, McCabe ER, Sujansky E (1991) San Luis Valley recombinant chromosome 8 and tetralogy of Fallot: a review of chromosome 8 anomalies and congenital heart disease. *Am J Med Genet* 40:471-6
- Goldmuntz E, Geiger E, Benson DW (2001) NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. *Circulation* 104:2565-8
- Gong W, Gottlieb S, Collins J, Blescia A, Dietz H, Goldmuntz E, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Emanuel BS, Driscoll DA, Budarf ML (2001) Mutation analysis of TBX1 in non-deleted patients with features of DGS/VCFS or isolated cardiovascular defects. *J Med Genet* 38:E45
- Grabitz RG, Joffres MR, Collins-Nakai RL (1988) Congenital heart disease: incidence in the first year of life. The Alberta Heritage Pediatric Cardiology Program. *Am J Epidemiol* 128:381-8
- Habets PE, Moorman AF, Clout DE, van Roon MA, Lingbeek M, van Lohuizen M, Campione M, Christoffels VM (2002) Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev* 16:1234-46
- Habib R, Dommergues JP, Gubler MC, Hadchouel M, Gautier M, Odievre M, Alagille D (1987) Glomerular mesangiolipidosis in Alagille syndrome (arteriohepatic dysplasia). *Pediatr Nephrol* 1:455-64
- Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y (1999) Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* 126:3415-24
- Harvey RP (1996) NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol* 178:203-16
- Heritage ML, MacMillan JC, Colliton RP, Genin A, Spinner NB, Anderson GJ (2000) Jagged1 (JAG1) mutation detection in an Australian Alagille syndrome population. *Hum Mutat* 16:408-16
- Hingorani M, Nischal KK, Davies A, Bentley C, Vivian A, Baker AJ, Mieli-Vergani G, Bird AC, Aclimandos WA (1999) Ocular abnormalities in Alagille syndrome. *Ophthalmology* 106:330-7
- Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I (2001) Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28:276-80
- Holt M, Oram S (1960) Familial heart disease with skeletal malformations. *Br Heart J* 22:236-42
- Huang T (2002) Current advances in Holt-Oram syndrome. *Curr Opin Pediatr* 14:691-5
- Ikeda Y, Hiroi Y, Hosoda T, Utsunomiya T, Matsuo S, Ito T, Inoue J, Sumiyoshi T, Takano H, Nagai R, Komuro I (2002) Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/NKX2.5 associated with congenital heart disease. *Circ J* 66:561-3
- Jacobson AG, Sater AK (1988) Features of embryonic induction. *Development* 104:341-59
- Jacquet H, Raux G, Thibaut F, Hecketsweiler B, Houy E, Demilly C, Haouzir S, Allio G, Fouldrin G, Drouin V, Bou J, Petit M, Campion D, Frebourg T (2002) PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum Mol Genet* 11:2243-9
- Jerome LA, Papaioannou VE (2001) DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet* 27:286-91
- Johnson MC, Hing A, Wood MK, Watson MS (1997) Chromosome abnormalities in congenital heart disease. *Am J Med Genet* 70:292-8

- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E (1996) Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383:707-10
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H (1999) A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126:4895-902
- Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME (2001) The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 1:435-40
- Kiernan AE, Ahituv N, Fuchs H, Balling R, Avraham KB, Steel KP, Hrabe de Angelis M (2001) The Notch ligand Jagged1 is required for inner ear sensory development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3873-8
- Kirby ML (1998) Contribution of neural crest to heart and vessel morphology. *Heart development*, Academic Press
- Krantz ID, Colliton RP, Genin A, Rand EB, Li L, Piccoli DA, Spinner NB (1998) Spectrum and frequency of jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome patients and their families. *Am J Hum Genet* 62:1361-9
- Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB (1997) Alagille syndrome. *J Med Genet* 34:152-7
- Krantz ID, Smith R, Colliton RP, Tinkel H, Zackai EH, Piccoli DA, Goldmuntz E, Spinner NB (1999) Jagged1 mutations in patients ascertained with isolated congenital heart defects. *Am J Med Genet* 84:56-60
- Krassikoff N, Sekhon GS (1990) Terminal deletion of 6q and Fryns syndrome: a microdeletion/syndrome pair? *Am J Med Genet* 36:363-4
- Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM (1997) GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11:1048-60
- LaBrecque DR, Mitros FA, Nathan RJ, Romanchuk KG, Judisch GF, El-Khoury GH (1982) Four generations of arteriohepatic dysplasia. *Hepatology* 2:467-74
- Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U (1994) The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* 46:123-36
- Lathrop GM, Lalouel JM (1984) Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am J Hum Genet* 36:460-5
- Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T (1994) GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem* 269:23177-84
- Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont ME, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB (1997) Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 16:243-51
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD (1997) Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 15:21-9
- Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN (1997) Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276:1404-7
- Lindsay EA (2001) Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet* 2:858-68
- Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, Bradley A, Baldini A (2001) Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410:97-101

- Lindsell CE, Boulter J, diSibio G, Gossler A, Weinmaster G (1996) Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol Cell Neurosci* 8:14-27
- Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G (1995) Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80:909-17
- Lissemore JL, Starmer WT (1999) Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins. *Mol Phylogenet Evol* 11:308-19
- Loffredo CA, Chokkalingam A, Sill AM, Boughman JA, Clark EB, Scheel J, Brenner JI (2004) Prevalence of congenital cardiovascular malformations among relatives of infants with hypoplastic left heart, coarctation of the aorta, and d-transposition of the great arteries. *Am J Med Genet* 124:225-30
- Loomes KM, Underkoffler LA, Morabito J, Gottlieb S, Piccoli DA, Spinner NB, Baldwin HS, Oakey RJ (1999) The expression of Jagged1 in the developing mammalian heart correlates with cardiovascular disease in Alagille syndrome. *Hum Mol Genet* 8:2443-9
- Lu F, Morrissette JJ, Spinner NB (2003) Conditional JAG1 mutation shows the developing heart is more sensitive than developing liver to JAG1 dosage. *Am J Hum Genet* 72:1065-70
- Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP (1995) Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* 9:1654-66
- Marino B, Digilio MC, Toscano A, Anaclerio S, Giannotti A, Feltri C, de Ioris MA, Angioni A, Dallapiccola B Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genet Med* (2001) 3:45-8
- Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB (2001) Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 15:316-27
- McCright B, Gao X, Shen L, Lozier J, Lan Y, Maguire M, Herzlinger D, Weinmaster G, Jiang R, Gridley T (2001) Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic *Notch2* mutation. *Development* 128:491-502
- McFadden DG, Olson EN (2002) Heart development: learning from mistakes. *Curr Opin Genet Dev* 12:328-35
- Megarbane A, Salem N, Stephan E, Ashoush R, Lenoir D, Delague V, Kassab R, Loiselet J, Bouvagnet P (2000) X-linked transposition of the great arteries and incomplete penetrance among males with a nonsense mutation in *ZIC3*. *Eur J Hum Genet* 8:704-8
- Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R (2001) *TBX1* is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 104:619-29
- Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN (1997) Requirement of the transcription factor *GATA4* for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11:1061-72
- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-28
- Moorman AF, Schumacher CA, de Boer PA, Hagoort J, Bezstarosti K, van den Hoff MJ, Wagenaar GT, Lamers JM, Wuytack F, Christoffels VM, Fiolet JW (2000) Presence of functional sarcoplasmic reticulum in the developing heart and its confinement to chamber myocardium. *Dev Biol* 223:279-90
- Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 7:277-318
- Nagai T, Shimokawa O, Harada N, Sakazume S, Ohashi H, Matsumoto N, Obata K, Yoshino A, Murakami N, Murai T, Sakuta R, Niikawa N (2002) Postnatal overgrowth by 15q-trisomy and intrauterine growth retardation by 15q-monosomy due to familial translocation t(13;15): dosage effect of *IGF1R*? *Am J Med Genet* 113:173-7

- Oda T, Elkahlon AG, Meltzer PS, Chandrasekharappa SC (1997) Identification and cloning of the human homolog (JAG1) of the rat Jagged1 gene from the Alagille syndrome critical region at 20p12. *Genomics* 43:376-9
- Oda T, Elkahlon AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC (1997) Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16:235-42
- Okuno T, Takahashi H, Shibahara Y, Hashida Y, Sando I (1990) Temporal bone histopathologic findings in Alagille's syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116:217-20
- Onouchi Y, Kurahashi H, Tajiri H, Ida S, Okada S, Nakamura Y (1999) Genetic alterations in the JAG1 gene in Japanese patients with Alagille syndrome. *J Hum Genet* 44:235-9
- Orkin SH (1992) GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80:575-81
- Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slauch R, Van Rheeden R, Wilson DB, Watson MS, Hing AV (1999) GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet* 83:201-6
- Pilia G, Uda M, Macis D, Frau F, Crisponi L, Balli F, Barbera C, Colombo C, Frediani T, Gatti R, Iorio R, Marazzi MG, Marcellini M, Musumeci S, Nebbia G, Vajro P, Ruffa G, Zancan L, Cao A, DeVirgilis S (1999) Jagged-1 mutation analysis in Italian Alagille syndrome patients. *Hum Mutat* 14:394-400
- Pizzuti A, Sarkozy A, Newton AL, Conti E, Flex E, Digilio MC, Amati F, Gianni D, Tandoi C, Marino B, Crossley M, Dallapiccola B (2003) Mutations of ZFPM2/FOG2 gene in sporadic cases of tetralogy of Fallot. *Hum Mutat* 22:372-7
- Ramanan AV, Hussain K, Kempley ST, Goodman FR (1999) Preaxial polydactyly in an infant with Down's syndrome. *Clin Genet* 55:131-2
- Reddy KS (1999) A paternally inherited terminal deletion, del(8)(p23.1)pat, detected prenatally in an amniotic fluid sample: a review of deletion 8p23.1 cases. *Prenat Diagn* 19:868-72
- Robbins J, Blondel BJ, Gallahan D, Callahan R (1992) Mouse mammary tumor gene int-3: a member of the notch gene family transforms mammary epithelial cells. *J Virol* 66:2594-9
- Rohn JL, Lauring AS, Linenberger ML, Overbaugh J (1996) Transduction of Notch2 in feline leukemia virus-induced thymic lymphoma. *J Virol* 70:8071-80
- Rones MS, McLaughlin KA, Raffin M, Mercola M (2000) Serrate and Notch specify cell fates in the heart field by suppressing cardiomyogenesis. *Development* 127:3865-76
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brondum-Nielsen K, Scambler PJ (1997) Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 34:798-804
- Schaid DJ, Sommer SS (1993) Genotype relative risks: methods for design and analysis of candidate-gene association studies. *Am J Hum Genet* 53:1114-26
- Schneider VA, Mercola M (2001) Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 15:304-15
- Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG (1998) Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 281:108-11

