

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE NANTES

APPROCHE GENETIQUE DES PATHOLOGIES CARDIAQUES

RYTHMIQUES ET VALVULAIRES

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline Médecine

Spécialité Cardiologie

Présentée et soutenue publiquement par

PROBST VINCENT

Le 6 janvier 2005, devant le jury ci-dessous

Président : ESCANDE Denis, Professeur des Universités, Nantes

Rapporteurs GHICHENEY Pascale, Directeur de recherche, Paris

BABUTY Dominique, Professeur des Universités, Tours

Examineurs MABO Philippe, Professeur des Universités, Rennes

SCHOTT Jean-Jacques, Chargé de recherche, Nantes

Directeur de thèse , LE MAREC Hervé, Professeur des Universités, Nantes

INTRODUCTION GENERALE	11
PREMIERE PARTIE :	17
APPROCHE GÉNÉTIQUE DES TROUBLES DE LA CONDUCTION ET DU SYNDROME DE BRUGADA.	17
I. Les troubles de la conduction dégénératifs.	18
I.A. Introduction.	18
I.A.1. Rappels anatomiques.	18
I.A.2. Rappel sur la conduction auriculo-ventriculaire.	21
I.A.2.a. Activité électrique cardiaque.	21
I.A.2.b. Conduction dans le nœud sinusal.	21
I.A.2.c. Conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire.	22
I.A.2.d. Conduction dans le système de His-Purkinje.	22
I.A.2.e. Degré du bloc.	22
I.A.2.f. Sièges du bloc.	23
I.A.3. Incidence des troubles de la conduction dégénératifs.	23
I.A.4. Étiologies des troubles de la conduction.	23
I.A.5. Les troubles de la conduction, une maladie génétique...	24
I.A.6. Caractéristiques électrocardiographiques et cliniques.	29
I.A.7. Explorations électrophysiologiques invasives.	30
I.A.8. Étude anatomopathologique et histologique.	31
I.A.9. Hypothèses physiopathologiques.	31
I.A.9.a. Anomalies des canaux ioniques et des connexines cardiaques.	32
I.A.9.b. Anomalie de développement du système de conduction cardiaque.	32

I.A.9.c.	Changements de l'architecture cellulaire du tissu cardiaque.	35
I.B.	Approche génétique des troubles de la conduction dégénératifs.	39
I.B.1.	Matériel et méthodes.	39
I.B.1.a.	Identification des familles.	39
I.B.1.b.	Caractérisation phénotypique.	40
I.B.1.c.	Etude génétique, analyse de liaison génétique.	41
I.B.1.c.1.	Principe.	41
I.B.1.c.2.	Test statistique : la méthode paramétrique des lod scores.	41
I.B.1.c.3.	Extraction de l'ADN génomique.	42
I.B.1.c.4.	Génotypage.	42
I.A.1.a.i.a.1.	Génotypage avec des amorces fluorescentes.	42
I.A.1.a.i.a.2.	Génotypage avec des amorces non fluorescentes.	42
I.A.1.a.i.a.3.	PCR (Polymerase Chain Reaction).	43
I.A.1.a.i.a.4.	Marquage fluorescent des fragments de PCR.	43
I.A.1.a.i.a.5.	Purification des fragments de PCR fluorescents.	44
I.A.1.a.i.a.6.	Migration électrophorétique sur séquenceur.	44
I.A.1.a.i.a.7.	Analyse des génotypes.	44
I.B.1.d.	Statistiques.	44
I.B.2.	Etude génétique et phénotypique de la famille C.	45
I.B.2.a.	Caractérisation phénotypique.	45
I.B.2.b.	Etude génétique de la famille C.	46
I.B.2.b.1.	Locus de troubles de conduction.	47
I.B.2.b.2.	Locus des connexines cardiaques.	47
I.B.2.b.3.	Locus du canal sodique cardiaque <i>SCN5A</i> .	47
I.B.2.c.	Etude d'expression fonctionnelle.	50
I.B.2.d.	Analyse genotype-phénotype de la famille C.	55
I.B.2.d.1.	Evolution des troubles de la conduction au cours du temps.	58
I.B.2.e.	Résumé des résultats.	62
I.B.3.	Etude génétique et phénotypique dans la famille B.	63

I.B.3.a.	Analyse phénotypique de la famille B.	63
I.B.3.b.	Analyse génétique de la famille B.	65
I.B.3.c.	Evolution des paramètres de la conduction dans la famille B.	71
I.B.3.d.	Résumé des résultats.	73
I.B.4.	Etude phénotypique des familles Ch., G. et N.	73
I.B.4.a.	Analyse globale des formes héréditaires de la maladie de Lenègre.	78
I.B.4.b.	Résumé des résultats ;	79
I.B.5.	Etude de prévalence des mutations du gène SCN5A dans les troubles de la conduction dégénératifs.	80
I.B.6.	Approche d'épidémiologie.	81
II.	Syndrome de Brugada.	86
II.A.	Introduction.	87
II.A.1.	Critères électrocardiographiques diagnostiques.	87
II.A.2.	Données épidémiologiques et cliniques.	91
II.A.3.	Mécanismes physiopathologiques.	94
II.A.3.a.	Courants ioniques et potentiel d'action.	94
II.A.3.b.	Théorie d'Antzelevitch et al.	95
II.A.3.c.	Mécanismes d'action des agents bloqueurs sodiques.	100
II.A.3.d.	Rôle du système nerveux autonome.	101
II.A.3.e.	Autres hypothèses physiopathologiques.	102
II.A.4.	Aspects génétiques du syndrome de Brugada.	103
II.B.	Matériel et méthodes.	106
II.B.1.	Diagnostic clinique du syndrome de Brugada.	107
II.B.1.a.	Critères d'inclusions.	107
II.B.1.b.	Critères d'exclusions.	107
II.B.1.c.	Critères d'atteintes :	107
II.B.1.d.	Critères de non-atteintes :	107

II.B.2.	Principe et technique de biologie moléculaire.	108
II.B.2.a.	Extraction de l'ADN.	108
II.B.2.b.	Détection de mutations.	109
II.B.2.b.1.	La DHPLC.	109
II.B.2.b.2.	Le séquençage.	109
II.B.3.	Etude des relations phénotype-génotype.	110
II.C.	Résultats.	111
II.C.1.	Analyses des familles mutées sur le gène SCN5A.	111
II.C.1.a.	Famille P.	111
II.C.1.a.1.	Etude clinique.	112
II.C.1.a.2.	Etude génétique.	114
II.C.1.a.3.	Etudes fonctionnelles.	115
II.C.1.a.4.	Résumé des résultats.	118
II.C.1.b.	Famille J.	118
II.C.1.b.1.	Etude clinique.	118
II.C.1.b.2.	Etude génétique.	121
II.C.1.b.3.	Etudes fonctionnelles.	122
II.C.1.b.4.	Résumé des résultats.	124
II.C.1.c.	Etude de la famille R.	124
II.C.1.c.1.	Etude clinique.	125
II.C.1.c.2.	Etude génétique.	128
II.C.1.c.2.1.	Séquençage du gène <i>SCN5A</i> .	128
I.A.1.a.i.a.8.	Analyse de liaison génétique sur l'ensemble du génome.	129
II.C.1.c.3.	Résumé des résultats.	132
II.C.2.	Analyse globale des familles mutées sur le gène SCN5A.	132
II.C.3.	Analyse des familles non-liées au gène SCN5A.	136
II.C.3.a.	Analyse phénotypique.	136
II.C.3.a.1.	FAMILLE W.	136
II.C.3.a.2.	FAMILLE M.	137

II.C.3.a.3. FAMILLE JU.	138
II.C.3.b. Analyse de biologie moléculaire.	140
II.C.3.b.1. Analyse gène candidat.	140
II.C.3.b.2. Analyse de liaison sur génome entier	140
II.C.4. Relation génotype-phénotype dans le syndrome de Brugada.	143
II.C.4.a. Fichier collaboratif.	143
II.C.4.a.1. Critères ECG prédictifs d'une mutation SCN5A.	143
II.C.4.a.2. Pronostic à long terme du syndrome de Brugada.	147
II.C.4.b. Fichier du réseau Ouest.	154
II.D. Discussion.	157
II.D.1. L'implication du gène SCN5A dans les troubles de la conduction, le syndrome de Brugada et le syndrome du QT long congénital.	157
II.D.1.a. Structure du canal sodique.	157
II.D.1.b. Fonctionnement du canal sodique.	157
II.D.1.c. Implication du gène <i>SCN5A</i> dans les pathologies cardiaques.	159
II.D.1.c.1. Rôle du gène SCN5A dans le syndrome du QT long LQT3.	159
II.D.1.c.2. Rôle du gène SCN5A dans le syndrome de Brugada.	159
II.D.1.c.3. Rôle du gène SCN5A dans les troubles de la conduction dégénératifs.	160
II.D.1.c.4. Hétérogénéité phénotypique induite par les mutations de <i>SCN5A</i> .	161
II.D.1.c.5. Facteurs potentiels impliqués dans les variations phénotypiques associées aux mutations du gène SCN5A.	163
I.A.1.a.i.a.9. Facteurs environnementaux responsables de variations phénotypiques.	163
I.A.1.a.i.a.10. Facteurs génétiques responsables de variations phénotypiques.	164
II.D.1.c.6. Hétérogénéité génétique du SB et des troubles de la conduction dégénératifs.	165
II.E. Perspectives	166

II.E.1. Définition de nouvelles normes pour les durées des différents paramètres électrocardiographiques en fonction de l'âge.	166
II.E.2. Evaluation des facteurs modulateurs influençant l'évolution des troubles de la conduction dégénératifs et du syndrome de Brugada.	167
II.E.3. Modèle animal de troubles de la conduction dégénératifs.	169
II.E.4. Evaluation du rôle des facteurs environnementaux sur l'évolution du syndrome de Brugada et des troubles de la conduction dégénératifs.	170
DEUXIEME PARTIE :	171
APPROCHE GÉNÉTIQUE DES VALVULOPATHIES À DÉGÉNÉRESCENCE MYXOÏDE ET DU RÉTRÉCISSEMENT AORTIQUE CALCIFIÉ.	171
I. Les valvulopathies à dégénérescence myxoïde.	172
I.A. Introduction.	172
I.A.1. Classification de la dégénérescence myxoïde.	172
I.A.1.a. Prolapsus valvulaire mitral myxomateux ou maladie de Barlow.	172
I.A.1.b. Dystrophies valvulaires aortiques isolées et dystrophies multivalvulaires.	173
I.A.1.c. Dystrophies valvulaires syndromiques.	174
I.A.1.c.1. Le syndrome de Marfan.	174
I.A.1.c.2. Le syndrome d'Ehlers-Danlos.	175
I.A.1.c.3. L'ostéogénèse imparfaite.	175
I.A.1.c.4. Le pseudoxanthoma elasticum.	175
I.A.1.c.5. Les mucopolysaccharidoses.	176
I.A.1.c.6. Les cardiomyopathies dilatées.	176
I.A.1.c.7. Autres syndromes.	176
I.A.1.d. Les valvulopathies d'origine immunitaire.	177
I.A.1.e. Fréquence et répartition selon l'âge et le sexe.	177
I.A.2. Lésions histologiques.	178

I.A.3.	Aspects cliniques du prolapsus valvulaire mitral.	181
I.A.3.a.	Symptomatologie.	181
I.A.3.b.	Aspects auscultatoires.	181
I.A.3.c.	Aspects électrocardiographiques.	181
I.A.3.d.	Aspects échocardiographiques.	182
I.A.3.e.	Pronostic et complications.	182
I.A.4.	Aspect génétique du prolapsus valvulaire mitral.	183
I.B.	Matériel et méthodes.	184
I.B.1.	Méthodes de détermination du phénotype.	184
I.B.1.a.	Examen clinique et échocardiographique.	184
I.B.1.b.	Analyses statistiques.	186
I.B.1.c.	Analyses biologiques.	186
I.B.1.d.	Identification de nouvelles branches familiales à la famille atteinte de valvulopathie myxoïde pour réduire l'intervalle de liaison.	186
I.B.1.e.	Enquête généalogique ascendante.	187
I.C.	Résultats.	188
I.C.1.	Analyse clinique et génétique d'une famille atteinte d'une valvulopathie myxoïde liée au chromosome X.	188
I.C.1.a.	Analyse clinique.	188
I.C.1.b.	Caractéristiques cliniques des hommes.	189
I.C.1.b.1.	Anomalies de la valve mitrale.	189
I.C.1.b.2.	Anomalies de la valve aortique.	192
I.C.1.b.3.	Anomalies hématologiques.	192
I.C.1.c.	Etude génétique.	193
I.C.1.c.1.	Caractéristiques cliniques des femmes.	196
I.C.2.	Identification de nouvelles branches familiales pour la famille V.	198
I.C.2.a.	Branche atteinte de dystrophie valvulaire et d'hémophilie A.	198
I.C.2.b.	Branche D et R, atteintes d'hémophilie A mineure isolée.	200

I.C.3.	Recherche de mutation dans les gènes candidats de la région.	203
I.C.4.	Formes autosomiques dominantes de prolapsus valvulaire mitral.	207
I.D.	Discussion.	210
II.	Le rétrécissement aortique calcifié.	214
II.A.	Introduction.	214
II.A.1.	Étiologie du rétrécissement aortique.	214
II.A.1.a.	Rétrécissement aortique dégénératif sur valve bi ou tricuspide.	215
II.A.1.b.	Rhumatisme articulaire aigu.	217
II.A.1.c.	Le rétrécissement aortique congénital.	217
II.A.2.	Présentation clinique du rétrécissement aortique.	218
II.A.2.a.	Histoire naturelle du rétrécissement aortique.	218
II.A.3.	Physiopathologie du rétrécissement aortique.	219
II.A.3.a.	Angor.	220
II.A.3.b.	Syncope.	220
II.A.3.c.	Insuffisance cardiaque congestive.	221
II.A.4.	Progression du rétrécissement aortique.	221
II.A.5.	Hypothèses physiopathologiques.	222
II.A.6.	Diagnostic du rétrécissement aortique.	222
II.A.7.	Prise en charge thérapeutique du rétrécissement aortique.	224
II.A.8.	Formes familiales de rétrécissement aortique.	225
II.B.	Matériel et méthodes.	226
II.B.1.	Approche d'épidémiologie génétique.	226
II.B.2.	Évaluation clinique du rétrécissement aortique.	227
II.B.3.	Screening de la population issue de la commune de la famille A.	228
II.C.	Résultats.	229
II.C.1.	Évaluation de la répartition géographique des formes chirurgicales de rétrécissement aortique dans l'ouest de la France.	229

II.C.2. Mise en évidence de formes familiales de rétrécissement aortique.	231
II.C.2.a. Famille A.	231
II.C.2.b. Famille B.	232
II.C.2.c. Famille C.	233
II.C.2.d. Famille D.	234
II.C.2.e. Famille E.	235
II.C.3. Analyse génétique de la famille A.	235
II.C.4. Approche généalogique du rétrécissement aortique.	236
II.C.5. Analyse génétique de la famille A étendue.	239
II.D. Discussion.	239
DISCUSSION GÉNÉRALE	243
BIBLIOGRAPHIE	246

INTRODUCTION GENERALE

Jusqu'à récemment, la place de la génétique était restreinte à des pathologies le plus souvent rares et entraînant une atteinte sévère dès les premières années de la vie. Ces maladies étaient donc facilement identifiables au sein d'une famille et l'atteinte précoce dans une fratrie en rendait le caractère héréditaire évident. Les premiers gènes responsables de ces différentes pathologies ont ainsi pu être progressivement identifiés ce qui a permis des progrès importants dans la compréhension de ces maladies grâce à la ré-expression des gènes mutés dans des systèmes adaptés ou à la création de modèles animaux trans-géniques.

Il ne s'agissait cependant que de maladies rares qui ne touchaient qu'un nombre restreint de patients et n'avaient qu'un intérêt limité pour la prise en charge quotidienne des patients. Ces dernières années ont été marquées par l'explosion de l'importance de la génétique au sein des maladies cardiovasculaires. Récemment, la découverte de gènes impliqués dans des pathologies fréquentes et intéressant donc potentiellement une part importante des patients suivis pour des pathologies cardiovasculaires, a fait apparaître l'intérêt de la génétique pour améliorer la prise en charge de ces patients (Kim R. J. et al. 2003; Luft F. C. 2004; Vergopoulos A. et al. 2002).

Deux stratégies différentes peuvent être utilisées pour étudier les facteurs génétiques responsables des maladies héréditaires : les études gènes candidats et les études sur génome entier appelées également génétique inverse.

Le principe des études gènes candidats consiste, à partir d'une population de patients clairement identifiés pour être atteint de la maladie étudiée, à rechercher parmi des gènes qui semblent pouvoir être impliqués dans les mécanismes de la maladie en raison de la physiopathologie supposée de celle-ci, la présence de variations de séquence de l'ADN. Il faut ensuite comparer la fréquence allélique entre les sujets atteints et les contrôles sains. Cette méthode a l'avantage de pouvoir être réalisée chez des cas index sans nécessiter d'information sur le pedigree des patients inclus. En revanche, elle nécessite une sélection préalable de gènes candidats fonctionnels pertinents à partir d'hypothèses physiopathologiques sur les mécanismes de la maladie. Le nombre de ces gènes peut être élevé et nos connaissances souvent imparfaites

de la physiopathologie de la maladie rendent le choix de ces gènes candidats difficiles.

Une alternative à cette approche, est l'utilisation de la génétique inverse. Cette technique ne nécessite pas d'hypothèse physiopathologique. Elle consiste à rechercher une association entre le phénotype étudié dans une famille et un locus défini à partir de marqueurs génétiques répartis sur l'ensemble du génome. Ces marqueurs sont des séquences polymorphes d'ADN dont la localisation chromosomique est parfaitement définie. Les marqueurs les plus fréquemment utilisés dans ces approches sont les marqueurs microsatellites ou marqueurs multialléliques, pour lesquels des cartes denses ont été développées. Ces polymorphismes n'auraient aucune signification fonctionnelle et représenteraient des variations génétiques aléatoires. Le succès de ces méthodes dépend de plusieurs facteurs et en particulier de la proximité de ces marqueurs avec le gène et donc de la densité des marqueurs utilisés. Les marqueurs microsatellites testés dans ces études sont espacés en moyenne tous les 5 à 20 cM, mais dans le cadre du projet génome humain et du consortium S. N. P. (Single Nucleotide Polymorphism), des cartes très denses de marqueurs mono nucléotides seront bientôt disponibles. Ces S. N. P., seront situés en moyenne tous les 300 à 1000 paires de bases et permettront donc un criblage du génome beaucoup plus fin.

Quels que soient les marqueurs utilisés, cette analyse est basée sur l'estimation de la fréquence de la recombinaison entre les marqueurs génétiques et le gène morbide, c'est-à-dire la probabilité pour que les allèles de ces deux locus apparaissent dans une combinaison différente de celle de la génération parentale. Plus les deux locus sont éloignés, plus les chances de recombinaison au cours des méioses sont élevées. En conséquence, plus les familles sont grandes avec de nombreuses générations et donc de nombreuses méioses, plus il y a de chance d'identifier des événements de recombinaison. Ces événements de recombinaison permettent de déterminer sans ambiguïté l'origine parentale de chaque allèle et la combinaison des allèles sur le chromosome chez les parents respectifs.

La preuve statistique d'une liaison génétique est mesurée par le logarithme de l'odds (LOD) score. Il s'agit du logarithme de base 10 du rapport de la probabilité de liaison sur la probabilité de non-liaison. On considère un score supérieur à 3 comme une preuve de liaison significative (risque d'erreur de 1/1000). Pour déterminer la localisation chromosomique approximative du gène morbide et l'intervalle de liaison génétique, on estime la fréquence de recombinaison entre le gène et une série de marqueurs génétiques. Une fois l'intervalle de liaison

généétique défini, l'étape suivante, dite de clonage positionnel, consiste à identifier dans cet intervalle le gène responsable de la maladie par une approche gène candidat (Figure 1).

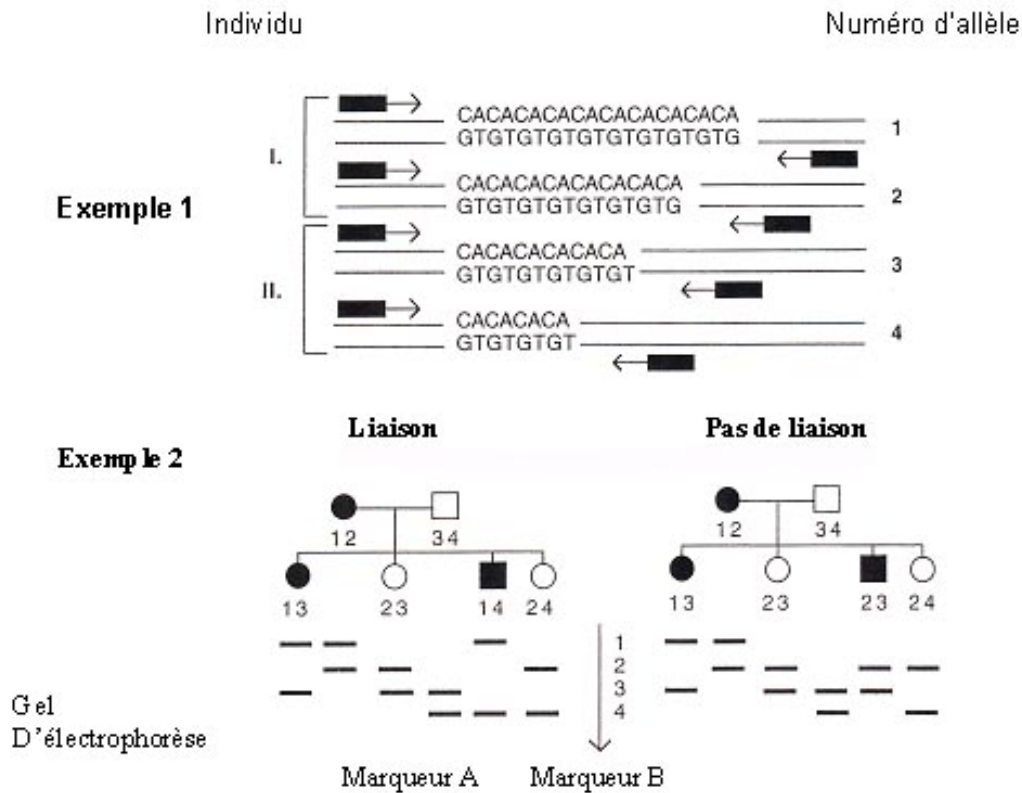


Figure 1 : Analyse de liaison haplotypique.

Exemple 1 : 2 individus I et II, un marqueur dinucléotidique type (CA)_n, 2 allèles différents par individu.

Exemple 2 : Analyse du profil électrophorétique normal

Marqueur A : allèle 1 présent chez tous les individus atteints et eux seuls : probabilité de liaison entre l'allèle 1 et la maladie.

Marqueur B : pas d'allèle commun aux sujets atteints, pas de liaison.

Le succès de ces méthodes de clonage positionnel vient non seulement des progrès des technologies moléculaires mais aussi de la puissance importante de l'analyse de liaison appliquée au phénotype mendélienne, c'est-à-dire ceux qui sont caractérisés par une association simple entre les allèles d'un seul locus et le phénotype étudié.

L'analyse des résultats nécessite néanmoins la prise en compte de certains nombres de

facteurs tels que la variabilité phénotypique et l'hétérogénéité génétique potentielle. Deux indices sont utilisés habituellement pour caractériser la variabilité phénotypique : la pénétrance et l'expressivité. La pénétrance est la probabilité de présenter le phénotype pathologique chez les sujets possédant un génotype délétère. Pour les maladies à déclaration tardive telle que les maladies dégénératives, la pénétrance peut varier en fonction de l'âge et s'accroît avec le vieillissement. Elle peut aussi dépendre d'autres facteurs tels que le sexe ou être soumis à des phénomènes environnementaux. Enfin, la pénétrance sera variable en fonction des critères de diagnostic et des méthodes utilisées pour parvenir à ce diagnostic.

L'expressivité est variable si les sujets atteints ne présentent pas tous le même phénotype. D'autre part, des facteurs à la fois environnementaux et génétiques peuvent être à l'origine de «phénocopies», c'est-à-dire des individus qui présentent le phénotype étudié, bien que celui-ci ne soit pas provoqué par le facteur génétique présumé. Ce risque est d'autant plus élevé que la maladie étudiée est fréquente dans la population générale.

L'unité INSERM U. 533, dans laquelle je travaille, s'est intéressée précocement à l'aspect génétique des maladies cardio-vasculaires. Initialement, l'intérêt portait sur les pathologies rythmiques héréditaires et tout particulièrement le syndrome du QT long congénital pour lequel nous avons pu identifier un des gènes responsables. Ces premiers travaux nous ont permis de structurer notre équipe de recherche en génétique cardio-vasculaire et particulièrement l'équipe de recherche clinique qui est essentielle pour le recrutement des familles permettant ensuite les analyses de génétique moléculaire.

Progressivement, notre activité de recherche s'est orientée vers des pathologies plus fréquentes et affectant des sujets en général plus âgés. Ces travaux se sont intéressés à la génétique des valvulopathies myxoïdes mitrales ainsi qu'à la génétique du bloc auriculo-ventriculaire dégénératif. Nous avons pu ainsi cloner les gènes responsables de ces pathologies mais également montrer que les familles que nous avons identifiées provenaient de régions dans lesquelles la population était très sédentaire et représentait, en fait, des isolats géographiques dans lesquels la fréquence de la pathologie était élevée.

Cela nous a amené à développer l'hypothèse que pour des pathologies dans lesquelles les formes héréditaires n'étaient pas décrites, il devait être possible d'identifier des familles par une approche d'épidémiologie génétique basée sur le fait que les zones de haute fréquence de la

maladie pouvaient être dues à la présence de familles enracinées dans cette région depuis de nombreuses générations.

Nous avons ensuite développé cette approche pour le bloc auriculo-ventriculaire dégénératif et pour le rétrécissement aortique calcifié ce qui nous a permis d'identifier de grandes familles atteintes de ces pathologies.

Au cours de ces différents travaux, nous nous sommes toujours attachés à une caractérisation phénotypique des sujets porteurs de la maladie aussi précise que possible afin de pouvoir mieux comprendre les relations phénotype génotype. Il apparaît en effet clairement que ces relations sont le plus souvent complexes tant en terme d'expressivité de la maladie que de la pénétrance du gène.

De plus, nos travaux portant sur des pathologies dégénératives à début tardif au cours de la vie, l'identification du gène morbide permet de pouvoir prédire précocement les sujets qui seront atteints par la maladie et par conséquent nous permet de décrire les formes très précoces de ces pathologies.

Dans ce travail, je décrirai dans une première partie, nos travaux sur le bloc auriculo-ventriculaire dégénératif pour lequel nous avons identifié le premier gène morbide (*SCN5A*) ainsi que le troisième locus situé sur le chromosome 16. Nous avons montré que les relations génotype phénotype pour le gène *SCN5A* sont particulièrement complexes puisque au sein d'une même famille certains patients porteurs de la mutation sont atteints d'un SB alors que d'autres sont atteints de troubles de la conduction mais n'ont pas l'aspect du syndrome de Brugada (SB).