- Schrijver I, Liu W, Brenn T, Furthmayr H, Francke U (1999) Cysteine substitutions in epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1: distinct effects on biochemical and clinical phenotypes. *Am J Hum Genet* 65:1007-20
- Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB (1997) A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 11:451-62
- Schwartz MF, Kaffe S, Wallace S, Desnick RJ (1984) Interstitial deletion of the long arm of chromosome 6 [del(6)(q16q22)]: case report and review of the literature. *Clin Genet* 26:574-8
- Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:565-97
- Sepulveda JL, Belaguli N, Nigam V, Chen CY, Nemer M, Schwartz RJ (1998) GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol Cell Biol* 18:3405-15
- Shimizu K, Chiba S, Kumano K, Hosoya N, Takahashi T, Kanda Y, Hamada Y, Yazaki Y, Hirai H (1999) Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods. *J Biol Chem* 274:32961-9
- Spinner NB, Colliton RP, Crosnier C, Krantz ID, Hadchouel M, Meunier-Rotival M (2001) Jagged1 mutations in Alagille syndrome. *Hum Mutat* 17:18-33
- Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN (1995) A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 270:1995-9
- Srivastava D, Olson EN (2000) A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 407:221-6
- Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN (1997) Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet* 16:154-60
- Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN (1997) Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet* 16:154-60
- Svensson EC, Huggins GS, Lin H, Clendenin C, Jiang F, Tufts R, Dardik FB, Leiden JM (2000) A syndrome of tricuspid atresia in mice with a targeted mutation of the gene encoding Fog-2. *Nat Genet* 25:353-6
- Svensson EC, Tufts RL, Polk CE, Leiden JM (1999) Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:956-61
- Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T (1994) Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* 8:707-19
- Swillen A, Devriendt K, Legius E, Eyskens B, Dumoulin M, Gewillig M, Fryns JP (1997) Intelligence and psychosocial adjustment in velocardiofacial syndrome: a study of 37 children and adolescents with VCFS. *J Med Genet* 34:453-8
- Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N, Izumo S (1999) The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 126:1269-80
- Tevosian SG, Deconinck AE, Tanaka M, Schinke M, Litovsky SH, Izumo S, Fujiwara Y, Orkin SH (2000) FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell* 101:729-39
- Thomas T, Kurihara H, Yamagishi H, Kurihara Y, Yazaki Y, Olson EN, Srivastava D (1998) A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and *msx1* regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme. *Development* 125:3005-14
- Tsai H, Hardisty RE, Rhodes C, Kiernan AE, Roby P, Tymowska-Lalanne Z, Mburu P, Rastan S, Hunter AJ, Brown SD, Steel KP (2001) The mouse slalom mutant demonstrates a role for Jagged1 in neuroepithelial patterning in the organ of Corti. *Hum Mol Genet* 10:507-12

- Tzahor E, Lassar AB (2001) Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes Dev* 15:255-60
- Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J (1996) Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122:2251-9
- van Karnebeek CD, Hennekam RC (1999) Associations between chromosomal anomalies and congenital heart defects: a database search. *Am J Med Genet* 84:158-66
- Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG (2002) High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 70:1269-76
- Waggoner D, Eash D, Ilkin Y, Surti U, McPherson E, Siegler M, Tepperberg J, Lese-Martin C (2003) The 10q telomere region is a common site mediating polymorphic and pathogenic telomere rearrangements. *Am J Hum Genet* 73(Suppl):A806
- Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML (2001) Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 128:3179-88
- Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA, Olson EN (2001) Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105:851-62
- Watanabe Y, Benson DW, Yano S, Akagi T, Yoshino M, Murray JC (2002) Two novel frameshift mutations in NKX2.5 result in novel features including visceral inversus and sinus venosus type ASD. *J Med Genet* 39:807-11
- Watson GH, Miller V (1973) Arteriohepatic dysplasia: familial pulmonary arterial stenosis with neonatal liver disease. *Arch Dis Child* 48:459-66
- Weinmaster G (1997) The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* 9:91-102
- Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G (1992) Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116:931-41
- Weiss MJ, Orkin SH (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 23:99-107
- Woodin M, Wang PP, Aleman D, McDonald-McGinn D, Zackai E, Moss E (2001) Neuropsychological profile of children and adolescents with the 22q11.2 microdeletion. *Genet Med* 3-34-9
- Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R (2003) Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* 362:1366-73
- Yamagishi H, Yamagishi C, Nakagawa O, Harvey RP, Olson EN, Srivastava D (2001) The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation. *Dev Biol* 239:190-203
- Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beudet AL, Bejjani BA, Shaw CA, Shaffer LG (2003) Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet* 12:2145-52
- Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J, Kobayashi N, Yamada M (1998) Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. *Hum Mol Genet* 7:1363-9

V. Annexes

Annexe 1. Projet validé par le CCPPRB portant sur l'étude des malformations cardiaques conotruncales familiales et sporadiques.

Etude génétique des cardiopathies conotruncales familiales et sporadiques

I- Promoteur : CHU de Nantes 5, allée de l'Île Gloriette 44093 Nantes

II- a) Investigateur principal : Pr J.P. Moisan

b) Co-Investigateurs Nantais: Dr C. Le Caignec, Dr M. Lefèvre, Dr V. Gournay,
Dr A. David, Dr C. Pascal

Co-Investigateurs Nancéiens: Dr F. Marçon, Dr H. Lucron, Dr G. Bosser

c) Lieux de recherche : Service de pédiatrie du CHU de Nantes N° 18038S

Service de cardiologie du CHU de Nantes N° 18021S

Service d'ORL du CHU de Nantes N° 18020S

Service de cardiologie pédiatrique du CHU de Nancy

III- Type de l'étude : Etude génétique sans bénéficiaire individuel direct

Résumé

Les cardiopathies congénitales constituent un problème majeur de santé publique puisqu'elles représentent la première cause de mortalité au cours de la première année de vie dans les pays développés. La prévalence des cardiopathies congénitales est comprise entre 0.4 et 0.9% en Europe. Bien plus que les aspects économiques, la prise en charge du retentissement, physique et moral, sur les patients et leur famille est essentielle. Malgré une prévalence élevée, les étiologies de ces malformations sont variées et peu connues. Une origine multifactorielle semble cependant le mode de transmission principal. Il est urgent d'approfondir notre connaissance sur la genèse de ces malformations de façon à améliorer nos possibilités diagnostiques et thérapeutiques.

Parmi les malformations congénitales, les cardiopathies conotruncales occupent une large part. La tétralogie de Fallot, les communications interventriculaires ou les sténoses de la voie artérielle pulmonaire sont parmi les manifestations cliniques les plus fréquentes. Parmi les étiologies, de rares formes sont liées à un seul gène (communication interventriculaire isolée) tandis que d'autres seraient liées à l'effet conjugué de deux ou trois gènes (tétralogie de Fallot). L'étude de familles au sein desquelles la transmission est monogénique est essentielle. Elles représentent un modèle de transmission simple de pathologies habituellement complexes. Ces recherches sont d'autant plus difficiles à mener que les familles au sein desquelles ségrègent une malformation cardiaque sont extrêmement rares.

Une grande famille de la région nantaise dont plusieurs membres présentent une cardiopathie conotruncale transmise selon un mode autosomique dominant sera étudiée. Après exclusion des quelques gènes candidats, nous réaliserons une analyse de liaison de l'ensemble du génome à la recherche du gène expliquant la pathologie au sein de la famille. D'autres familles seront également étudiées selon les mêmes principes. Parallèlement, les quelques gènes connus pour être impliqués dans ces malformations seront évalués dans les formes sporadiques de cardiopathies conotruncales.

IV- Durée prévue : 3 ans

V- Nombre de patients : 100

VI- Etat des connaissances

Introduction

Les cardiopathies congénitales constituent un problème majeur de santé publique puisqu'elles représentent la première cause de mortalité au cours de la première année de vie dans les pays développés (1;2). La prévalence des cardiopathies congénitales est comprise entre 0.4 et 0.9% en Europe (3-5). Les enfants atteints occupent entre 25 et 30% des lits dans la plupart des unités de soins intensifs pédiatriques. Bien plus que les aspects économiques, la prise en charge du retentissement, physique et moral, sur les patients et leur famille est essentielle. La majorité des patients est traitée avec succès grâce à une chirurgie souvent lourde. Le risque de malformation cardiaque pour la descendance est cependant dix fois supérieur à la population générale (6). Il est par conséquent urgent d'approfondir notre connaissance sur la genèse de ces malformations de façon à améliorer nos possibilités diagnostiques et thérapeutiques.