À côté du travail de recherche de génétique visant à identifier de nouveaux gènes, nous avons également créé un réseau sur l'Ouest de la France pour la prise en charge clinique et génétique des patients atteints d'un SB. Ce réseau nous a permis de constituer un large fichier de patients atteints du SB. Ce fichier permettra de mieux caractériser l'évolution clinique de ces patients afin de tenter d'améliorer leur prise en charge médicale. Ce travail sur le SB nous a permis d'identifier plusieurs familles de grandes tailles. Sur une de ces familles, l'analyse de liaison a permis l'identification d'un nouveau locus situé sur le chromosome 21.

Dans une deuxième partie, je décrirai nos travaux sur la valvulopathie myxoïde mitrale qui nous ont permis d'identifier le premier gène responsable de cette maladie ainsi que l'approche

que nous avons développé sur le rétrécissement aortique calcifié qui nous a permis d'identifier de grandes familles atteintes d'une forme classique de cette maladie.

Tous ces travaux ont été réalisés dans le respect des bonnes pratiques en recherche génétique et ont été approuvés par le comité d'éthique du centre hospitalier universitaire de Nantes. En particulier, un consentement éclairé écrit a été demandé à chaque membre des familles ayant accepté de participer à ces études.

Quelle que soit la pathologie considérée, le but global de l'ensemble de ces travaux était, grâce à une approche de génétique, de parvenir à mieux comprendre la physiopathologie des différentes pathologies étudiées. L'identification d'un nouveau gène ne devant pas être considérée comme un aboutissement mais au contraire comme une première étape permettant une meilleure compréhension de la maladie étudiée qui aura pour but, finalement, d'améliorer la prise en charge des patients tant sur le plan du dépistage de la maladie que de l'identification de nouvelles voies thérapeutiques. Les travaux que je présenterai dans cette thèse qui vont de la caractérisation phénotypique des patients jusqu'à l'étude électrophysiologique des protéines mutées reflètent le travail de toute une équipe composée de généticiens, d'électrophysiologistes et de cliniciens.

PREMIERE PARTIE :

**APPROCHE GÉNÉTIQUE DES TROUBLES DE LA
CONDUCTION ET DU SYNDROME DE BRUGADA.**

I. LES TROUBLES DE LA CONDUCTION DÉGÉNÉRATIFS.

La conduction électrique à l'intérieur du cœur est un phénomène complexe qui fait appel à des cellules spécialisées. Dans ce chapitre, nous allons décrire les bases anatomiques ainsi que les phénomènes physiologiques et physiopathologiques qui interviennent dans la propagation de l'influx électrique à l'intérieur du cœur. Nous montrerons que des formes familiales et héréditaires de troubles de la conduction sont connues de longue date et nous décrirons notre apport pour l'identification du premier gène puis du troisième locus de troubles de la conduction dégénératifs.

I.A. INTRODUCTION.

I.A.1. Rappels anatomiques.

Les éléments du tissu de conduction sont différents du tissu myocardiques par leur caractère histologique. Les cellules qui le composent sont minces et fusiformes et présentent un sarcoplasme abondant. De rares myofibrilles sont rassemblées en une étroite couche périphérique.

Dans l'oreillette droite, deux structures particulières peuvent être distinguées. Le nœud de Keith et Flack appelé également nœud sinusal et le nœud d'Aschoff-Tawara ou nœud auriculo-ventriculaire.

L'origine de l'électricité cardiaque provient normalement du nœud sinusal qui est localisé dans la partie épocardique de la sulcus terminalis à proximité de la jonction de la veine cave supérieure et de l'oreillette droite. Les premières descriptions réalisées par Katz et Pick définissaient le nœud sinusal comme ayant une tête d'environ cinq millimètres de diamètre, un corps et une queue d'environ 2 mm de diamètre (Katz LN P. A. 1956). La tête du nœud sinusal est située dans la partie épocardique de la jonction entre la veine cave supérieure et l'oreillette droite, le corps et la queue, descendent vers le bas, la gauche et le sub-endocarde. C'est au niveau du nœud sinusal que sont situées les principales cellules pacemaker qui se dépolarisent spontanément. Ces cellules sont situées à l'intérieur d'une matrice tissulaire. En fait, il semble que

les zones contenant les principales cellules pacemaker sont petites et ne contiennent que quelques centaines de cellules (Masson-Pevet M B. W., Mackaay A 1978). Ces cellules ont été décrites comme des cellules P en raison de leur apparence pâle en microscopie électronique. En plus de ces cellules, il existe d'autres foyers à l'intérieur du nœud sinusal capables de dépolarisation intrinsèque mais avec un rythme plus lent qui ne s'exprime donc que dans des situations physiologiques ou pathologiques particulières.

Le nœud auriculo-ventriculaire est situé entre l'endocarde de l'oreillette droite au sommet du triangle de Koch qui est formé par le tendon de Torado et le feuillet septal de la valve tricuspide. Le nœud auriculo-ventriculaire est immédiatement situé au-dessus de l'insertion du feuillet septal de la valve tricuspide en avant de l'ostium du sinus coronaire. Deux approches distinctes sont communément utilisées pour décrire l'anatomie du nœud auriculo-ventriculaire. Certains considèrent le nœud auriculo-ventriculaire comme une partie de la jonction auriculo-ventriculaire. Cette région est alors divisée en trois différentes parties : la zone transitionnelle, la portion compacte et la partie pénétrant à l'intérieur de la branche auriculo-ventriculaire (Hecht H. H. et al. 1973). Au niveau de la partie distale, la portion compacte du nœud auriculo-ventriculaire pénètre à l'intérieur du corps fibreux central qui devient ensuite le faisceau de His.

La deuxième approche est plus étroitement corrélée avec l'activité électrophysiologique des différents types cellulaires. Trois différentes régions du nœud auriculo-ventriculaire ont été identifiées en fonction des différentes propriétés de conduction des cellules qui le composent. Ces trois différentes régions sont appelées régions atrio-nodales (AN), nodales (N) et nodal-His (NH) (de Carvalho A. et al. 1960). Ces trois régions correspondent à la zone transitionnelle, à la portion compacte et à la zone pénétrante dans le faisceau de His. Bien que de nombreuses cellules intermédiaires sont retrouvées dans chaque partie, on peut distinguer des types cellulaires présents dans chacune de ces trois différentes zones. La conduction la plus lente (temps de conduction à 0,03 m/s) survient au niveau de la zone N. Dans les régions AN et NH, on retrouve une activité de dépolarisation diastolique ce qui n'est pas le cas au niveau de la région N (Scherlag B. J. et al. 1973).

La vascularisation du nœud auriculo-ventriculaire est dépendante d'une branche de l'artère coronaire droite dans 90 % des cas et dans 10 % d'une branche de l'artère circonflexe.

Comme le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire est richement innervé par des

fibres sympathiques et parasympathiques, mais à l'inverse du nœud sinusal, les zones d'innervation par ses différentes fibres sont bien différenciées (James T. N. 1967). La stimulation par le parasympathique droit a moins d'effet sur le nœud auriculo-ventriculaire que sur le nœud sinusal et inversement la stimulation parasympathique gauche entraîne une plus grande influence sur le nœud auriculo-ventriculaire que sur le nœud sinusal. Des arguments suggèrent que la libération d'acétylcholine est prédominante au niveau des cellules N (Imaizumi S. et al. 1990).

Le faisceau de His est situé entre le noyau fibreux central et le septum membraneux. Il est situé à la base du septum membraneux le long de la partie gauche de la crête du septum interventriculaire. Parfois, il peut-être situé sur la partie droite du septum ce qui modifie la morphologie de la partie proximale des branches. Les cellules de la partie proximale du faisceau de His sont similaires à celles de la partie compacte du nœud auriculo-ventriculaire alors que les cellules distales du tronc du faisceau de His ressemblent aux cellules de la partie proximale des branches du faisceau de His.

L'anatomie de la branche gauche du faisceau de His est sujette à une importante variabilité. Le plus souvent, la branche gauche traverse le septum sous forme d'une large bande en dessous de la sigmoïde aortique non coronaire. Parfois, l'origine de la branche gauche est fine même si elle provient d'un tronc du faisceau de His situé à la partie gauche du septum. En cas de tronc du faisceau de His situé à la partie droite du septum, la branche gauche est généralement fine.

La branche droite du faisceau de His est située en dessous de la partie droite du septum interventriculaire en direction de l'apex du ventricule droit et vers la base du muscle papillaire antérieur.

Le plus souvent, il n'existe pas de véritable division entre une branche antéro-supérieure et une branche postéro-inférieure de la branche gauche du faisceau de His. Lorsqu'une division entre ces deux hémi-branches est présente, il y a de très nombreuses interconnexions entre ces hémi-branches (Massing G. K. et al. 1976). Cependant, malgré la grande variabilité anatomique de la division de la branche gauche, la notion d'hémi-branches antérieure et postérieure reste cliniquement intéressante (Frink R. J. et al. 1973).

Les branches droites et gauches du faisceau de His se transforment ensuite en un réseau formant les fibres de Purkinje qui forment un réseau à la surface de l'endocarde des ventricules.

L'entrelacement très important de ces fibres permet à l'influx électrique d'arriver pratiquement simultanément dans l'ensemble de l'endocarde du ventricule droit et du ventricule gauche. La vitesse de conduction au niveau des fibres de Purkinje est rapide de l'ordre de 2,4 m/s.

I.A.2. Rappel sur la conduction auriculo-ventriculaire.

I.A.2.a. Activité électrique cardiaque.

L'activité électrique du cœur provient du nœud sinusal. Elle traverse les oreillettes (onde P), est freinée au niveau du nœud auriculo-ventriculaire (espace PR), puis conduite aux ventricules par les voies de conduction, faisceau de His et fibres de Purkinje (QRS). Survient ensuite la repolarisation cardiaque responsable de l'onde T. Parfois, on peut observer une onde faisant suite à l'onde T, cette onde est qualifiée d'onde U. Sa physiologie reste discutée (cellules M ?).

La dépolarisation cardiaque se produit de l'endocarde vers l'épicarde et de la base vers la pointe, tandis que la repolarisation a lieu de l'épicarde vers l'endocarde et de la pointe vers la base.

I.A.2.b. Conduction dans le nœud sinusal.

La conduction à l'intérieur du nœud sinusal est lente de l'ordre de 2 à 5 cm par seconde ce qui augmente le risque de bloc intra-nodal (Strauss H. C. et al. 1977). De plus, l'innervation du nœud sinusal est complexe. Le système sympathique et parasympathique influencent la fréquence de dépolarisation spontanée des cellules pacemaker et peuvent être responsables d'un remplacement du rythme sinusal spontané normal par une dépolarisation provenant des cellules pacemaker sinusales secondaires. L'acétylcholine sécrétée par le système parasympathique diminue la fréquence de dépolarisation et augmente la période réfractaire (Prystowsky E. N. et al. 1979). Par conséquent, une augmentation de l'activité parasympathique peut entraîner une bradycardie sinusale, un bloc sinusal ou un bloc de sortie. À l'inverse, les médiateurs sympathiques tels que la norépinéphrine peuvent augmenter la fréquence sinusale.

I.A.2.c. Conduction dans le nœud auriculo-ventriculaire.

Dans cette structure, la conduction est très lente (0.1m/s) car les cellules qui la constituent sont sous la dépendance des canaux calciques. Elles se caractérisent par une faible vitesse de dépolarisation et de conduction et par une période réfractaire supérieure au temps de repolarisation. La région centro-nodale dénommée zone N est le siège d'une conduction particulière de type décrementielle. Enfin, au niveau du nœud auriculo-ventriculaire, la conduction est très influencée par le tonus sympathique ce qui explique certain BAV du premier degré du sujet jeune.

I.A.2.d. Conduction dans le système de His-Purkinje.

Dans le système de His-Purkinje, la conduction est beaucoup plus rapide de l'ordre de 2m/s. Elle dépend majoritairement des canaux sodiques. À ce niveau, la conduction n'est pas décrementielle, mais répond à la loi du tout ou rien. Cependant, lorsque les fibres sont lésées, elles acquièrent les propriétés des fibres lentes en devenant dépendantes des canaux calciques. Dans le système de His-Purkinje, la conduction n'est pas influencée par le tonus sympathique.

I.A.2.e. Degré du bloc.

Les blocs auriculo-ventriculaires peuvent être de trois niveaux différents dont la gravité va croissant :

- Le bloc du premier degré (BAV I) : Toutes les impulsions atriales sont conduites aux ventricules mais avec retard, la durée de la conduction auriculo-ventriculaire, mesurée par l'espace PR, est supérieure à 210 ms.

- Les blocs du deuxième degré : Un ou plusieurs, mais pas la totalité, des influx auriculaires qui devraient être conduits ne réussissent pas à atteindre les ventricules. Les BAV du deuxième degré sont divisés en deux groupes. Les BAV de type Mobitz I où la durée de l'espace PR s'allonge progressivement jusqu'à un blocage de l'onde P. Cet allongement progressif de l'espace PR est appelé période de Luciani-Wenckebach. Les BAV de type Mobitz II où certaines onde P ne sont pas conduites aux ventricules mais sans allongement préalable de

l'espace PR. Un BAV du deuxième degré de type I est en faveur d'une atteinte siégeant dans le nœud auriculo-ventriculaire alors qu'un BAV de type II est en faveur d'une atteinte infra-nodale, le plus souvent au niveau des branches ou du tronc du faisceau de His.

- Les blocs du troisième degré où aucun des influx ne parviennent aux ventricules.

I.A.2.f. Sièges du bloc.

On définit la localisation du bloc par rapport au faisceau de His.

Les blocs suprahissiens se situent en amont du tronc commun et sont en général dus à une atteinte du NAV (Narula O. et al. 1971).

Les blocs intrahissiens ou tronculaires correspondent à des lésions très localisées sur le faisceau de His.

Les blocs infrahissiens relèvent d'une atteinte bilatérale des voies de conduction intra-ventriculaires.

On considère habituellement que le bloc est d'autant plus grave qu'il est bas situé.

I.A.3. Incidence des troubles de la conduction dégénératifs.

Les troubles de la conduction auriculo-ventriculaire dégénératifs sont très fréquents dans la population générale. Dans leur forme majeure, ils sont responsables de bloc auriculo-ventriculaires complets nécessitant l'implantation d'un stimulateur cardiaque dans le but d'éviter les syncopes et la mort subite. Aucune donnée épidémiologique précise n'est disponible mais on peut considérer que la fréquence des implantations de stimulateurs pour troubles de conduction dégénératifs est d'environ 0,3 pour 1000 habitants par an ce qui situe l'importance de cette pathologie en terme de santé publique.

I.A.4. Étiologies des troubles de la conduction.

De nombreuses étiologies sont connues pour entraîner des troubles de la conduction. La cause la plus fréquemment retrouvée est une dégénérescence progressive et idiopathique des voies de conduction comme décrit initialement par Lenègre (Lenègre J. 1964) et Lev (Lev M. 1964). Cette étiologie représente selon les études de 33 % (Davies M. J. 1976) à 69 % des BAV

chroniques (Wright J. C. et al. 1956). Dans la série de Davies, qui portait sur 177 patients, l'ischémie myocardique est responsable de 17% des BAV chroniques et les calcifications dues aux valvulopathies aortiques ou mitrales d'environ 10 %. Les cardiopathies diverses sont retrouvées dans 14 % des cas. Enfin, on retrouve quelques causes rares comme les tumeurs cardiaques, les cardiopathies congénitales, les maladies du collagène et les atteintes traumatiques ou chirurgicales.

Il faut cependant noter qu'il s'agit d'études anciennes. On peut penser qu'actuellement, la fréquence des étiologies ischémiques, que l'on retrouve essentiellement en cas d'infarctus antérieur massif, a nettement diminué depuis l'utilisation intensive des moyens de reperfusion à la phase aiguë de l'infarctus. Il est également probable que l'augmentation du nombre de patients bénéficiant d'une chirurgie cardiaque, rend les BAV post opératoires plus fréquents. Enfin, le vieillissement de la population est très certainement à l'origine d'une augmentation des BAV dégénératifs qui touchent préférentiellement les personnes âgées.

I.A.5. Les troubles de la conduction, une maladie génétique...

Jusqu'à récemment, les troubles de la conduction intracardiaque qui évoluent sur plusieurs années, aussi appelés dégénératifs, étaient considérés comme une maladie d'étiologie indéterminée mais vraisemblablement liée au vieillissement. La forme de très loin la plus fréquente est la maladie de Lenègre ou de Lev qui est responsable d'environ 40 % des cas de BAV chroniques. Le caractère héréditaire de cette pathologie dont l'expression est tardive, a cependant été supposé après l'identification par plusieurs équipes, de formes familiales de troubles de conduction (Greenspahn B. R. et al. 1976; Morgans C. M. et al. 1974).

La plus ancienne description de troubles de la conduction familiale remonte au début du siècle lorsque Morquio puis Osler décrivent une forme familiale et infantile de syncope et de mort subite associée à un ralentissement du pouls (Morquio L. 1901; Osler W. 1903). En 1910, Fulton relate la survenue d'un bloc cardiaque chez deux enfants d'un père atteint dont un des enfants au cours de l'enfance (Fulton Z. et al. 1910). En 1956, DeForest rapporte le cas d'une famille dans laquelle quatre personnes sur deux générations présentent un bloc de branche gauche (DeForest R. E. 1956). En 1962 puis en 1980, Combrink décrit une famille Sud Africaine dans laquelle la mère qui était porteuse d'un bloc de branche droit est décédée au cours d'un accident

de type Adams-Stockes (Combrink J. M. D., W. H.; Snyman, H. W. 1962; Steenkamp W. F. et al. 1980). Parmi ces quatre enfants, trois étaient porteur d'un bloc de branche droit. Dans la famille décrite par Gazes en 1965, des BAV du second et du troisième degré entraînant des syncopes de type Adams-Stockes surviennent dans quatre générations successives (Gazes P. et al. 1965). En 1972, Sarachek et Leonard ont réalisé une revue de la littérature sur les cas familiaux de troubles de la conduction (Sarachek N. S. et al. 1972). Parmi les 19 cas familiaux de bradycardie, 10 familles avaient un bloc auriculo-ventriculaire, 6 avaient un bloc auriculo-ventriculaire associé à une bradycardie sinusale et 3 avaient une bradycardie sinusale isolée. La même année, Steenkamp décrit une famille Sud Africaine chez laquelle 6 des 17 membres étudiés ont associé un trouble de conduction à type de bloc trifasciculaire et des troubles du rythme (Steenkamp W. F. 1972). En 1973, Schaal a décrit une grande famille dans laquelle le propositus, une femme âgée de 69 ans, avait initialement un bloc de branche droit associé à une déviation axiale gauche qui a secondairement évolué vers un bloc auriculo-ventriculaire complet (Schaal S. F. et al. 1973). Parmi les membres de cette famille, 6 avaient un bloc auriculo-ventriculaire et 26 avaient une anomalie à l'ECG. La même année, Lynch décrivait une grande famille où survenait un défaut de conduction auriculo-ventriculaire progressif (Lynch H. T. et al. 1975; Lynch H. T. et al. 1973). L'allongement du PR commençait vers 30 ans et s'associait généralement à la disparition des ondes R dans les dérivations précordiales droites. L'aggravation des troubles de la conduction depuis le BAV du premier degré jusqu'au BAV du troisième degré se produisait généralement sur une longue période mais pouvait être très rapide dans de rares cas. Enfin toujours en 1973, Husson décrit une famille chez laquelle une fille avait un BAV complet à l'âge de 2 ans et qui est décédée d'une fibrillation ventriculaire à 10 ans (Husson G. S. et al. 1973). Son frère avait un bloc de branche droit à 15 ans et un BAV complet à 17 ans, sa sœur avait un bloc de branche droit incomplet à 17 ans. En France, Fauchier en 1979 décrit une famille dans laquelle 4 frères ayant une différence d'âge maximale de 20 ans ont l'association d'un bloc sino-auriculaire, d'un bloc auriculo-ventriculaire de type nodal et de fibrillation auriculaire paroxystique (Fauchier J. P. et al. 1979a; Fauchier J. P. et al. 1979b). L'auteur qualifie ce trouble de bloc binodal idiopathique et familial. Godin J.F. et coll. avaient répertorié dans la littérature en 1973, 21 sujets atteints de BAV dégénératifs, issus de dix familles différentes (Godin J. F. et al. 1973). Chez ces patients, l'apparition du BAV complet était précédée de troubles de conduction de degré moindre. Ils avaient habituellement initialement des BAV du premier degré qui progressaient vers le

deuxième degré et on retrouvait fréquemment des blocs de branche droits qui évoluaient vers des blocs bifasciculaires (Godin J. F. et al. 1973). En 1988, Lorber rapporte le cas d'un père et de ses deux garçons ayant un aspect électrocardiographique de bloc de branche droit associé à un pseudo hémibloc postérieur gauche (Lorber A. et al. 1988).

À partir de plusieurs familles d'Afrique du Sud et du Liban, il a identifié un premier locus sur le chromosome 19 (19q13.2 q13.3) lié à des troubles de la conduction à type de bloc de branche droit et parfois de blocs complets (Brink A. J. et al. 1977; Brink P. A. et al. 1995; de Meeus A. et al. 1995; Stephan E. et al. 1998; Stephan E. et al. 1997). Bien que ces troubles de conduction semblent être progressifs dans le temps, il s'agit cependant d'une forme assez particulière n'ayant pas les caractéristiques habituelles de la maladie de Lenègre (Torrington M. et al. 1986; van der Merwe P. L. et al. 1991; van der Merwe P. L. et al. 1986; Van der Merwe P. L. et al. 1988). L'étude de ces familles a même permis à Brink de distinguer deux types de troubles de la conduction (Brink A. J. and Torrington M. 1977). Le type I, caractérisé par un bloc de branche droit et/ou un hémibloc antérieur gauche associé à un élargissement des QRS pouvant évoluer jusqu'au BAV complet. Le type II est caractérisé par une bradycardie sinusale associée à un hémibloc postérieur gauche pouvant également entraîner des syncopes de type Adams-Stockes et des morts subites.

A coté des formes isolées de troubles de la conduction, il existe également de nombreuses formes associées à une cardiopathie.

Trois formes de myocardiopathies dilatées associées à des troubles de la conduction ont été décrites. Un premier locus situé sur le chromosome 1p1-q1 a été identifié. Cette forme de cardiomyopathie dilatée s'associe à des blocs auriculo-ventriculaires progressifs du premier ou deuxième degré évoluant vers le bloc complet, des bradycardies sinusales et des troubles rythmiques auriculaires mais les QRS sont normaux (Amat-y-Leon F. et al. 1974; Graber H. L. et al. 1986; Kass S. et al. 1994). Récemment, il a été montré que le gène responsable de cette forme de cardiomyopathie dilatée est le gène qui code pour la lamine A/C qui avait déjà été impliquée dans la dystrophie musculaire d'Eymery-Dreyfus (Bonne G. et al. 1999; Fatkin D. et al. 1999). Les laminines sont des polypeptides constitutifs de la lamina nucléaire des cellules. Elles contribuent à l'intégrité structurale de l'enveloppe nucléaire des cellules. Elles forment des dimères dans leur domaine central, et l'interaction avec la chromatine et les protéines de membrane s'effectue par des sites de liaison situés dans ce domaine et dans la partie globulaire

carboxy-terminale. Dans les cellules en division, elles jouent un rôle majeur dans l'organisation de la chromatine interphasique et le réassemblage de la membrane nucléaire durant la mitose. Dans les cellules quiescentes, elles participent à la transduction du signal entre le cytoplasme et le noyau. Certaines mutations pourraient être à l'origine de mécanismes d'apoptose et d'autres par les modifications induites dans les interactions avec les protéines du cytosquelette pourraient modifier l'ancrage des canaux ioniques à la membrane (Fatkin D. et al. 1999).

Un deuxième locus localisé en 3p22-p25 associant cardiomyopathie dilatée et bloc auriculo-ventriculaire a également été identifié. Dans cette forme, la maladie débutait habituellement lors de l'adolescence par une dysfonction sinusale ou des troubles rythmiques auriculaires avec une apparition plus tardive des troubles de la conduction de type bloc auriculo-ventriculaire du premier degré et bloc de branche droit. La dilatation auriculaire et ventriculaire n'apparaissait qu'à un stade avancé de la maladie (Olson T. M. et al. 1996).

Un troisième locus de cardiomyopathie dilatée associée à des troubles de la conduction a été identifié sur le chromosome 6q23 (Messina D. N. et al. 1997). Dans ces deux dernières formes aucun gène n'a été retrouvé.

Une forme particulière de cardiopathie restrictive familiale due à une accumulation de desmine dans les myocytes associée à des troubles de la conduction a également été identifiée (Arbustini E. et al. 1998). Enfin, quelques familles associant une cardiomyopathie hypertrophique et des troubles de la conduction ont également été décrites (Albanesi Filho F. M. et al. 1992; Thongtang V. et al. 1991).

Des troubles de conduction peuvent également être retrouvés dans les formes familiales de communication inter-auriculaire liées à des mutations dans le gène NKX2.5 (Ikeda Y. et al. 2002; Schott J. J. et al. 1998). D'autres mutations de NKX2.5 ont également été impliquées dans l'association d'anomalies du retour veineux cardiaque et de troubles de la conduction progressifs (Gutierrez-Roelens I. et al. 2002). Par ailleurs, des anomalies de la conduction sont également fréquentes dans différentes pathologies neuromusculaires comme la maladie de Steinert, la myopathie de Becker ou le syndrome d'Eymery-Dreyfus (Graber H. L. et al. 1986; Kanada M. et al. 2002; Ohkubo R. et al. 1999).

L'ensemble de ces données montre que les troubles de conduction peuvent avoir un substrat génétique. Cette hypothèse est renforcée par le fait que dans les familles où un cas index de BAV dégénératif est retrouvé la fréquence des BAV est augmenté dans le reste de la famille

(Morgans C. M. et al. 1974). Greenspahn en 1976 a évalué la fréquence des troubles de la conduction auriculo-ventriculaire chez les membres de la famille de patients examinés pour un bloc bifasciculaire (Greenspahn B. R. et al. 1976). Il a pu ainsi examiner 95 membres de la famille de 44 patients qu'il a comparé à 95 sujets appariés pour l'âge et le sexe recrutés parmi le " Adult screening Project of the Chicago Heart Association ". Dans le groupe des sujets de l'étude, 24 personnes avaient des troubles de la conduction alors qu'ils n'étaient que 10 dans le groupe témoin ($p=0,02$). Trente neuf personnes appartenant aux familles de troubles de la conduction n'avaient pas pu être appariées car elles avaient moins de 18 ans ou plus de 65 ans. Les 32 patients de moins de 18 ans avaient une fréquence de troubles de la conduction auriculo-ventriculaire identique à la fréquence de cette pathologie décrite dans la population pour cet âge. En revanche, chez les patients de plus de 65 ans, les troubles de la conduction auriculo-ventriculaire apparaissent très fréquents puisqu'ils sont retrouvés chez 5 des 7 patients examinés.