Malgré une prévalence élevée, les étiologies de ces malformations sont variées et peu connues. Parmi les enfants nés vivants avec une malformation cardiaque, environ 10% présentent une anomalie chromosomique (trisomies 21, 13, 18 et syndrome de Turner), tandis que 5% sont liés à une forme syndromique (d'autres anomalies sont associées à la cardiopathie). Une cause environnementale est identifiée dans 2% des cas. Aucune étiologie n'est retrouvée dans plus de 80% des cas. Certaines de ces formes dont l'étiologie est imprécise seraient liées à un seul gène (communication interventriculaire isolée) tandis que d'autres seraient liées à l'effet conjugué de deux ou trois gènes (tétralogie de Fallot) (6). Une origine multifactorielle semble cependant le mode de transmission principal.

Parmi les malformations congénitales, les cardiopathies conotruncales occupent une large part. Elles constituent un groupe hétérogène de malformations tant sur le plan anatomique que physiologique puisqu'il peut s'agir soit de cardiopathies obstructives du cœur droit à bas débit pulmonaire (tétralogie de Fallot), soit d'obstacle gauche (interruption de la crosse aortique) ou de shunt artériels (tronc artériel commun). Ces cardiopathies procèdent cependant d'un même mécanisme d'anomalie de développement embryonnaire. Un élément de la région conotruncale, le septum conal, joue un rôle central dans l'apparition de ces cardiopathies. Au cours du développement, l'anomalie essentielle est une bascule antérieure de ce septum conal. En effet, les quatre éléments de cette tétralogie ne sont que la conséquence de cette bascule antérieure : communication interventriculaire par malalignement entre le septum conal et le septum musculaire rendant impossible la formation du septum membraneux, sténose infundibulaire par rétrécissement de la voie sous pulmonaire, chevauchement de la communication interventriculaire par l'aorte déplacée antérieurement et hypertrophie ventriculaire droite par égalité de pression systolique entre les deux ventricules. La dynamique aléatoire nous a appris que la perturbation de la formation d'une structure embryonnaire provenant soit de la migration soit de la différenciation d'un groupe de cellules pouvait conduire à une gamme de phénotypes allant du phénotype normal à un phénotype complet. Si on applique ce raisonnement aux cardiopathies conotruncales et au développement du septum conal, on peut décrire toutes ces malformations. En effet, la bascule antérieure quand elle est modérée donne une communication interventriculaire par

malalignement, plus marquée, elle conduit à une tétralogie de Fallot, extrême, c'est l'atrésie pulmonaire avec communication interventriculaire.

La tétralogie de Fallot, les communications interventriculaires ou les sténoses de la voie artérielle pulmonaire sont parmi les manifestations cliniques les plus fréquentes des malformations conotruncales. Ces trois anomalies représentent à elles seules près de 50% des malformations cardiaques congénitales. Parmi les étiologies, de rares formes sont liées à un seul gène (communication interventriculaire isolée) tandis que d'autres seraient liées à l'effet conjugué de deux ou trois gènes (tétralogie de Fallot). L'étude de familles au sein desquelles la transmission est monogénique est essentielle. Elles représentent un modèle de transmission simple de pathologies habituellement complexes. Ces recherches sont d'autant plus difficiles à mener que les familles au sein desquelles ségrègent une malformation cardiaque sont extrêmement rares.

Régions chromosomiques et gènes candidats

L'acronyme CATCH 22 (anomalies Cardiaques, Anomalies faciales, hypoplasie Thymique, fente palatine (*Cleft palate*), Hypocalcémie et chromosome 22) regroupe principalement deux syndromes phénotypiquement proches : le syndrome de DiGeorge et le syndrome vélo-cardio-facial (7). Le syndrome de DiGeorge se définit par l'association d'une dysmorphie faciale, d'une agénésie partielle ou totale du thymus et des parathyroïdes, d'un déficit immunitaire et d'anomalies cardio-vasculaires conotruncales. Le syndrome vélo-cardio-facial (syndrome de Shprinzen) associe une fente palatine, des anomalies cardiaques et une dysmorphie. Ces syndromes seraient dus à un défaut de migration des cellules de la crête neurale d'origine chromosomique, sporadique ou suivant, plus rarement, une transmission autosomique dominante. Un caryotype en haute résolution permet de retrouver une délétion du bras long du chromosome 22 dans 5% des cas. L'avènement des techniques de cytogénétique moléculaire et en particulier des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ont permis de détecter une microdélétion d'environ 3 millions de paires de bases (3 Mb) en 22q11 chez 90% des patients DiGeorge. La fréquence de cette délétion en fait la deuxième cause de cardiopathie congénitale après la trisomie 21. Cette région a été largement étudiée et un intervalle minimal de délétion nommé DGCR (*DiGeorge Critical Region*) a été identifié et entièrement séquencé (8). Il recèle plus de 20 gènes candidats dont aucun n'avait fait la preuve formelle de son implication jusqu'à récemment. Plusieurs études confortent en effet l'idée que *TBX1* est le gène majeur responsable des malformations conotruncales rencontrées dans la fréquente microdélétion 22q11.2 (9-11). Il apparaît donc important d'exclure cette région par technique de FISH pour exclure une microdélétion puis par séquençage direct du gène *TBX1*.

Plusieurs gènes à homéoboîte de la famille *NKX* sont impliqués dans le développement embryonnaire. Le gène *NKX2.5* joue un essentiel dans le développement cardiaque (12-14). Son expression débute aux premiers stades de différenciation du cardiomyocyte. L'inactivation de l'équivalent murin *Nkx2.5* est responsable d'anomalie de formation de la boucle cardiaque. Chez l'homme, des mutations de *NKX2.5* sont retrouvées chez des patients présentant des malformations cardiaques variées dont des tétralogies de Fallot (15-16). Ce facteur de transcription pourrait expliquer un nombre important de cardiopathies conotruncales.

La délétion de la bande chromosomique 20p12 est fréquemment responsable de syndromes polymalformatifs incluant une sténose de l'artère pulmonaire (17). Qui plus est, un gène de la région, *JAG1*, est connu pour être responsable du syndrome d'Alagille associant atrésie biliaire, retard de croissance, anomalies vertébrales et oculaires, dysmorphie faciale et cardiopathie du cœur droit principalement à type de sténose périphérique de l'artère pulmonaire. L'étude d'une grande famille au sein de laquelle plusieurs personnes sont atteintes de malformation cardiaque à type de tétralogie de Fallot ou de sténose de l'artère pulmonaire a permis la mise en évidence d'une mutation faux sens du gène *JAG1* (18). Cette mutation ponctuelle implique une glycine fortement conservée dans les autres domaines EGF-like de la protéine JAG1 ainsi que dans d'autres protéines. Une perte de fonction relative ou un gain de fonction de la protéine pourrait expliquer la pathologie observée dans cette famille. Ces données suggèrent que JAG1 pourrait jouer un rôle dans les cardiopathies du cœur droit.

Plusieurs observations décrivent des sujets avec délétion de la partie terminale du bras court du chromosome 8 atteints de malformations dont souvent une cardiopathie conotruncale (17). Il est probable qu'un ou plusieurs gènes de cette région chromosomique interviennent dans le développement cardiaque. Récemment, l'intervalle minimum critique a été réduit à 5-cM (19). Parmi les gènes connus de la région, aucun n'explique les pathologies observées. Un candidat intéressant, le facteur de transcription *GATA4* joue un rôle dans le développement cardiaque en particulier dans la fusion des deux tubes primitifs d'origine mésodermique (20). Actuellement, son implication dans les cardiopathies conotruncales n'est cependant pas clairement définie.

L'anomalie la plus typique du syndrome de Noonan est une sténose de l'artère pulmonaire à valves dysplasiques associée à une cardiomyopathie du ventricule gauche. Les patients ont également une petite taille, une cage thoracique cylindrique, des mamelons écartés, une dysmorphie faciale, un cou court avec ou sans pterygium colli (21). Une surdité de perception est fréquemment associée. Cette affection se transmet selon un mode autosomique dominant avec expressivité variable. Un gène est localisé sur le chromosome 12 en 12q24 mais n'est pas connu (22-23). Une hétérogénéité génétique est par ailleurs probable. Il sera important de tester ce locus candidat, en particulier chez les patients avec sténose isolée de l'artère pulmonaire.