Sur le plan anatomopathologique, il existe une bonne corrélation entre les lésions identifiées sur les voies de la conduction et les aspects électrocardiographiques (Lenegre J. 1964). Dans les troubles de conduction de type I et la maladie de Lenègre, les études anatomopathologiques ont montré la présence de lésions à type de fibrose dans les voies de conduction hissiennes, en particulier au niveau du tronc du faisceau de His ainsi que dans les portions proximales des branches droites et gauches (Kennel A. J. et al. 1981; Stephan E. et al. 1985). En revanche, les nœuds sinusaux et auriculo-ventriculaires étaient indemnes de lésions. Il faut cependant remarquer que d'autres études retrouvaient une quantité de fibrose identique dans les voies de conduction que les patients soient atteints de troubles de la conduction ou ne le soient pas (Davies M. J. 1967). Dans les troubles de la conduction de type II, le tronc commun et les branches du faisceau de His seraient normaux alors que l'atteinte prédominerait dans le nœud auriculo-ventriculaire. Des études ont montré la présence de fibrose dans la partie postérieure du nœud auriculo-ventriculaire l'isolant du myocarde auriculaire alors que d'autres études retrouvaient un remplacement fibro-adipeux du nœud auriculo-ventriculaire avec une couche grasseuse isolant ce nœud du myocarde auriculaire (Lenegre J. et al. 1970). Dans les formes associées à une dysfonction sinusale, les transformations grasseuses pourraient s'étendre au nœud sinusal (Waxman M. B. et al. 1975).

I.A.6. Caractéristiques électrocardiographiques et cliniques.

Les blocs de la branche droite du faisceau de His sont le type de troubles de la conduction le plus fréquemment rencontré dans ces formes familiales et isolées. Ils peuvent être isolés ou associés à d'autres types de bloc tels que les blocs auriculo-ventriculaires ou les hémibloc antérieur ou postérieur.

En fonction de la localisation des troubles de conduction, trois principaux types de troubles de la conduction progressifs sont décrits.

Un premier type de troubles de la conduction, appelé PFHB (Progressive Familial Heart Block) de type I, est caractérisé par une atteinte sélective des branches du faisceau de His. Les troubles de la conduction sont principalement des blocs de branche droits parfois associés à des hémibloc antérieur gauche. Il n'y a pas d'anomalie de la durée du PR. Ces anomalies évoluent progressivement vers un bloc complet. Dans cette forme, on ne retrouve pas de bloc de branche gauche (Combrink J. M. D., W. H.; Snyman, H. W. 1962; Schaal S. F. et al. 1973; Simonsen E. E. et al. 1970; Stephan E. 1978; Stephan E. et al. 1985; Stephan E. et al. 1997).

Le second type de troubles de la conduction progressifs, appelé PFHB II, est caractérisé par une atteinte sélective du tissu de conduction au-dessus de la bifurcation du tronc commun du faisceau de His. Les troubles de conduction sont donc des blocs auriculo-ventriculaires de différents degrés qui peuvent évoluer vers un bloc complet. La durée de l'intervalle QRS est normal alors que le PR est allongé. Une bradycardie sinusale est fréquemment présente. Les troubles de la conduction peuvent être intermittents ou parfois même régressifs avec dans quelques cas une normalisation de la conduction (Lenegre J. and Gay J. 1970; Lynch H. T. et al. 1975; Lynch H. T. et al. 1973).

Un troisième type de troubles de la conduction familial progressif serait caractérisé par une atteinte de l'ensemble du tissu de conduction. Dans ces formes, tous les types de troubles de la conduction peuvent être retrouvés, quel que soit l'étage. On retrouve des blocs sinusaux, des blocs auriculo-ventriculaires mais également des blocs de branche. Le PR, le QRS et la durée de l'onde P peuvent être allongés (Gazes P. et al. 1965; Kennel A. J. et al. 1981; Sarachek N. S. and Leonard J. L. 1972). Il y a généralement une altération progressive de la conduction dans le système de His-Purkinje mais également dans le nœud sinusal et le nœud auriculo-ventriculaire. Ces formes peuvent évoluer vers un BAV complet et entraînent donc un risque de syncope et de

mort subite.

Parmi ces formes, la maladie de Lenègre serait caractérisée par une dégénérescence fibreuse diffuse des voies de conduction alors que la maladie de Lev ne toucherait que les parties proximales des branches du faisceau de His (Lenegre J. et al. 1963; Lev M. 1964; Lev M. et al. 1970; Stephan E. et al. 1985).

Les signes cliniques que l'on peut rencontrer dans cette pathologie sont liés à un ralentissement de la fréquence cardiaque. En fonction de la fréquence d'échappement ventriculaire et de la rapidité d'installation de la bradycardie, les symptômes peuvent varier du simple essoufflement à l'effort jusqu'à la syncope sévère pouvant conduire à la mort subite.

Quel que soit le type de troubles de la conduction, le seul traitement actuellement efficace est la mise en place d'une stimulation cardiaque à l'aide d'un pacemaker permettant d'accélérer le cœur en cas de bradycardie importante.

I.A.7. Explorations électrophysiologiques invasives.

Par l'introduction d'une sonde à l'intérieur des cavités cardiaques il est possible d'enregistrer l'activité électrique du faisceau de His. L'électrode est introduite dans le ventricule droit puis appliquée sur le faisceau de His. On peut ainsi enregistrer trois dépolarisations différentes. L'onde A qui correspond à la dépolarisation des oreillettes, l'onde H qui correspond à la dépolarisation du faisceau de His et l'onde V qui correspond à la dépolarisation du ventricule. On peut ainsi mesurer la durée des intervalles AH et HV ce qui permet d'évaluer le site où se situe l'anomalie de conduction. Un allongement de l'intervalle AH correspond à une atteinte de la conduction supra-hissienne alors qu'un allongement de l'intervalle HV correspond à une atteinte de la conduction infra-hissienne. Si le potentiel H est fractionné ou allongé, l'anomalie de la conduction porte sur le faisceau de His.

Dans les troubles de conduction progressifs de type I seul l'intervalle HV est allongé, dans les troubles de la conduction de type II seul l'intervalle AH est allongé et dans la maladie de Lenègre les intervalles AH et HV peuvent être touchés.

I.A.8. Étude anatomopathologique et histologique.

Il existerait une très bonne corrélation entre les aspects électriques et les lésions des voies de la conduction intracardiaque retrouvées à l'examen histologique.

Dans les troubles de la conduction progressifs de type I et la maladie de Lenègre, des études histologiques post-mortem ont montré que l'interruption de la conduction était principalement due à la présence d'une dégénérescence fibreuse progressive des voies hissiennes touchant le tronc commun et les portions proximales et distales des branches du faisceau de His. Les nœuds sinusaux et auriculo-ventriculaires étaient normaux et ne présentaient pas de fibrose.

Dans les troubles de la conduction de type II, le tronc commun et les branches du faisceau de His seraient normaux, en revanche, le nœud auriculo-ventriculaire serait pathologique. On peut retrouver une travée fibreuse continue sur la moitié postérieure du nœud auriculo-ventriculaire qui l'isole presque totalement du myocarde auriculaire commun. Dans d'autres cas, on retrouve une destruction presque complète du nœud auriculo-ventriculaire qui est remplacé par une formation fibro-adipeuse et séparé du myocarde auriculaire par une nappe de tissu graisseux parcouru de travées fibreuses. Cet obstacle pré-nodal ou nodal à la conduction auriculo-ventriculaire expliquerait le bloc auriculo-ventriculaire à QRS normal. Ces transformations fibreuses pourraient s'étendre au nœud sinusal dans les formes associées à une dysfonction sinusale.

I.A.9. Hypothèses physiopathologiques.

La conduction de l'influx électrique dans le cœur étant un phénomène complexe, de nombreuses causes peuvent être impliquées dans la survenue de troubles de la conduction. Bien que l'approche que nous avons employée pour nos travaux soit de type génétique inverse et donc s'affranchisse des hypothèses physiopathologiques, il est important de connaître les différents mécanismes impliqués pour la conduction de l'influx électrique.

Schématiquement, ces causes peuvent être regroupées ainsi :

- Réduction de l'excitabilité
- Diminution du couplage des jonctions communicantes
- Anomalie de développement du système de conduction cardiaque

→ Changements de l'architecture cellulaire du tissu cardiaque (Antzelevitch C. et al. 1991; Cabo C. et al. 1994; Kucera J. P. et al. 1998; Rohr S. et al. 1998; Shaw R. M. et al. 1997)

I.A.9.a. Anomalies des canaux ioniques et des connexines cardiaques.

La vitesse de propagation de l'influx électrique dans le cœur est dépendante de la pente de dépolarisation du potentiel d'action mais également des connexions inter-cellulaires. Des anomalies des canaux sodiques, calciques et des connexines cardiaques pourraient donc être à l'origine de ces troubles de la conduction.

I.A.9.b. Anomalie de développement du système de conduction cardiaque.

Les cellules du système de conduction cardiaque dériveraient de précurseurs myogéniques du tube cardiaque (Cheng G. et al. 1999). Chacune de ces cellules présente des groupes différents de gènes qui leur confèrent un phénotype électrophysiologique spécifique. Par exemple, la connexine 40 serait localisée de façon préférentielle dans les cellules myocardiques du système de conduction, alors que la connexine 43 serait exprimée préférentiellement dans le myocarde ventriculaire. Ces deux connexines seraient co-exprimées dans certaines fibres du réseau de Purkinje distal (Gourdie R. G. et al. 1993). Un modèle de souris invalidé pour la connexine 40 ou 43 exprime des troubles de la conduction. {Lo, 2000 #92} {Guerrero, 1997 #1382} {Hagendorff, 1999 #1054} {Kirchhoff, 2000 #80}

Les mécanismes impliqués dans cette transition sont mal connus mais le développement cardiaque est un processus très complexe qui progresse sous un contrôle transcriptionnel strict. Ainsi, le facteur de transcription Csx/Nkx2.5 serait impliqué dans cette transition phénotypique, il serait l'un des facteurs de transcription les plus précoces du mésoderme cardiaque et jouerait un rôle essentiel dans la différenciation cellulaire (Kasahara H. et al. 2000). Des dizaines de mutations ont été trouvées dans ce gène chez des patients atteints de cardiopathie congénitale. Les caractères phénotypiques les plus fréquents de ces cardiopathies, transmises selon un mode autosomique dominant, sont des blocs auriculo-ventriculaires progressifs et des communications

interauriculaires de type ostium secundum. Il existe parfois d'autres malformations cardiaques, telles qu'une communication interventriculaire, une tétralogie de Fallot et des malformations des valves tricuspides. Ce facteur de transcription interviendrait donc dans la septation auriculaire, ventriculaire et cono-troncale, dans la formation des valves auriculo-ventriculaires et dans la formation du système de conduction (Schott J. J. et al. 1998). Certaines mutations seraient responsables d'un BAV progressif isolé de 2^e ou 3^e degré, sans malformations apparentes: il s'agirait de mutations altérant la liaison à l'ADN mais préservant la capacité d'homodimérisation de Csx/Nkx2.5 (Benson D. W. et al. 1999; Kasahara H. et al. 2000). La mutation ponctuelle I183P dans la troisième hélice du domaine de liaison à l'ADN abolit complètement cette liaison tout en conservant les propriétés d'homodimérisation du facteur de transcription (Kasahara H. et al. 2001a; Kasahara H. et al. 2001b). La souris transgénique exprimant l'allèle muté I183P du gène Csx/Nkx2.5 sous contrôle du promoteur de la chaîne lourde de la myosine présente des troubles de conduction auriculo-ventriculaire progressifs touchant tous les étages de la conduction associée à une insuffisance cardiaque sans anomalies anatomiques. La plupart des souris mutantes semblent normales à la naissance, mais meurent entre 3 et 6 mois d'insuffisance cardiaque progressive due à une dilatation des cavités cardiaques et à une altération de la fonction systolique du ventricule gauche. L'étude des connexines 40 et 43 a montré que leur expression diminuait progressivement à partir de la naissance jusqu'à l'âge de trois semaines ce qui était probablement responsable d'une anomalie de formation des jonctions communicantes (Kasahara H. et al. 2001a; Kasahara H. et al. 2001b).

Il existerait des sites de liaison consensus pour le facteur de transcription Nkx2.5 dans les régions promotrices des connexines cardiaques et ces gènes pourraient être des cibles directes ou indirectes de ce facteur de transcription (Chen C. Y. et al. 1995; Seul K. H. et al. 1997).

Un modèle de souris invalidé pour le gène HF-1b a été développé. Les souris homozygotes présentent un phénotype cardiaque de troubles de conduction et de mort subite par arythmies ventriculaires (Nguyen-Tran V. T. et al. 2000). Elles n'ont pas d'anomalie structurale cardiaque mais meurent subitement par asystolie faisant suite à des épisodes de tachycardie ventriculaires monomorphes. Ces troubles du rythme peuvent être déclenchés lors d'une stimulation ventriculaire programmée et les ECG montrent un allongement du PR ainsi qu'une bradycardie. Lors de l'enregistrement continu de l'activité électrique, il est possible d'enregistrer des pauses sinusales ainsi que des passages en BAV complet.

L'analyse de cellules ventriculaires isolées du cœur par la technique de patch-clamp, a révélé des anomalies de la repolarisation ventriculaire: les potentiels d'action sont allongés et il existe une forte dispersion de leur durée. De plus, au niveau des myocytes du ventricule gauche, la durée des potentiels d'action des cellules de l'endocarde est significativement plus allongée par rapport aux cellules de l'épicarde, ce qui reflète une hétérogénéité transmurale de la repolarisation. Chez la souris, la durée du potentiel d'action serait contrôlée en grande partie par un courant potassique transitoire sortant indépendant du Calcium, et un courant rectifiant retardé s'activant rapidement et s'inactivant lentement, appelé ($I_{K,slow}$) (Xu H. et al. 1999a; Xu H. et al. 1999b). Chez les souris mutantes, seul ce courant rectifiant retardé serait diminué, sans changement significatif du courant potassique sortant transitoire ni de celui qui contrôle le potentiel de membrane (I_{K1}). Cette diminution sélective du courant ($I_{K,slow}$) serait responsable de l'allongement et de la dispersion de la durée des potentiels d'action.

Au cours du développement HF-1b est exprimé dans les mêmes régions que la connexine 40 (Delorme B. et al. 1995; Gourdie R. G. et al. 1993; Moorman A. F. et al. 1998; Simon A. M. et al. 1998). Chez les souris invalidées pour HF-1b, la distribution régionale de l'expression de la connexine 40 ne serait pas modifiée, mais le nombre de cellules exprimant la connexine 40, en particulier celles du réseau de Purkinje distal, serait diminué. Cette connexine présenterait des anomalies de distribution intracellulaire. Chez les souris mutantes, l'adressage intra-cellulaire des connexines est altéré et leur nombre est plus faible à la surface des cellules. L'expression de minK chez les souris nouveau-nés mutantes serait intense et désorganisée dans le septum interventriculaire reflétant une anomalie de développement du système de conduction. Normalement, chez les souris adultes l'expression de minK diminue alors que chez les souris mutantes cette expression se maintient à des niveaux élevés dans toute la paroi du ventricule à l'exception du septum ventriculaire.

Le facteur de transcription HF-1b jouerait donc un rôle essentiel dans la transition phénotypique qui conduit aux myocytes ventriculaires ou aux cellules du système de conduction, en intervenant notamment dans la mise en place des canaux ioniques et des connexines. L'absence de ce facteur provoquerait une sorte de "confusion" de phénotype entre ces deux lignées, responsables d'un allongement et d'une hétérogénéité de la durée du potentiel d'action et d'arythmies ventriculaires.

Nakamura K. et coll. ont réalisé un modèle de souris transgénique sur exprimant la calreticuline cardiaque sous contrôle du promoteur de β -MHC (Nakamura K. et al. 2001). Les souris surexprimant la calreticuline semblent normales à la naissance, mais meurent de mort subite inexplicée dans les cinq premières semaines de vie. Les enregistrements électrocardiographiques montrent une dysfonction sinusale (bradycardie, pauses sinusales) et des blocs auriculo-ventriculaires s'aggravant avec l'âge. A l'âge de 20 jours, le BAV est complet et les souris décèdent de mort subite.

L'analyse morphologique des cœurs de souris transgéniques montre qu'après deux semaines, apparaît une dilatation des oreillettes et des ventricules et des signes de dégénérescence cellulaire. L'expression des connexines 40 et 43 était fortement diminuée.

Les mécanismes responsables de la diminution d'expression des connexines 40 et 43 et de la diminution du courant calcique en réponse à une surexpression de calreticuline ne sont pas connus. Les auteurs suggéraient que la calreticuline puisse jouer un rôle dans l'adressage des connexines vers les jonctions communicantes ou dans leur assemblage (Nakamura K. et al. 2001).

I.A.9.c. Changements de l'architecture cellulaire du tissu cardiaque.

Trois formes de cardiomyopathies dilatées héréditaires associées à des troubles de conduction ont été décrites (Bonne G. et al. 1999; Kass S. et al. 1994; Messina D. N. et al. 1997; Olson T. M. and Keating M. T. 1996).

Les cardiomyopathies dilatées (CMD) sont caractérisées par une dilation des cavités ventriculaires associée à une altération de la fonction contractile du myocarde pouvant conduire à une insuffisance cardiaque et à la mort subite par arythmies ventriculaires. Les formes familiales de cardiomyopathies dilatées résulteraient d'altérations de gènes codant des protéines de structure cytosquelettiques ou sarcomériques, telles que l'actine, la dystrophine, la desmine et la métavinculine, entraînant des anomalies dans la transmission de la force contractile (Dalakas M. C. et al. 2000; Maeda M. et al. 1997; Muntoni F. et al. 1993; Olson T. M. et al. 1998; Ortiz-Lopez R. et al. 1997). Ces défauts seraient à l'origine de lésions cellulaires conduisant à l'installation progressive d'une fibrose interstitielle et d'une dilation des ventricules.

A côté des formes isolées, certaines formes de cardiomyopathies sont associées à des troubles de conduction.

Un premier locus a été identifié sur le chromosome 1p1-q1 (Kass S. et al. 1994). La CMD était associée à des blocs auriculo-ventriculaires progressifs de type BAV de 1^{er} et 2^e degré évoluant vers un bloc complet, avec un allongement de l'intervalle PR, une bradycardie sinusale, des tachyarythmies (flutter et fibrillation) auriculaires et des complexes QRS normaux. Les troubles de conduction, la bradycardie sinusale et les arythmies auriculaires étaient les manifestations initiales de la maladie se développant progressivement entre 20 et 40 ans, alors que la dilatation des cavités ventriculaires et l'insuffisance cardiaque étaient des manifestations secondaires tardives se développant progressivement à partir de 40 ans. A l'autopsie, les oreillettes et les ventricules étaient dilatés de façon importante, avec une fibrose interstitielle et des signes de dégénérescence myocytaire. L'examen histologique du système de conduction montrait que des cellules des nœuds sinusaux et auriculo-ventriculaires étaient remplacées par du tissu fibreux et lipidique. Des études électrophysiologiques réalisées sur des cellules de l'endocarde auriculaire ont montré un grand nombre de cellules partiellement dépolarisées avec une diminution de l'amplitude et de la vitesse maximale de dépolarisation rapide du potentiel d'action (V_{max}), une diminution de l'excitabilité et de la conduction avec des régions de blocs locaux et de réentrée. Certaines cellules présentaient un automatisme spontané type *pacemaker* avec une phase 4 de dépolarisation diastolique lente, consécutif aux blocs locaux. Le gène responsable de cette maladie a été localisé en 1p1-q1 (Amat-y-Leon F. et al. 1974; Graber H. L. et al. 1986; Kass S. et al. 1994). Il s'agit du gène codant la lamine A/C, une protéine de l'enveloppe nucléaire, dont certaines mutations sont également responsables de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreyfuss et de la lipodystrophie de Dunningan (Bonne G. et al. 1999; Cao H. et al. 2000; Fatkin D. et al. 1999).

Les lamines sont des polypeptides constitutifs de la lamina nucléaire, un réseau fibreux tapissant la face interne de la membrane nucléaire des cellules. Elles contribuent à l'intégrité structurale de l'enveloppe nucléaire et interagissent avec des protéines intégrales et avec les composants nucléaires. Elles forment un dimère dans leur domaine central, et l'interaction avec la chromatine et les protéines de membrane s'effectue par des sites de liaison situés dans ce domaine et dans la partie globulaire carboxy-terminale. Dans les cellules en division, elles ont un rôle dynamique dans l'organisation de la chromatine interphasique et le réassemblage de la membrane

nucléaire durant la mitose. Dans les cellules qui ne se divisent pas, elles participeraient à la transduction des signaux entre le cytoplasme et le noyau. Certaines mutations pourraient bloquer les fonctions nucléaires et entraîner la mort cellulaire; la perte myocytaire participerait à l'infiltration fibrolipidique du myocarde et du système de conduction. Ces mutations pourraient aussi altérer les interactions avec les protéines cytoplasmiques, en particulier avec les protéines du cytosquelette ou du sarcomère, et indirectement modifier les structures impliquées dans les communications et l'adhérence intercellulaire et/ou modifier l'expression ou les propriétés fonctionnelles de canaux ioniques de la membrane cellulaire (Fatkin D. et al. 1999).

Dans un deuxième locus de CMD, localisé en 3p22-p25, la dilatation ventriculaire était également précédée par des anomalies du rythme et de la conduction cardiaque. La maladie débutait dans l'adolescence par une dysfonction sinusale (bradycardie sinusale) et parfois des tachyarythmies supraventriculaires (flutter et fibrillation) et progressait vers des troubles de conduction progressifs se manifestant par des BAV du 1^{er} degré et des blocs de branche droits. La dilatation des oreillettes et des ventricules et l'insuffisance cardiaque se manifestant aux stades tardifs de la maladie (Olson T. M. and Keating M. T. 1996).

Un troisième locus de CMD et de troubles de conduction a été identifié en 6q23 (Messina D. N. et al. 1997). Aucun gène n'a encore été identifié dans ces deux dernières formes de CMD.

Dans le cœur, l'ankyrine B est présente au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique, où elle intervient dans la localisation des récepteurs de la ryanodine, du récepteur à l'IP3 et à l'ATPase calcique impliqués dans l'homéostasie calcique intracellulaire. Elle joue également un rôle au niveau de la membrane plasmique où elle servirait de protéine adaptatrice avec d'autres éléments du cytosquelette tels que la spectrine, la dystrophine, la vinculine et des éléments des sarcomères.

Les souris homozygotes invalidées pour l'ankyrine B présentent une myopathie squelettique sans cardiomyopathie apparente. Environ 80 % de ces souris meurent dans les premiers jours après la naissance. Elles présentent des troubles de conduction électrocardiographiques: une bradycardie, un bloc auriculo-ventriculaire du 2^e degré. Les études électrophysiologiques des myocytes ventriculaires montrent une diminution du courant I_{Na} liée à une diminution du nombre de canaux sodiques fonctionnels et des modifications des cinétiques et de la sensibilité au potentiel des canaux sodiques. De plus les canaux restent ouverts plus

longtemps et s'ouvrent de nouveau pour des potentiels de -40 et -50 mV, entraînant une augmentation du courant I_{Na} tardif et un allongement de la durée de phase 3 du potentiel d'action ventriculaire (Chauhan V. S. et al. 2000). Bien que les souris homozygotes ankyrine B $-/-$ présentent des anomalies d'adaptation de l'intervalle QT en fonction de la fréquence cardiaque, elles ont un intervalle QT normal. L'ankyrine B pourrait jouer un rôle essentiel dans la fonction et la régulation des canaux sodiques en stabilisant l'organisation du cytosquelette et de la membrane plasmique. Récemment, nous avons identifié une mutation dans le gène codant l'Ankyrine B dans une famille atteinte du syndrome du QT long LQT4. Ce syndrome associe un allongement de la durée du QT avec une morphologie de l'onde T de type sinusoidal, une dysfonction sinusale et une fibrillation auriculaire (Mohler P. J. et al. 2003; Schott J. J. et al. 1995).

Les protéines du cytosquelette peuvent donc être responsables de troubles de conduction ou de troubles du rythme. Les mécanismes par lesquels ces protéines du cytosquelette sont capables de générer des troubles de conduction, pourraient faire intervenir des perturbations des structures impliquées dans les communications et l'adhérence intercellulaire et/ou des modifications de l'expression ou des propriétés fonctionnelles de canaux ioniques de la membrane cellulaire.

Les protéines du cytosquelette seraient aussi impliquées dans la formation des jonctions communicantes et il a été montré qu'une désorganisation du cytosquelette d'actine par la cytochalasine empêchait la formation des jonctions de type gap. Au niveau des zones de contact intercellulaires, les complexes cadhérines-caténines sont capables d'interagir avec les filaments d'actine et la formation de ces complexes moléculaires constituerait un pré requis à la formation des jonctions communicantes (Fujimoto K. et al. 1997).

I.B. APPROCHE GÉNÉTIQUE DES TROUBLES DE LA CONDUCTION DÉGÉNÉRATIFS.

Le travail que nous allons présenter ici rapporte l'étude génétique de plusieurs familles atteintes de troubles de la conduction dégénératifs de la région nantaise. Initialement, l'identification de ces familles résultait d'enquêtes familiales réalisées en cas d'identification de plusieurs cas familiaux de troubles de la conduction. Secondairement, nous avons développé une approche plus systématique basée sur une approche d'épidémiologie génétique.

I.B.1. Matériel et méthodes.

I.B.1.a. Identification des familles.

Initialement, l'enquête génétique débutait lors de la découverte d'au moins deux patients apparentés porteurs d'une maladie de Lenègre. Nous contactons alors l'ensemble des membres de la famille, après que ceux-ci aient été prévenus par un des membres de la famille, en accord avec les recommandations françaises pour la recherche génétique et après l'accord du comité d'éthique de Nantes.

Afin d'identifier de nouvelles familles atteintes de BAV dégénératif, nous avons développé une approche basée sur l'épidémiologie génétique. L'hypothèse à la base de cette approche, est que s'il existe des formes familiales de la maladie, il doit être possible d'identifier des zones géographiques où la fréquence de la maladie sera anormalement élevée. Ces zones correspondant à des « clusters » familiaux.

Afin de pouvoir développer ce type d'approche deux conditions sont essentielles. Il faut disposer d'un fichier exhaustif de la maladie et il faut que la population étudiée soit sédentaire.

Nous avons constitué un fichier incluant l'ensemble des patients de notre région implantés d'un pacemaker pour BAV dégénératif. Pour cela, nous allons utiliser les fichiers du CHU de Nantes, du centre hospitalier de Saint-Nazaire, du centre hospitalier départemental de la Roche-sur-Yon, du centre hospitalier de Chollet, du CHU d'Angers et des nouvelles cliniques nantaises.

Notre but étant de constituer un fichier regroupant tous les patients implantés d'un pacemaker pour BAV dégénératif afin de dresser une carte régionale de la fréquence de cette pathologie grâce à l'identification du lieu de naissance des patients par le code INSEE contenu dans le numéro de sécurité sociale. Dans un deuxième temps, nous avons contacté les patients implantés d'un pacemaker pour BAV dégénératif et issus des zones ayant la plus forte fréquence de la maladie. Nous avons proposé un dépistage de la maladie par la réalisation d'un électrocardiogramme aux membres de la famille de ces patients.