Références bibliographiques

1-Gillum RF. Epidemiology of congenital heart disease in the United States. *Am Heart J* 1994;127:919-27

2-Petrini J, Damus K, Johnston RB Jr. An overview of infant mortality and birth defects in the United States. *Teratology* 1997;56:8-10

3-Bosi G, Scorrano M, Tosato G, Forini E, Chakrokh R. The Italian Multicentric Study on Epidemiology of Congenital Heart Disease: first step of the analysis. Working Party of the Italian Society of Pediatric Cardiology. *Cardiol Young* 1999;9:291-9

4-Grech V, Gatt M. Syndromes and malformations associated with congenital heart disease in a population-based study. *Int J Cardiol* 1999;68:151-6

5-Smeeton NC, Rona RJ, Sharland G, Botting BJ, Barnett A, Dundas R. Estimating the prevalence of malformation of the heart in the first year of life using capture-recapture methods. *Am J Epidemiol* 1999;150:778-85

6-Burn J, Brennan P, Little J, Holloway S, Coffey R, Somerville J, Dennis NR, Allan L, Arnold R, Deanfield JE, Godman M, Houston A, Keeton B, Oakley C, Scott O, Silove E, Wilkinson J, Pembrey M, Hunter AS. Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study. *Lancet* 1998;351:311-6

7-McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Solot C, Wang P, Jacobs I, Handler S, Knightly C, Heher K, Wilson M, Ming JE, Grace K, Driscoll D, Pasquariello P, Randall P, Larossa D, Emanuel BS, Zackai EH. The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns* 1999:11-24

8-Gong W, Emanuel BS, Collins J, Kim DH, Wang Z, Chen F, Zhang G, Roe B, Budarf ML. A transcription map of the DiGeorge and velo-cardio-facial syndrome minimal critical region on 22q11. *Hum Mol Genet* 1996;5:789-800

9-Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultchi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 2001;104:619-29

10-Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Prampero T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, Bradley A, Baldini A. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 2001;410:97-101

11-Schinke M, Izumo S. Deconstructing DiGeorge syndrome. *Nat Genet* 2001;27:238-40

12-Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997;11:1061-72

13-Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev* 1995;9:1654-66

14-Harvey RP. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol* 1996;178:203-16

15-Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 1998;281:108-11

16-Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 1999;104:1567-73

17-van Karnebeek CD, Hennekam RC. Associations between chromosomal anomalies and congenital heart defects: a database search. *Am J Med Genet* 1999;84:158-66

18-Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC. Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene. *Hum Mol Genet* 2001;10:163-9

19-Giglio S, Graw SL, Gimelli G, Pirola B, Varone P, Voullaire L, Lerzo F, Rossi E, Dellavecchia C, Bonaglia MC, Digilio MC, Giannotti A, Marino B, Carozzo R, Korenberg JR, Danesino C, Sujansky E, Dallapiccola B, Zuffardi O. Deletion of a 5-cM region at chromosome 8p23 is associated with a spectrum of congenital heart defects. *Circulation* 2000;102:432-7

20-Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slauch R, Van Rheeden R, Wilson DB, Watson MS, Hing AV. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet* 1999;83:201-6

21-Allanson JE. Noonan syndrome. *J Med Genet* 1987;24:9-13

22-Jamieson CR, van der Burgt I, Brady AF, van Reen M, Elsawi MM, Hol F, Jeffery S, Patton MA, Mariman E. Mapping a gene for Noonan syndrome to the long arm of chromosome 12. *Nat Genet* 1994;8:357-60

23-Brady AF, Jamieson CR, van der Burgt I, Crosby A, van Reen M, Kremer H, Mariman E, Patton MA, Jeffery S. Further delineation of the critical region for noonan syndrome on the long arm of chromosome 12. *Eur J Hum Genet* 1997;5:336-7

VII- Hypothèses de travail et objectif de l'étude

Une malformation congénitale à type de cardiopathie conotruncale se transmet selon un mode autosomique dominant au sein d'une grande famille de la région nantaise. L'expression phénotypique est variable. Une jeune fille a présenté dès la naissance une tétralogie de Fallot tandis que d'autres membres sont atteints de sténose de l'artère pulmonaire isolée ou associée à une communication interventriculaire. Ces manifestations font parties du spectre classique des malformations conotruncales. Un gène muté, impliqué dans le développement cardiaque, explique probablement la pathologie rencontrée. Le travail consistera à identifier ce gène. Les quelques gènes connus pour être impliqués dans les cardiopathies conotruncales seront également étudiés dans les formes sporadiques.

VIII- Méthodologie

Critères d'inclusion

1) Type de malformation cardiaque

- Pour les cas familiaux, nous nous intéresserons aux familles associant une personne présentant une cardiopathie conotruncale classique (tétralogie de Fallot, atrésie pulmonaire à septum ouvert, tronc artériel commun, interruption de l'arche aortique, crosse aortique à droite, ventricule droit à double issue, sténose de l'artère pulmonaire) à un apparenté du 1^{er} degré présentant une cardiopathie quel que soit son type ou à un apparenté du 2^{ème} degré ou plus présentant une cardiopathie conotruncale classique. Ces malformations cardiaques peuvent être isolées ou s'associer à d'autres signes et constituer un syndrome.

- Pour les cas sporadiques, nous nous intéresserons aux formes classiques de cardiopathies conotruncales (tétralogie de Fallot, atrésie pulmonaire à septum ouvert, tronc artériel commun, interruption de l'arche aortique, crosse aortique à droite, ventricule droit à double issue, sténose de l'artère pulmonaire).

- Ces malformations sont déjà connues du patient, confirmées par échocardiographie et peuvent avoir déjà été opérées. Ces malformations cardiaques peuvent être isolées ou s'associer à d'autres signes et constituer un syndrome.
- Les malformations peuvent avoir été diagnostiquées en période anténatale et avoir nécessitées une interruption médicale de grossesse en raison de la sévérité de la cardiopathie.

2) Patients ayant signés le consentement

Critères d'exclusion

Enfants de moins de 5 kg ne supportant pas une prise de sang de 4 ml

Transfusion sanguine datant de moins de 3 semaines

Patients n'ayant pas signé le consentement

Nombre de patients inclus

S'agissant d'une étude génétique, il est impossible à calculer et est donc fixé arbitrairement à 100

Méthodologie

Médecins incluant les patients

Médecins appartenant aux services de cardiologie, de pédiatrie et de génétique médicale du CHU de Nantes ou du service de cardiologie pédiatrique du CHU de Nancy

Examens

Pour les enfants de plus de 5 kg et les adultes : une prise de sang d'un volume de 5 ml pour extraction d'ADN sur tube EDTA et un second tube d'un volume de 5 ml pour cytogénétique moléculaire sur tube Héparinate de Lithium.

Pour les enfants de moins ou égal à 5 kg : une prise de sang d'un volume de 2 ml pour extraction d'ADN sur tube EDTA et un second tube d'un volume de 2 ml pour cytogénétique moléculaire sur tube Héparinate de Lithium.

Pour les grossesses interrompues, un prélèvement de tissu fœtal conservé à -80°C au moment de l'examen fœtopathologique sera utilisé.

Dans les formes familiales, seuls les sujets pour lesquels il persiste un doute diagnostic bénéficieront d'une échographie cardiaque de référence. Un seul audiogramme sera réalisé en cas de suspicion de surdité. Une prise de sang sera réalisée aux patients et aux apparentés sains.

Dans les formes sporadiques, une prise de sang sera réalisée à l'enfant malade et à ses parents. Aucune  chocardiographie supplémentaire ne sera réalisée aux enfants malades en plus de celles faisant partie du suivi normal du patient. Les parents et la fratrie de l'enfant bénéficieront d'une auscultation cardiaque. Dans un premier temps, il ne sera pas réalisé d'échocardiographie aux parents et à la fratrie du patient. Si une anomalie génétique est mise en évidence chez le patient, il sera réalisé, dans un second temps, une échocardiographie chez les parents et la fratrie.

Dans le cadre de ce protocole, les patients ne bénéficieront pas d'un suivi supplémentaire que celui faisant parti du suivi normal du patient.

Les prélèvements de sang seront réceptionnés au laboratoire le lundi, mardi, jeudi et vendredi.

Etude génétique

Elle se fera au sein du Laboratoire d'Etude du Polymorphisme de l'ADN   Nantes.

Pour les formes familiales, les gènes candidats seront testés par analyse de liaison. En cas d'exclusion de ces gènes, nous réaliserons une étude de liaison appliquée à l'ensemble du génome à la recherche du locus expliquant la pathologie au sein de la famille (lod score théorique maximum : 3.3). 350 marqueurs microsatellites seront analysés. Une fois la région localisée, la publication de la séquence du génome humain nous donnera accès aux gènes candidats. D'autres familles seront étudiées selon les mêmes principes.

Pour les formes sporadiques, l'implication des quelques gènes candidats sera évaluée par séquençage direct.

Lettre d'information

Etude génétique des cardiopathies conotruncales **familiales et sporadiques**

Vous ou un membre de votre famille est/était atteint d'une malformation cardiaque. Il vous est proposé de participer à une étude génétique dont le but est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de cette pathologie. Une prise de sang sera réalisée (10 ml pour les adultes et les enfants de plus de 5 kg, 4 ml pour les enfants de moins de 5 kg). Pour les grossesses interrompues, un prélèvement de tissu fœtal conservé à -80°C au cours de l'examen fœtopathologique sera utilisé. Nous vous demanderons de signer un consentement de participation à l'étude. Pour les personnes n'ayant pas déjà eu d'échocardiographie ou pour lesquelles il persiste un doute diagnostique, une échocardiographie sera réalisée. Si un trouble de l'audition est suspecté, un audiogramme sera réalisé afin de préciser ce trouble.

Le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale N°2 des Pays de la Loire, siégeant à Nantes, a donné un avis favorable en date du au déroulement de cet essai. Une assurance couvrant ce projet a été souscrite par le promoteur de l'étude : le Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes.

Votre participation à ce projet est librement consentie. Si vous deviez changer d'avis, vous pourriez interrompre votre participation à tout moment sans aucun préjudice quant à la qualité de votre prise en charge médicale.

Le fichier informatique utilisé pour réaliser la présente recherche a fait l'objet d'une demande d'autorisation à la CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés), en application des articles 40-1 et suivants de la loi " informatique et libertés ". Les données médicales vous concernant resteront confidentielles et ne pourront être consultées que par les médecins investigateurs de l'étude, par le promoteur et le cas échéant par les autorités sanitaires habilitées. Vous pouvez exercer vos droits d'accès et de rectification auprès de l'investigateur.

Cette étude est sans bénéfice individuel direct. Aucune période d'exclusion n'est envisagée. En accord avec les articles L 209-9, L 209-17, R 2039 à R 2046 du Code de la santé publique, toutes les personnes participant à cette étude seront inscrites sur le Fichier National des personnes qui se prêtent à des études biomédicales Sans Bénéfice Individuel Direct, et auront la possibilité de vérifier auprès du titulaire de l'autorisation du lieu de recherche ou du ministre chargé de la santé, l'exactitude des données les concernant, présentes dans le fichier, et de la destruction de ces données au terme du délai prévu à l'article R 2045 du Code de la santé publique.

**CONSENTEMENT POUR LA PARTICIPATION A UNE RECHERCHE
BIOMEDICALE SANS BENEFICE INDIVIDUEL DIRECT
DANS LE CAS D'UN SUJET MAJEUR**

**Etude génétique des cardiopathies conotruncales
familiales et sporadiques**

Je soussigné madame, monsieur

résidant

né(e) le

certifie être affilié à un régime de sécurité social.

Le Docteur _____ en qualité de médecin investigateur m'a proposé de participer à la recherche sus citée organisée par le Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes 5, allée de l'Ile Gloriette 44093 Nantes.

Le Docteur _____ m'a proposé de participer à une enquête génétique sur une malformation cardiaque dont je suis atteint ou un membre de ma famille et m'a clairement présenté le protocole, m'indiquant que je suis libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche. Afin d'éclairer ma décision, il m'a remis une lettre d'information précisant clairement les implications d'un tel protocole :

- le but de la recherche
- la méthodologie
- les modalités de mon inscription au fichier national des volontaires

J'ai pu poser toutes les questions nécessaires, notamment sur l'ensemble des éléments déjà cités, afin d'avoir une compréhension réelle de l'information transmise. J'ai obtenu des réponses claires et adaptées, afin que je puisse me faire mon propre jugement.

Toutes les données et informations me concernant resteront strictement confidentielles. J'ai pris connaissance de mon droit d'accès et de rectification des informations nominatives me concernant et qui sont traitées de manière automatisées, selon les termes de la loi.

J'ai connaissance du fait que je peux retirer mon consentement à tout moment du déroulement du protocole et donc cesser ma participation, sans encourir aucune responsabilité et sans que cela puisse porter préjudice à la qualité des soins dont je serai l'objet. Le Docteur sera donc averti de mon éventuel retrait.

Ayant disposé d'un temps de réflexion suffisant avant de prendre ma décision, et compte tenu de l'ensemble de ces éléments, j'accepte librement et volontairement de participer à ce protocole de recherche, dans les conditions établies par la loi, et telles que précisées dans la lettre d'information qui m'a été remise.

Fait à Nantes, le

Signature de l'investigateur
ou d'un médecin le représentant

Signature de la personne
incluse dans le protocole

**CONSENTEMENT POUR LA PARTICIPATION A UNE RECHERCHE
BIOMEDICALE SANS BENEFICE INDIVIDUEL DIRECT
DANS LE CAS D'UN SUJET MINEUR OU MAJEUR PROTEGE**

**Etude génétique des cardiopathies conotruncales
familiales et sporadiques**

Je soussigné madame, monsieur

résidant

né(e) le

certifie être affilié à un régime de sécurité social.

Le Docteur _____ en qualité de médecin investigateur m'a proposé de participer à la recherche sus citée organisée par le Centre Hospitalo-Universitaire de Nantes 5, allée de l'Ile Gloriette 44093 Nantes.

Le Docteur _____ m'a proposé de participer à une enquête génétique sur une malformation cardiaque dont je suis atteint ou un membre de ma famille et m'a clairement présenté le protocole, m'indiquant que je suis libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche. Afin d'éclairer ma décision, il m'a remis une lettre d'information précisant clairement les implications d'un tel protocole :

- le but de la recherche
- la méthodologie
- les modalités de mon inscription au fichier national des volontaires

J'ai pu poser toutes les questions nécessaires, notamment sur l'ensemble des éléments déjà cités, afin d'avoir une compréhension réelle de l'information transmise. J'ai obtenu des réponses claires et adaptées, afin que je puisse me faire mon propre jugement.

Toutes les données et informations me concernant resteront strictement confidentielles. J'ai pris connaissance de mon droit d'accès et de rectification des informations nominatives me concernant et qui sont traitées de manière automatisées, selon les termes de la loi.

J'ai connaissance du fait que je peux retirer mon consentement à tout moment du déroulement du protocole et donc cesser ma participation, sans encourir aucune responsabilité et sans que cela puisse porter préjudice à la qualité des soins dont je serai l'objet. Le Docteur sera donc averti de mon éventuel retrait.

Ayant disposé d'un temps de réflexion suffisant avant de prendre ma décision, et compte tenu de l'ensemble de ces éléments, j'accepte librement et volontairement de participer à ce protocole de recherche, dans les conditions établies par la loi, et telles que précisées dans la lettre d'information qui m'a été remise.

Fait à Nantes, le

Signature de l'investigateur
ou d'un médecin le représentant
tuteur

Signature du sujet

Signature des titulaires
de l'autorité parentale, du

ou du représentant légal

Annexe 2. Publication : Familial deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon caused by cysteine substitution in the first EGF-like domain of JAG1. 2002. Le Caignec C et coll. *Am J Hum Genet* 71 :180-186.

[Annexe 2.pdf](#)

Annexe 3. Projet validé par le comité scientifique du CHU de Nantes portant sur l'étude par technique de CGH array des anomalies génétiques observées chez des fœtus polymalformés.

ANNEXE 3 P.1/6

PHRC 2002 REGIONAL

DRRC de Nantes

Projet n° 20-R4

RESUME DU PROJET DE RECHERCHE

NB : La forme du dossier complet détaillant le projet est libre mais ce formulaire type doit être **obligatoirement** renseigné.

INVESTIGATEUR PRINCIPAL : Dr Jean-Marie RIVAL HOSPITALIER :	ETABLISSEMENT CHU-Nantes-Hotel Dieu
Téléphone :	02 40 08 32 36
Télécopie : 02 40 08 40 20	SERVICE ou DEPARTEMENT
E.mail : jeanmarie.rival@chu-nantes.fr	Génétique Médicale
d'unité principal)	Chef de service ou responsable (si différent de l'investigateur Signature pour aval

INVESTIGATEURS ASSOCIES : SERVICE : ETABLISSEMENT
HOSPITALIER :
(ne citer que les 5 principaux)

Dr C. Le Caignec	Génétique médicale	CHU-Nantes-Hotel Dieu
Dr M. Joubert	Anatomie Pathologique	CHU-Nantes-Hotel Dieu
Dr M. Bocéno	Génétique médicale	CHU-Nantes-Hotel Dieu

TITRE du projet de recherche

Etude descriptive des anomalies génétiques observées chez des fœtus polymalformés

Durée du projet : 3 ans

Montant demandé en Euros : TOTAL 59 850

1^{ère} année :/ 29 925 / 2^{ème} année :/ 29 925 / 3^{ème} année // (détailler la demande en p.6)

MOTS CLES : Discipline médicale Maladie concernée Nature du projet

 /Génétique Médicale/ /Syndromes Polymalformatifs//Exploration par puce à ADN/

ANNEXE 4 P. 2/6

PHRC 2002, Appel à Projets Régional , Projet n° 20-R4

RESUME

Les malformations congénitales sont responsables d'une part importante de la mortalité et de la morbidité infantile. Les facteurs génétiques jouent certainement un rôle majeur dans la genèse de ces malformations. Actuellement, un nombre restreint de gènes a été identifié comme potentiellement responsables, au premier rang desquels les gènes du développement des familles HOX, PAX, SOX ou TBX.

Les anomalies chromosomiques détectables par le caryotype standard rendraient compte de 6 % des malformations. En raison de difficultés liées à la morphologie chromosomique et au degré de résolution microscopique, cette analyse ne permet cependant pas la mise en évidence de fins remaniements dont la taille est inférieure à 5 mégabases. Ainsi, une étude récente (Brewer et coll. 1998 ; 1999) effectuée à partir d'une base de donnée cytogénétique a tenté de rattacher 47 malformations isolées à une région chromosomique particulière et plus précisément à une bande chromosomique. Parmi les anomalies identifiées, 283 bandes ont été retrouvées délétées et 450 dupliquées. Cette absence de corrélation phénotype-génotype étroite n'est pas étonnante lorsqu'on s'adresse à une malformation qui peut être commune à des tableaux cliniques variés. La recherche de locus géniques spécifiques à des syndromes polymalformatifs non identifiés nous paraît plus prometteuse. Malgré les progrès de nouvelles techniques (hybridation *in situ* en fluorescence, analyse par microsatellites) aucune d'entre elles ne permet une analyse rapide du génome.

Les puces à ADN représentent une alternative prometteuse. Tout récemment, des améliorations techniques décisives ont été réalisées. Sur une lame (puce), sont déposés des fragments d'ADN (clones) de différentes régions du génome préférentiellement délétées ou dupliquées dans les syndromes polymalformatifs. Parallèlement, les ADN du patient à tester et d'un sujet contrôle sont marqués de deux fluorochromes de couleurs différentes. Une cohybridation de ces deux ADN est ensuite réalisée sur la puce. Cette technique permet de tester plusieurs centaines ou milliers de régions en un seul temps. Des lames produites par la société Vysis sont commercialisées depuis quelques mois. Plus de 300 sondes différentes dispersées sur tout le génome y sont déposées. Nous disposons au laboratoire du système de lecture (scanner laser) et d'analyse de ces lames (Genosensor, Vysis). Nous envisageons d'appliquer cette technique aux fœtus présentant un syndrome polymalformatif pour lequel aucun diagnostic n'a pu être établi. Cette approche par puce à ADN permet un diagnostic rapide par la mise en évidence d'un remaniement de petite taille impliquant un ou plusieurs des 300 clones fixés sur la puce.