Par ailleurs, nous avons également recherché la présence d'homonymie chez les patients implantés et issus de la même commune car ces homonymies peuvent fréquemment révéler des formes familiales.

Cette approche est réalisable dans notre région car, la population est extrêmement sédentaire et les gens restent fréquemment pendant de très nombreuses générations dans la même commune. En effet, dans notre région une part importante de la population est restée rurale et ainsi, également pour des raisons historiques (les guerres de Vendée), il s'est constitué des isolats géographiques extrêmement forts.

Une fois les zones de haute fréquence de la maladie identifiées, nous avons réalisé une recherche de généalogie ascendante à partir des patients atteints issus des communes avec la plus forte prévalence de la maladie afin d'identifier un ancêtre commun à ces patients. Les recherches de généalogie ascendante ont été réalisées par le professeur Chaventré du laboratoire de génétique population de Bordeaux.

I.B.1.b. Caractérisation phénotypique.

L'étude clinique comportait un interrogatoire sur les antécédents médicaux, un examen clinique, en particulier du système cardiovasculaire, et un ECG douze dérivations. Les paramètres suivants ont été mesurés au repos: fréquence cardiaque, intervalles PR, QRS, QT et QTc, onde P et axe QRS. Un intervalle PR de durée < 210 ms, un intervalle QRS de durée < 115 ms et un axe QRS compris entre des valeurs de -30° et $+90^{\circ}$ étaient considérés comme normaux.

Afin d'améliorer la précision des mesures, nous avons réalisé des électrocardiogrammes avec amplification et moyennage de l'onde P et des QRS réalisés grâce au logiciel développer par Marquette Inc.

Les troubles de conduction ont été définis selon la classification conventionnelle (Criteria committee of the New York Association, 1979).

Un bloc pariétal était défini comme un élargissement des complexes QRS (>115 ms) sans les critères morphologiques de bloc de branche droit ou gauche (Rosenbaum M. B. 1970).

I.B.1.c. Etude génétique, analyse de liaison génétique.

I.B.1.c.1. Principe.

L'analyse de liaison génétique consiste à rechercher une co-ségrégation entre un marqueur génétique et un locus morbide, associé au phénotype de la pathologie, afin de localiser le gène.

Les marqueurs génétiques utilisés sont les marqueurs microsatellites, séquences d'ADN polymorphes avec une localisation connue sur les cartes génétiques. La carte génétique du Généthon est dense et regroupe des microsatellites de type dinucléotidiques (CA)_n uniformément distribués, informatifs. Ils sont situés dans des régions non codantes, extra-géniques ou intra-géniques (introniques) (Dib C. et al. 1996).

La distance génétique entre le locus morbide et un marqueur lié dépend du temps écoulé depuis la mutation (l'effet fondateur). Ainsi, plus l'effet fondateur est éloigné dans le temps, plus il y aura eu de méioses et plus l'intervalle retrouvé chez les sujets atteints sera faible.

I.B.1.c.2. Test statistique : la méthode paramétrique des lod scores.

L'outil utilisé est la méthode paramétrique des lod scores (*logarithm of the odds, Z*) deux points, log décimal du rapport de la vraisemblance de la liaison sur celle de la non liaison (Morton N. E. 1955). Ainsi, le lod score, calculé par le programme informatique MLINK (GLUE, *Genetic Linkage User Environment*, <http://menu.hgmp.mrc.ac.uk/menu-bin/GLUE/glue.pl>), évalue le rapport de la vraisemblance pour chaque marqueur.

$$Z = \frac{\log_{10} L(\theta < 0.5)}{L(\theta = 0.5)} \quad \text{avec } \theta = \frac{\text{nombre de gamètes recombinées}}{\text{nombre de gamètes transmis}}$$

Le programme prend en compte différents paramètres : les résultats de l'analyse génétique (les génotypes), la structure de la famille, le statut des individus (inconnu, sain, ou atteint), ainsi que le mode de transmission (autosomique dominant) et la pénétrance (fixée à 90 %).

Le marqueur est significativement lié au locus morbide si Z est supérieur à 3 (1000 chances sur 1 de liaison), et significativement non lié si Z est inférieur à -2. Entre ces deux valeurs, le calcul n'est pas significatif. Pour obtenir un calcul significatif, il faut augmenter le nombre de méioses étudiées, c'est-à-dire augmenter la taille de la famille.

I.B.1.c.3. Extraction de l'ADN génomique.

Les ADN lymphocytaires sont extraits à l'aide du kit Nucleon BACC2 (Amersham LIFE SCIENCE) selon les instructions du fournisseur, à partir du sang des individus retenus pour l'analyse génétique. Les ADN précipités sont remis en solution dans du TE 20/1 (Tris 20 mM, EDTA 1 mM) pour obtenir une concentration d'environ 100 ng/μl, puis dilués dans l'eau pour une solution de travail à 20 ng/μl.

I.B.1.c.4. Génotypage.

I.A.1.a.i.a.1. Génotypage avec des amorces fluorescentes.

Les marqueurs génétiques analysés sont polymorphes et régulièrement répartis sur l'ensemble du génome, tous les 10 cM environ. Ils sont testés par PCR avec des amorces fluorescentes encadrant les répétitions (ABI PRISM™ Linkage Mapping Set Version 2, Applied Biosystems) selon les instructions du fournisseur.

I.A.1.a.i.a.2. Génotypage avec des amorces non fluorescentes.

Pour tester les locus potentiels en détail, nous avons eu recours à d'autres marqueurs génétiques

proches des premiers marqueurs, dont les séquences des amorces et les positions sur la carte génétique sont accessibles par le Généthon (Dib C. et al. 1996).

I.A.1.a.i.a.3. PCR (Polymerase Chain Reaction).

La première étape du génotypage consiste à amplifier les microsatellites par PCR en utilisant des amorces s'hybridant à des séquences spécifiques bordant chaque marqueur microsatellite, générant des fragments de tailles variables selon les individus.

Les PCR sont réalisées pour chaque individu et chaque marqueur dans un volume final de 20 µl comprenant 100 ng d'ADN, 1 unité de *Taq* DNA polymerase, du tampon de PCR 1X associé (Amersham Biosciences), des dNTP (200 µM, InvitrogenTM), et les amorces sens et anti-sens du Généthon (1 µM, Sigma-Genosys), dans l'appareil GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems).

La réaction comprend une dénaturation de 3 min à 94°C, puis une amplification de 35 cycles (30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'appariement à 55°C, et 1 min d'élongation à 72°C), et enfin une extension finale de 10 min à 72°C.

Les produits de PCR sont contrôlés par une électrophorèse en mini-gel d'acrylamide 6 % dans du tampon TBE 1X (InvitrogenTM), en appliquant un champ électrique de 140 V, puis une révélation par le bromure d'éthidium sous UV.

I.A.1.a.i.a.4. Marquage fluorescent des fragments de PCR.

L'étape suivante est le marquage avec des fluorophores d'un des deux brins d'ADN des produits de PCR (l'élongation). Ainsi, 1 à 5 µl de produit de PCR sont ajoutés dans un volume final de 15 µl contenant 0,75 unité de *Taq* DNA polymerase, le tampon de PCR 1X associé, des dNTP (200 µM, InvitrogenTM), l'amorce sens ou anti-sens (0,1 µM, Sigma-Genosys), et des dCTP couplés à un fluorophore (R6G vert ou R110 bleu, 0,5 µM, Perkin Elmer).

La réaction comprend une dénaturation de 2 min à 94°C, puis une amplification de 25 cycles (30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'appariement à 49°C, et 20 s d'élongation à 72°C).

L'utilisation d'une seule des deux amorces du couple permet de ne marquer qu'un seul brin, ce qui améliore la résolution lors de l'analyse du gel d'électrophorèse (Jouquand S. et al. 1999).

I.A.1.a.i.a.5. Purification des fragments de PCR fluorescents.

Les produits d'élongation sont purifiés sur résine G50 (Séphadex, Amersham Biosciences) qui est centrifugée 4 min à 2000 rpm à température ambiante afin d'éliminer l'eau, et où sont multiplexés les produits d'élongation des différents marqueurs analysés, pour chaque individu, puis filtrés par une centrifugation de 3 min à 2000 rpm.

I.A.1.a.i.a.6. Migration électrophorétique sur séquenceur.

Deux microlitres de pools (ensemble des marqueurs) pour chaque individu sont alors mélangés à 3 µl de solution de charge, composée de formamide déionisée (2,5 µl), de gel loading dye (0,5 µl), et de Genescan[®]400HD[Rox] (0,5 µl), le standard de taille interne (Applied Biosystems). Ces échantillons sont dénaturés 5 min à 94°C puis déposés sur le séquenceur ABI PRISM[™] 377 (Applied Biosystems).

La migration s'effectue en gel d'acrylamide Long Ranger 5 % (tebu-bio) à 51°C, 3000 V, dans du tampon TBE 1X (Invitrogen[™]). Le laser, de puissance 40 mW, excite les fluorophores et une caméra digitale enregistre l'image (2400 scans par heure).

I.A.1.a.i.a.7. Analyse des génotypes.

Les données sont successivement analysées par les logiciels GeneScan[®]3.1. et Genotyper[®]2.1. La taille des allèles est déterminée pour chaque marqueur microsatellite, grâce au standard de taille interne. Le génotype de chaque individu pour chaque marqueur est déduit, en numérotant les différents allèles, puis les haplotypes sont construits et les lod scores calculés.

I.B.1.d. Statistiques.

Les variables quantitatives sont exprimées en moyenne +/- écart type. Les variables qualitatives sont exprimées en pourcentage. L'analyse statistique utilise le test t de student pour la

comparaison des variables discontinues, le test du Chi 2 ou le test exact de Fisher pour la comparaison de deux pourcentages. Les différences sont considérées comme significatives pour un p inférieur à 0,05.

Pour la comparaison des courbes de régression linéaire, nous avons utilisé la méthode de Altman et Gardner. Cette méthode est utilisée pour comparer deux groupes de valeurs avec un intervalle de confiance de 95% pour la pente de la courbe de régression linéaire.

I.B.2. Etude génétique et phénotypique de la famille C.

I.B.2.a. Caractérisation phénotypique.

Une première étude a été réalisée initialement à partir de 42 individus de cette famille, (appelée famille C-1) ayant accepté de participer, parmi lesquels 15 patients étaient clairement atteints de troubles de conduction auriculo-ventriculaire (moyenne des durées des QRS moyennés: 135 ± 7 ms), et présentaient différents aspects de troubles de conduction cardiaque. Dix patients présentaient un bloc de branche droit isolé ou associé à un hémibloc antérieur ou postérieur gauche, deux patients avaient un bloc de branche gauche, un patient présentait un hémibloc antérieur gauche isolé et huit patients avaient un intervalle PR allongé (> 210 ms). Quatre patients des générations II et III ont reçu un stimulateur cardiaque en raison de syncopes ou de BAV complet (II-1, II-5, II-6 et III-19) (Figure 4). Aucun des individus atteints ne présentait d'onde T allongée, ni de sus-décalage du segment ST, ni de maladie cardiaque structurale apparente.

Le suivi dans le temps de plusieurs sujets atteints de cette famille a montré que les troubles de conduction s'aggravaient avec l'âge et le diagnostic de troubles de conduction héréditaires progressifs, encore appelés maladie de Lenègre, a été posé (Figure 2).

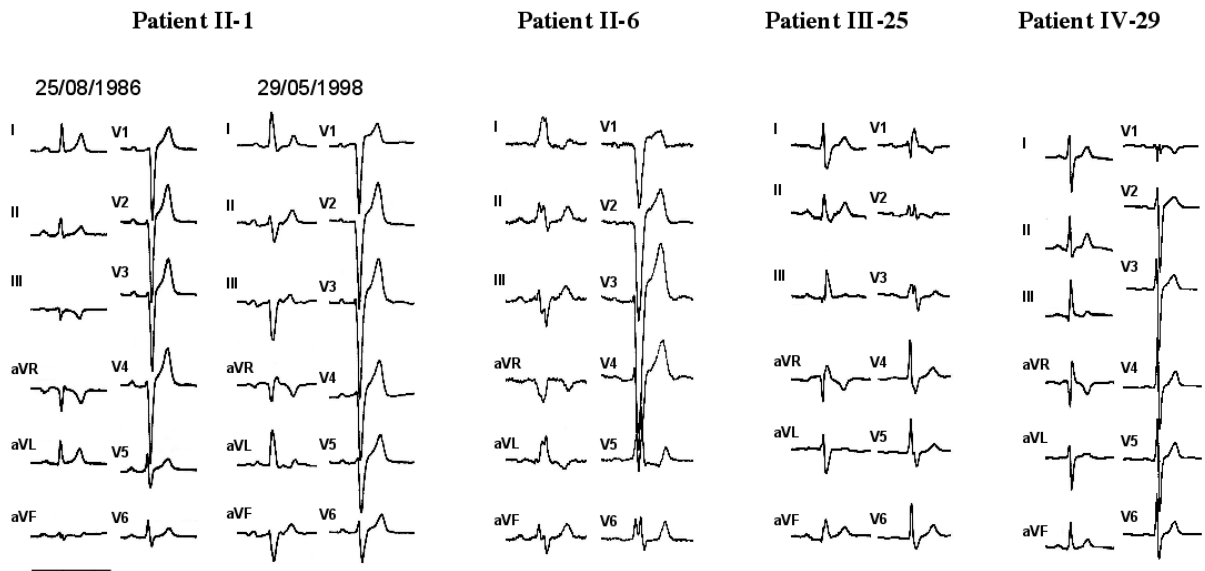


Figure 2: Electrocardiogrammes de quelques patients de la famille C : le patient II-1 avait un trouble de conduction non spécifique à l'âge de 60 ans (durée de QRS de 120 ms) mais à l'âge de 72 ans il présentait un hémibloc antérieur gauche avec des complexes QRS larges et un intervalle PR long (240 ms). Les électrocardiogrammes des patients II-6, III-25 et IV-29 montrent respectivement un bloc de branche gauche, un bloc de branche droit et un hémibloc postérieur gauche.