Nous nous proposons d'effectuer une étude rétrospective par cette méthode, sur 75 fœtus (mort fœtale *in utero*, interruption médicale de grossesse), enfants morts nés ou décédés dans la période néonatale précoce porteurs d'un syndrome polymalformatif pour lesquels au moins un tissu congelé est disponible. La mise en évidence d'une étiologie chromosomique infracytogénétique présente deux intérêts. L'un immédiat pour le conseil génétique, l'identification d'un remaniement parental équilibré permet en effet une meilleure estimation d'un risque de récurrence éventuel. Le second intérêt est de concentrer les efforts de recherche des gènes du développement dans les régions chromosomiques les plus fortement associées à une malformation.

PHRC 2002, Appel à Projets Régional , Projet n° 20-R4

LOI HURIET OUI NON X

Si OUI : Identité du promoteur /

Nom :

Adresse :

Dans le cas où il s'agit d'un projet d'essai thérapeutique, préciser les items suivants :

Patients Volontaires sains

Médicamenteux OUI NON

Randomisé OUI NON

Phase (1,2,3 ou 4) / _____ /

Bénéfice individuel direct AVEC SANS

Nombre de sujets prévus / _____ /

PROJET MULTICENTRIQUE OUI NON X

Si OUI précisez les centres associés :

CHU :

CHG, CHS :

CLCC :

Ou le cas échéant médecins libéraux correspondants :

PROJET MULTIDISCIPLINAIRE OUI NON

Si OUI quelles disciplines : /Génétique médicale/ /Anatomie Pathologique/

ANNEXE 4 P.4/6

PHRC 2002, Appel à Projets Régional , Projet n° 20-R4

COFINANCEMENT(S)

Le projet a-t-il été déjà présenté à un financement : OUI NON

Si OUI : PHRC (préciser le ou lesquels)
Autre(s) (préciser le montant de la demande)

Identité du ou des co-financeurs (s'il y a lieu)

Nom : voir ci-dessus

Adresse :

Montant du cofinancement : voir ci-dessus

Association avec les organismes de recherche : (préciser : INSERM, CNRS, INRA,...)

Nom :

Adresse :

Montant et destination du financement accordé par l'organisme de recherche

PHRC 2002, Appel à Projets Régional, Détail de la demande financière

Annexe 4 P. 6/6

DRC : Nantes		Nom de l'investigateur principal :		Projet n° : 20-R4	
		Dr Jean-Marie Rival			
NATURE DE LA DEPENSE	DETAIL	2002	2003	2004	Total Euros
DEPENSES DE PERSONNEL					
Personnel médical					
Personnel non médical					
<i>Sous-total (1)</i>					
DEPENSES MEDICALES					
Pharmacie					
Petit matériel médical					
Fournitures de laboratoires					
Réactifs de laboratoire	75 Lames Genosensor array300 : 45000 E Random priming kit : 9000 E Cyanine 3 et 5 dCTP : 2550 E Extraction ADN : 450 E	28 500	28 500	0	57000
Imagerie					
Sous-traitance à caractère médical					
Maintenance à caractère médical					
<i>Sous-total (2)</i>		28 500	28 500	0	57000
DEPENSES HOTELIERES ET GENERALES					
Petit hôtelier					
Papeterie					
Petit matériel					
Fournitures de bureau et informatique					
Crédit-bail (mat. informatique)					
Location d'équipement					
Maintenance et réparation					
Assurances					
Documentation					
Services extérieurs					
Transport patients					
Personnel ext. à l'établissement					
Missions					
<i>Sous-total (3)</i>		0	0	0	0
DEPENSES FINANCIERES					
Frais financiers (mat. médical)					
Charges exceptionnelles					
Amortissements					

Frais de gestion		1 425	1 425	0	2 850
Sous-total (4)		1 425	1 425	0	2 850
TOTAL (1)+(2)+(3)+(4)		29 925	29 925	0	59 850
(*) Pour les essais dont le CHU se porte promoteur					

PHRC 2002 régional

Dr Jean-Marie RIVAL

Etude descriptive des anomalies génétiques

observées chez des fœtus polymalformés

- I- a) Investigateur principal :** Dr J.M. Rival
b) Co-Investigateurs: Dr C. Le Caignec, Dr M. Joubert
c) Lieux de recherche :Service de Génétique Médicale
Service d'Anatomie Pathologique

II- Type de l'étude : Etude descriptive des anomalies génétiques détectées par la méthode des puces à ADN

Résumé

Les malformations congénitales sont responsables d'une part importante de la mortalité et de la morbidité infantile. Les facteurs génétiques jouent certainement un rôle majeur dans la genèse de ces malformations. Actuellement, un nombre restreint de gènes a été identifié comme potentiellement responsables, au premier rang desquels les gènes du développement des familles HOX, PAX, SOX ou TBX.

Les anomalies chromosomiques détectables par le caryotype standard rendraient compte de 6 % des malformations. En raison de difficultés liées à la morphologie chromosomique et au degré de résolution microscopique, cette analyse ne permet cependant pas la mise en évidence de fins remaniements dont la taille est inférieure à 5 mégabases. Ainsi, une étude récente (Brewer et coll. 1998 ; 1999) effectuée à partir d'une base de donnée cytogénétique a tenté de rattacher 47 malformations isolées à une région chromosomique particulière et plus précisément à une bande chromosomique. Parmi les anomalies identifiées, 283 bandes ont été retrouvées délétées et 450 dupliquées. Cette absence de corrélation phénotype-génotype étroite n'est pas étonnante lorsqu'on s'adresse à une malformation qui peut être commune à des tableaux cliniques variés. La recherche de locus géniques spécifiques à des syndromes polymalformatifs non identifiés nous paraît plus prometteuse. Malgré les progrès de nouvelles techniques (hybridation *in situ* en fluorescence, analyse par microsatellites) aucune d'entre elles ne permet une analyse rapide du génome.

Les puces à ADN représentent une alternative prometteuse. Tout récemment, des améliorations techniques décisives ont été réalisées. Sur une lame (puce), sont déposés des fragments d'ADN (clones) de différentes régions du génome préférentiellement délétées ou dupliquées dans les syndromes polymalformatifs. Parallèlement, les ADN du patient à tester et d'un sujet contrôle sont marqués de deux fluorochromes de couleurs différentes. Une

cohybridation de ces deux ADN est ensuite réalisée sur la puce. Cette technique permet de tester plusieurs centaines ou milliers de régions en un seul temps. Des lames produites par la société Vysis sont commercialisées depuis quelques mois. Plus de 300 sondes différentes dispersées sur tout le génome y sont déposées. Nous disposons au laboratoire du système de lecture (scanner laser) et d'analyse de ces lames (Genosensor, Vysis). Nous envisageons d'appliquer cette technique aux fœtus présentant un syndrome polymalformatif pour lequel aucun diagnostic n'a pu être établi. Cette approche par puce à ADN permet un diagnostic rapide par la mise en évidence d'un remaniement de petite taille impliquant un ou plusieurs des 300 clones fixés sur la puce.

Nous nous proposons d'effectuer une étude rétrospective par cette méthode, sur 75 fœtus (mort fœtale *in utero*, interruption médicale de grossesse), enfants morts nés ou décédés dans la période néonatale précoces porteurs d'un syndrome polymalformatif pour lesquels au moins un tissu congelé est disponible. La mise en évidence d'une étiologie chromosomique infracytogénétique présente deux intérêts. L'un immédiat pour le conseil génétique, l'identification d'un remaniement parental équilibré permet en effet une meilleure estimation d'un risque de récurrence éventuel. Le second intérêt est de concentrer les efforts de recherche des gènes du développement dans les régions chromosomiques les plus fortement associées à une malformation.

III- Durée prévue : 2 ans

IV- Nombre de sujets : 75

V- Etat des connaissances

Les malformations congénitales sont responsables d'une part importante de la mortalité et de la morbidité infantile. Elles rendraient compte de 21 % des admissions pédiatriques (Hall et coll. 1978), 39 % des séjours en unité de soins intensifs (Fitzpatrick et coll. 1991) et 48 % des décès de nouveau-nés à terme (Hogue et coll. 1989). Leur étiologie très hétérogène est sans doute pour une grande part déterminée par des facteurs génétiques. Les études de jumeaux, les agrégations familiales et la reconnaissance de syndromes malformatifs transmis selon des modes mendéliens simples apportent déjà des preuves au rôle joué par le matériel génétique dans la genèse de ces malformations. Actuellement, un nombre restreint de gènes a été identifié comme potentiellement responsables, au premier rang desquels les gènes du développement des familles HOX (39 gènes organisés en 4 complexes chez les vertébrés), PAX (9 gènes identifiés chez l'homme) et plus récemment SOX, SIX, TBX.

Parmi les examens à réaliser devant un syndrome polymalformatif, l'analyse cytogénétique à un niveau de résolution de 400-550 bandes constitue un examen standard à la recherche d'un éventuel réarrangement chromosomique. Les anomalies chromosomiques détectables par le caryotype rendraient compte de 6 % des malformations congénitales (Kalter et coll. 1983). Une étude réalisée à partir de bases de données cytogénétiques rassemblant 1753 patients présentant une délétion et 1621 patients présentant une duplication a tenté de rattacher 47 malformations isolées à une région chromosomique particulière et plus précisément à une bande chromosomique (Brewer et coll. 1998 ; 1999). Parmi les anomalies, 283 bandes ont été retrouvées délétées et 450 dupliquées, réparties respectivement dans 137 et 143 régions chromosomiques différentes. Par type de malformation, une moyenne de 6 bandes distribuées dans 2,9 régions ont été retrouvées délétées contre une moyenne de 9,6 bandes dupliquées réparties dans une moyenne de 3 régions chromosomiques. La taille

moyenne des régions chromosomiques délétées est de 21,7 mégabases (Mb), celle des régions dupliquées de 32,6 Mb. Ceci confirme la notion de meilleure tolérance chez l'homme de l'hyperploïdie par rapport à l'hypoploïdie. Pour une malformation donnée, la distribution des régions chromosomiques délétées ou dupliquées n'est pas chevauchante dans la majorité des cas à l'exception des microphthalmies et colobomes associées à une duplication et une délétion des régions 13q32-34 et 1q41 et de certaines malformations cardiaques, canaux atrioventriculaires, sténose artérielle pulmonaire, tétralogie de Fallot volontiers associées à des délétions 8p, coarctation et hypoplasie du cœur gauche à des duplications 8p. Huit bandes (représentant 2,1 % de la longueur autosomale haploïde) ne sont jamais intéressées par une duplication, 31 (11 % de la longueur autosomale haploïde) par une délétion. Peut-être s'agit-il de régions triplo ou haploléthales, mais il faut également remarquer que la moitié d'entre elles siègent dans des régions péricentromériques, ce qui confirme la difficulté d'explorer ces régions par la microscopie classique. Cette absence de corrélation phénotype-génotype étroite n'est pas étonnante lorsqu'on s'adresse à une malformation qui peut être commune à des tableaux cliniques variés. La recherche de locus géniques spécifiques à des syndromes polymalformatifs non identifiés nous paraît plus prometteuse.

En raison de difficultés liées à la morphologie chromosomique et au degré de résolution microscopique, cette analyse cytogénétique classique ne permet cependant pas la mise en évidence de remaniements dont la taille est inférieure à 5 Mb. L'apport de nouvelles techniques a permis de montrer que des remaniements de plus petite taille, infracytogénétiques, représentent une cause significative des syndromes polymalformatifs. Une première approche consiste en l'utilisation de marqueurs polymorphes microsatellites régulièrement répartis sur l'ensemble du génome. L'étude de onze enfants porteurs de malformations multiples a permis la mise en évidence de deux aneusomies segmentaires non détectées par le caryotype classique (Rosenberg et coll. *Am J Hum Genet* 2000). Cette technique présente cependant les inconvénients d'être coûteuse, lourde et nécessite de disposer de l'ADN des parents mais surtout l'absence d'informativité des marqueurs ne permet pas de conclure dans 25 à 30 % des cas. Elle présente en revanche l'avantage de travailler sur l'ADN du patient et non sur des cellules souvent inaccessibles lorsque le patient est décédé. Une seconde approche consiste à marquer par fluorescence un fragment d'ADN spécifique d'une région chromosomique donnée puis à hybrider cet ADN marqué sur un étalement chromosomique du patient à tester. Cette technique de FISH (hybridation *in situ* en fluorescence) permet de visualiser des délétions de très petite taille. Elle a permis, entre autres, de montrer que 7.4 % des enfants avec retard mental modéré à sévère associé ou non à une ou plusieurs malformations présentaient un remaniement subtélomérique (Knight et coll. *Lancet* 1999). La technique de FISH présente cependant l'inconvénient d'être coûteuse et nécessite de disposer de cellules vivantes en grande quantité. Plus encore, le temps d'analyse des métaphases au microscope est long et limite à quelques dizaines le nombre de régions étudiées. Malgré les nombreuses tentatives visant à améliorer ces techniques, aucune d'entre elles ne permet une analyse rapide du génome.

Les puces à ADN, également appelée array Comparative Genomic Hybridization (array CGH) représentent une alternative prometteuse. Tout récemment, des améliorations techniques décisives ont été réalisées. Sur cette puce, sont déposés des fragments d'ADN (clones) de différentes régions du génome préférentiellement délétées ou dupliquées dans les syndromes polymalformatifs. Chaque clone est déposé en trois exemplaires. Parallèlement, les ADN du patient à tester et d'un sujet contrôle sont marqués de deux fluorochromes de couleurs différentes. Une cohybridation de ces deux ADN est ensuite réalisée sur la puce. Cette technique permet de tester plusieurs centaines ou milliers de régions en un seul temps. En l'absence de remaniement, un rapport d'intensité des 3 signaux d'hybridation de chaque clone de 1 : 1 est attendu, indiquant un nombre égal de copies d'ADN dans chacun des deux

échantillons. Un rapport de 1 :2 est attendu en présence d'une délétion tandis qu'un rapport de 3 :2 est attendu dans le cas d'une duplication. L'analyse des lames se fait par mesure de l'intensité de fluorescence grâce à un lecteur scanner et ne prend que quelques minutes. Cette approche a permis l'étude de patients atteints du syndrome du cri du chat, présentant une délétion de la partie terminale du chromosome 5 (Snijders et coll. Nature Genet 2001, Zhang et coll. Am J Hum Genet 2001). Une région chromosomique de très petite taille (infracytogénétique) responsable du tableau clinique a pu être dégagée ainsi qu'une sous-région préférentiellement responsable du retard mental de ces enfants. Plus récemment encore, l'étude de 20 patients avec retard mental lié à un remaniement subtélomérique identifié préalablement par technique de FISH a pu être confirmé par puce à ADN. Parmi ces patients, trois remaniements supplémentaires ont été identifiés (Veltman et coll. Am J Hum Genet 2002). Cette approche nécessite des lames sur lesquelles sont déposées des sondes (puce à ADN) et un scanner laser couplé à un système d'analyse informatique. Des lames (GenoSensor array 300) produites par la société Vysis sont commercialisées depuis quelques mois. Plus de 300 sondes différentes dispersées sur tout le génome, dont toutes les régions subtélomériques, y sont déposées. Nous disposons au laboratoire du système de lecture (scanner laser) et d'analyse de ces lames (Genosensor, Vysis). Nous avons déjà confirmé par cette méthode trois remaniements complexes préalablement identifiés par FISH (résultats en cours de publication). Enfin, nous appliquons à d'autres études ces techniques de génétique moléculaire en routine depuis plusieurs années.

Nous nous proposons d'appliquer cette méthode aux fœtus présentant un syndrome polymalformatif pour lequel aucun diagnostic n'a pu être établi. Nous nous intéresserons aux syndromes associant d'une part au moins deux malformations dont l'une au moins appartient au groupe des malformations cardiaques, craniofaciales ou du système nerveux central, d'autre part au moins trois malformations n'appartenant pas à l'un de ces trois groupes. Ces syndromes polymalformatifs nous semblent pouvoir être expliqué, en partie, par des remaniements chromosomiques parfois de petites tailles, impliquant en particulier les régions subtélomériques. Ce projet se fait en collaboration avec le Dr M. Joubert responsable de la fœtopathologie au sein du service d'Anatomie Pathologique. Chaque année au CHU de Nantes, quinze à trente fœtus (mort fœtale *in utero*, interruption médicale de grossesse) ou enfants morts nés ou décédés dans la période néonatale précoce sont porteurs d'un syndrome polymalformatif sans diagnostic génétique précis. Depuis plus de 15 ans, devant tout syndrome polymalformatif ayant fait l'objet d'une demande d'autopsie fœtale, plusieurs prélèvements de tissu frais sont systématiquement conservés à -80°C . Ce type de prélèvement est souvent le seul disponible en cas d'interruption de grossesse pour syndrome polymalformatif. Il permet une extraction d'ADN rapide et simple. En revanche, dans la grande majorité des cas, aucun tissu vivant n'étant conservé, la technique de FISH n'est pas envisageable. Cette approche par puce à ADN permet un diagnostic rapide par la mise en évidence d'un remaniement de petite taille impliquant un ou plusieurs des 300 clones fixés sur la puce. La mise en évidence d'une étiologie chromosomique infracytogénétique est importante pour le conseil génétique. L'identification d'un remaniement parental équilibré permet en effet une meilleure estimation d'un risque de récurrence éventuel. Par ailleurs, une corrélation entre différentes associations de malformations et certaines régions chromosomiques pourrait être dégagée. La publication de la séquence du génome humain permettrait dans un second temps de préciser l'implication de nouveaux gènes du développement impliqués dans la genèse de ces malformations.

Références

Brewer C et coll. A chromosomal deletion map of Human malformations. *Am J Hum Genet* 63 :1153-1159 ; 1998

Brewer C et coll. A chromosomal duplication map of malformations : Regions of suspected Haplo- and Triplolethality and tolerance of segmental aneuploidy in Humans. *Am J Hm Genet* 64 :1702-1708 ; 1999

FitzPatrick DR et coll. Genetic aspects of paediatric intensive care unit admissions. *Arch Dis Child* 66 :639-641 ; 1991

Hall JG et coll. The frequency and financial burden of genetic disease in a paediatric hospital. *Am J Med Genet* 1 :417-436 ; 1978

Hogue CJ et coll. Overview of the National Infant Mortality Surveillance (NIMS) project. *MMWR CDC Surveill Summ* 38 :1-46 ; 1989

Kalter H et coll. Medical progress. Congenital malformations : etiologic factors and their role in prevention. *N Engl J Med* 308 :491-497 ; 1983

Knight SJL et coll. Sublte chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354 :1676-1681 : 1999

Rosenberg MJ et coll. Detection of chromosomal aberrations by whole-genome microsatellite screen. *Am J Hum Genet* 66 :419-427 ; 2000

Snijders AM et coll. Assembly of micoarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nature Genet* 29 :263-264 ; 2001

Veltman JA et coll. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 70 :1269-1276 ; 2002

Zhang X et coll. Association of Cri du Chat phenotype with DNA copy number abnormalities measured by array CGH. *Am J Hum Genet*, A279 Sup 2001

VI- Hypothèses de travail et objectifs de l'étude

Les malformations congénitales sont responsables d'une part importante de la mortalité et de la morbidité infantile. Leur étiologie très hétérogène est pour une grande part déterminée par des facteurs génétiques. Les anomalies chromosomiques expliquent une part des syndromes polymalformatifs. Malgré les examens réalisés, une délétion ou une duplication de très petite taille est rarement mise en évidence. Les puces à ADN (array-Comparative Genomic Hybridization) permettent l'identification de ces microremaniements. Nous nous proposons d'effectuer une étude rétrospective par cette méthode, sur 75 fœtus (mort fœtale *in utero*, interruption médicale de grossesse), enfants morts nés ou décédés dans la période néonatale précoce porteurs d'un syndrome polymalformatif pour lesquels au moins un tissu congelé est disponible. Cette étude permettrait une description des anomalies cytogénétiques présentées par ces sujets et de les relier aux malformations observées au moment de l'examen fœtopathologique.

VII- Méthodologie

Critères d'inclusion

1) Type de fœtus ou enfants

- fœtus morts *in utero* ou ayant fait l'objet d'une interruption médicale de grossesse
- enfants morts nés ou décédés dans la période néonatale précoce
- un compte-rendu détaillé de l'examen foetopathologique ainsi qu'au moins un prélèvement tissulaire conservé à -80°C sont disponibles

2) Type de malformation

Association d'au moins deux malformations dont l'une au moins appartient au groupe des malformations cardiaques, craniofaciales ou du système nerveux central

Association d'au moins trois malformations n'appartenant pas à l'un de ces trois groupes

Groupes de malformations

- malformations cardiaques (communication interventriculaire ou interauriculaire, canal artériel persistant, tronc artériel commun, transposition des gros vaisseaux, tétralogie de Fallot, coarctation aortique, hypoplasie du ventricule droit ou gauche, sténose de l'artère pulmonaire, dysplasie valvulaire)
- malformations craniofaciales (fente labiale ou palatine, atrésie des choanes, dysmorphie faciale)
- malformations du système nerveux central (microcéphalie, macrocéphalie, hydrocéphalie, anencéphalie, myéloméningocèle, holoprosencéphalie, agénésie du corps calleux, malformation de Dandy-Walker, lissencéphalie, craniosténose, spina bifida)
- malformations rénales (agénésie rénale uni ou bilatérale, reins multikystiques, hydronéphrose)
- malformations génitales (hypospadias, épispadias, ambiguïté sexuelle)

- malformations digestives (imperforation anale, omphalocèle, maladie de Hirschsprung, atrésie duodénale, hernie inguinale, ombilicale ou diaphragmatique, anomalie de situs)
- malformations squelettiques (pieds varus équins, polydactylie, agénésie de membre, agénésie sacrée)
- malformations oculaires (microphthalmie, anophthalmie, aniridie, colobome, cataracte)

Critères d'exclusion

Fœtus ou enfants pour lesquels une étiologie chromosomique ou génique a pu être rattachée au syndrome polymalformatif

Nombre de patients inclus

S'agissant d'une étude génétique, il est impossible à calculer et est donc fixé arbitrairement à 75

Méthodologie

Inclusion des sujets

Les sujets étudiés sont ceux répondant aux critères d'inclusion.

Pour tous les sujets étudiés, un compte-rendu détaillé de l'examen foetopathologique ainsi qu'au moins un prélèvement tissulaire conservé à -80°C sont disponibles.

Etude génétique

Elle se fera au sein du Laboratoire de Cytogénétique Constitutionnelle du CHU de Nantes. Une extraction d'ADN est réalisée à partir d'un fragment de tissu congelé et conservé à -80°C . Chaque ADN à tester est marqué par Random Priming par un fluorochrome (Cy3 ou Cy5). Une cohybridation entre l'ADN du patient à tester et un ADN témoin marqué d'une autre couleur est ensuite réalisée sur la puce. Une seule puce GenoSensor Array 300 est utilisée par sujet. L'ADN du sujet à tester est du sexe opposé à celui de l'ADN contrôle. Plusieurs sondes disposées sur les chromosomes X et Y servent ainsi au contrôle de la bonne qualité d'hybridation. Un scanner laser permet une mesure de l'intensité de fluorescence émise par chacun des 900 dépôts (chacun des 300 clones est déposé en trois exemplaires).

Analyse des résultats

Un logiciel informatique (GenoSensor Reader) aide à l'interprétation des résultats. Chaque clone est déposé en trois exemplaires (triplicate). Chaque dépôt est analysé indépendamment. Puis, une moyenne de l'intensité de fluorescence des trois dépôts est calculée pour chaque clone. Le logiciel évalue l'homogénéité d'intensité de fluorescence de chacun des trois dépôts de chaque clone. Une éventuelle discordance entre le résultat d'un dépôt et les deux autres est signalée par le logiciel. L'exclusion d'un signal discordant est possible.

En l'absence de remaniement, un rapport d'intensité des 3 signaux d'hybridation de chaque clone de 1 :1 est attendu, indiquant un nombre égal de copies d'ADN dans chacun des deux échantillons. Un rapport de 1 :2 est attendu en présence d'une délétion tandis qu'un rapport de 3 :2 est attendu dans le cas d'une duplication. Lorsque les signaux d'hybridation indiquent une délétion ou une duplication de plusieurs clones successifs, un remaniement cytogénétique

est très probable. Une concordance entre les données cliniques de l'examen foetopathologique et la région chromosomique impliquée pourra aider à confirmer le lien entre les malformations et le remaniement génétique. La délétion ou duplication d'un seul clone est d'interprétation plus délicate, la présence d'un résultat faussement positif étant possible. Les informations cliniques aideront à établir un lien entre la région chromosomique impliquée et les malformations observées.

Perspectives

Lorsqu'un seul clone est dupliqué ou délété, la perte d'hétérozygotie d'au moins un marqueur microsatellite informatif apporterait la confirmation du remaniement. Il serait alors nécessaire de disposer d'un prélèvement de sang des parents.

Une même région chromosomique délétée ou dupliquée pourrait être retrouvée chez plusieurs sujets présentant un tableau clinique proche. La publication de la séquence du génome humain permettrait dans un second temps de préciser l'implication de nouveaux gènes du développement impliqués dans la genèse de ces malformations.

Annexe 4.

Autres articles publiés ou sous presse.

Parallèlement à mon travail de thèse, au cours de ces deux dernières années, mon activité clinique et de laboratoire au sein du service de Génétique Médicale du CHU de Nantes m'ont permis de développer ou de participer à d'autres sujets. Certains ont conduit à une publication scientifique. Ces travaux ne portent pas sur les malformations cardiaques congénitales et n'ont donc pas de lien direct avec mon sujet de thèse. Je joins en annexe ces articles publiés ou sous presse sans en développer le contenu.

Génétique des cardiopathies conotruncales familiales et sporadiques

Les malformations cardiaques congénitales occupent la première place des malformations à la naissance, présentes chez près de 1 % des enfants. Malgré une hérédité multifactorielle évoquée dans la majorité des cas, une transmission monogénique a été démontrée grâce à la mise en évidence de mutations au sein des gènes *NKX2.5*, *GATA4* ou *JAG1* dans des familles avec malformations cardiaques congénitales.

Dans ce travail, le recrutement de patients avec cardiopathie conotruncale sporadique ou familiale nous a permis de décrire une famille au sein de laquelle plusieurs membres présentent un phénotype original associant surdité, embryotoxon postérieur et malformation cardiaque, lié à une nouvelle mutation faux-sens (C234Y) au sein de *JAG1*.

Nous avons également étudié 55 fœtus polymalformés, dont une majorité avec cardiopathie, grâce à une nouvelle technique : la CGH array. Neuf anomalies ont été identifiées, quatre délétions, une trisomie 21 et quatre duplications subtélomériques 10q.

Genetic basis of inherited and sporadic conotruncal heart defects

Congenital heart disease is the most common birth defect, occurring in almost 1% of live births. Although multifactorial inheritance has been postulated for the majority of cases, single-gene transmission is demonstrated by the observation of mutations in *NKX2.5*, *GATA4*, or *JAG1*, within families segregating congenital heart defects.

In the present study, we collected blood samples from patients with sporadic or familial conotruncal heart defects. We described a kindred segregating a unique phenotype with highly penetrant deafness, posterior embryotoxon, and congenital heart defects. We have identified a novel missense mutation (C234Y) in the *JAG1* protein, which demonstrates that mutations in *JAG1* can cause hearing loss.

We also studied 55 polymalformed fetus, including congenital heart defect for the majority, using a new powerful technology: array CGH. Nine abnormalities were identified among them four deletions, one trisomy 21, and four subtelomeric duplication 10 q.

DISCIPLINE: Génétique moléculaire

MOTS-CLES: Génétique; Malformation cardiaque congénitale; Cardiopathie conotruncale; *JAG1*; CGH array; Fœtus polymalformés

LEPA, Faculté de Médecine de Nantes, 1, rue Gaston Veil 44035 NANTES Cedex 1