I.B.2.b. Etude génétique de la famille C.

A partir des membres de cette famille (famille C-1), pour lesquels la maladie de Lenègre ségrégeait selon un mode de transmission autosomique dominant, nous avons réalisé des analyses de liaison génétique. Cette famille comportait initialement 15 individus atteints et 23 individus sains. En raison de l'apparition tardive des troubles de conduction, le statut génétique de quatre sujets jeunes de la dernière génération (IV-5, IV-15, IV-20 et IV-34) dont le phénotype était à la limite de la normale, a été considéré comme indéterminé. Nous avons utilisé une approche gène-candidat pour tester les différents locus de troubles de conduction isolés ou associés à d'autres maladies cardiaques, les locus des connexines cardiaques ainsi que le locus du canal sodique cardiaque *SCN5A*.

I.B.2.b.1. Locus de troubles de conduction.

Nous avons d'abord exclu le premier locus de troubles de conduction isolés localisé sur le chromosome 19q13.2-q13.3 (Brink P. A. et al. 1995; de Meeus A. et al. 1995) ainsi que le locus du gène *Csx /Nkx2.5* en 5q34 (Schott J. J. et al. 1998).

Nous avons également exclu les différents locus de cardiomyopathies héréditaires associées à des troubles de conduction : le locus du gène de la lamine A/C (*LMNA*) en 1q21.2-q21.3 (Fatkin D. et al. 1999; Kass S. et al. 1994), un second locus en 3p22-p25 (Olson E. N. et al. 1996; Olson T. M. and Keating M. T. 1996), et un troisième locus en 6q23 (Messina D. N. et al. 1997).

I.B.2.b.2. Locus des connexines cardiaques.

En raison de l'importance des connexines dans la conduction cardiaque, nous avons testé quatre connexines exprimées dans le cœur: les connexines 37 (1p35.1), 40 (1q21.1), 43 (6q21-23) et 45 (17q21) (Saffitz J. E. et al. 2000). L'analyse de liaison génétique de ces locus de connexines cardiaques n'a pas permis de trouver de liaison statistique significative.

I.B.2.b.3. Locus du canal sodique cardiaque *SCN5A*.

En raison du rôle du courant sodique dans la conduction électrique cardiaque, le locus du canal sodique cardiaque *SCN5A*, en 3p21, a été testé. En utilisant le marqueur D3S1260 flanquant le gène *SCN5A*, nous avons trouvé une coségrégation de la maladie avec ce marqueur chez tous les individus atteints (lod score de 6,03 à 0% de recombinaison). L'analyse d'autres marqueurs flanquant et la mise en évidence d'évènements de recombinaison méiotique, a permis de confirmer une liaison génétique au locus 3p21 et de définir un intervalle de liaison minimal entre les marqueurs D3S2338 et D3S3559 contenant le gène *SCN5A*.

Le gène *SCN5A* comporte 28 exons dispersés sur une distance génomique de 80kb (Wang Q. et al. 1996). Le séquençage des régions codantes de ce gène a permis de trouver une substitution T → C (Thymine → Cytosine) sur un site donneur d'épissage de l'intron 22 (IVS22+2

T→C). Cette mutation était retrouvée chez tous les sujets atteints de la famille et n'a pas été trouvée chez les sujets sains de cette famille ni chez 100 chromosomes contrôles sains non apparentés (Figure 3). Cette mutation serait à l'origine d'un épissage anormal de l'exon 22 qui serait absent dans le transcrit correspondant (Krawczak M. et al. 1992). La protéine tronquée au niveau du segment S4 du domaine III, qui joue un rôle important dans la sensibilité au potentiel, ne serait pas fonctionnelle.

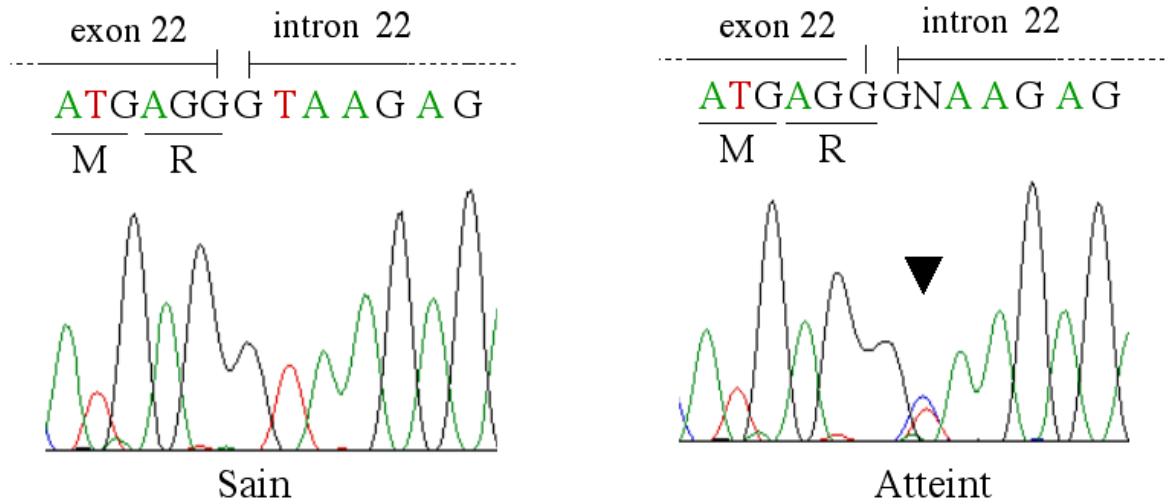


Figure 3 Séquence de la jonction exon-intron de l'exon 22 du gène SCN5A. Chez un sujet sain (à gauche) et chez un individu atteint (à droite) de la famille C. Les individus atteints présentent une mutation d'épissage T→C en position +2 après la fin de l'exon 22.

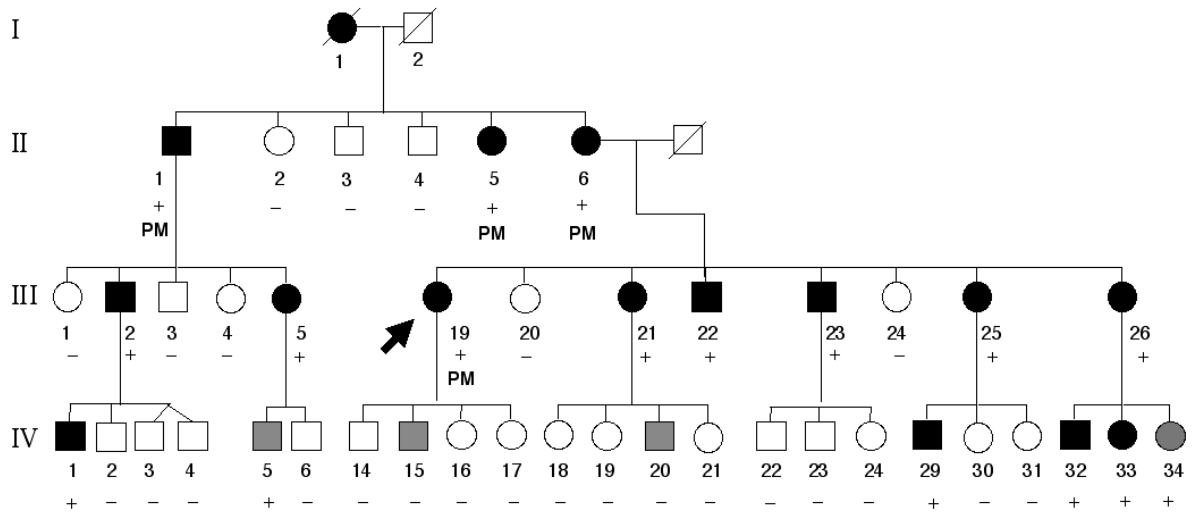


Figure 4 : Arbre généalogique de la famille C. Le propositus de la famille est indiqué par une flèche. Les sujets atteints sont représentés en noir, les sujets sains sont représentés en blanc et les sujets de phénotype indéterminé sont représentés en gris. Les patients porteurs de la mutation (IVS22+2 T→C) du gène SCN5A sont indiqués par (+). Les patients porteurs d'un stimulateur cardiaque sont indiqués (PM pour pacemaker).

Dans le cadre d'une collaboration avec le service de génétique médicale du CHU d'Amsterdam (Hollande), une seconde mutation du gène SCN5A a été identifiée dans une petite famille hollandaise comportant trois membres atteints de troubles de conduction isolés non progressifs. Le propositus (II-3) présentait après la naissance un BAV de 1^o degré associé à un bloc de branche droit (intervalles PR: 200 ms et QRS: 120 ms). Un de ses frères (II-2) présentait un bloc de branche droit asymptomatique (QRS: 110 ms) et leur mère (I-2) présentait également des troubles de conduction non systématisés (QRS: 120 ms) (Figure 5). Le séquençage du gène SCN5A chez ces sujets atteints a permis d'identifier une délétion d'un nucléotide en position 5280, entraînant un décalage du cadre de lecture et un codon STOP prématuré (codon 1786) (Figure 6). Comme dans le cas précédent, ce canal tronqué à partir de la boucle S5-S6 du domaine DIV, ne serait pas fonctionnel (Schott J. J. et al. 1999).

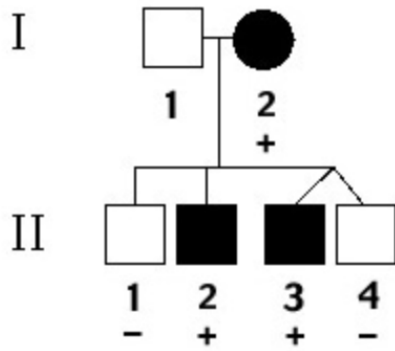


Figure 5: Arbre généalogique de la famille hollandaise. Les sujets atteints sont représentés en noir, les sujets sains sont représentés en blanc. Les patients porteurs de la mutation (*delG5280*) du gène *SCN5A* sont indiqués par (+).

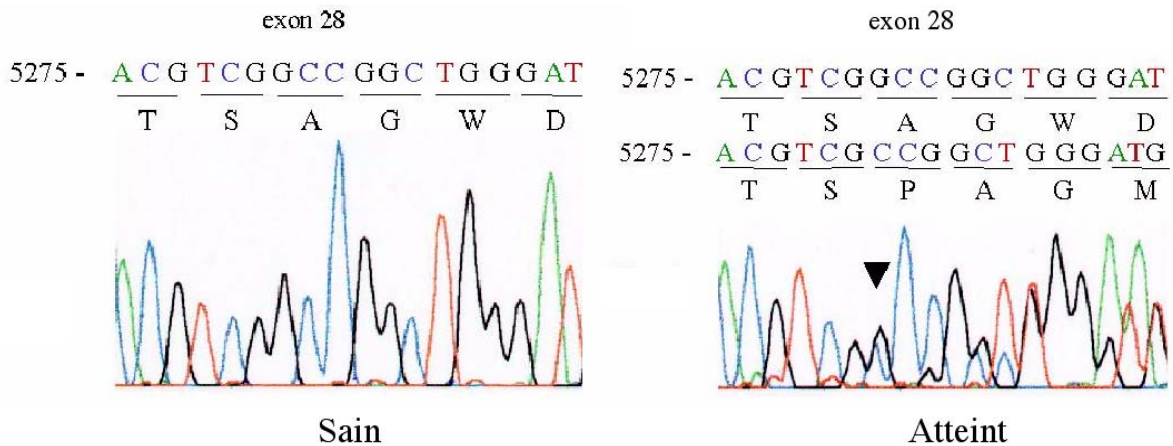


Figure 6 : Représentation de la séquence nucléotidique de l'exon 28 du gène *SCN5A* chez un sujet sain (à gauche) et chez un individu atteint (à droite) de la petite famille hollandaise. Les individus atteints présentent une délétion d'un G en position 5280 du gène.

I.B.2.c. Etude d'expression fonctionnelle.

Pour confirmer les conséquences fonctionnelles de la mutation IVS22+2 T→C du gène *SCN5A*, nous avons cloné le transcrit muté en utilisant la technique de RT-PCR (Reverse

Transcriptase- Polymerase Chain reaction). Puisque aucun tissu cardiaque d'un individu atteint n'était disponible, nous avons appliqué cette technique à de l'ARN total extrait de lymphocytes périphériques de patients sains et atteints de cette famille. Une étape de transcription inverse avec un oligo-dT suivie de réactions de PCR emboîtées, en utilisant différentes amorces localisées dans les exons 20 à 24 du gène, ont mis en évidence des transcrits alternatifs dans les lymphocytes normaux, délétés au niveau des exons 22 ou 23. Cette approche de RT-PCR ne pouvant être appliquée, nous avons donc utilisé une deuxième approche d'« exon-trapping ». En utilisant une technique de PCR permettant d'amplifier de grands fragments d'ADN, nous avons amplifié l'ADN génomique d'un individu sain et d'un individu atteint à l'aide d'amorces situées dans les séquences introniques flanquant les exons 21 et 23. Le fragment génomique ainsi obtenu a été sous-cloné dans un vecteur d'« exon-trapping » (pSPL3) et cette construction a été transfectée dans des cellules COS-7. Nous avons ensuite réalisé une RT-PCR à partir de l'ARN total extrait de ces cellules, 48 heures après la transfection. Cette technique a permis de mettre en évidence un transcrit anormal délété de l'exon 22 du gène chez les sujets atteints et absent chez les sujets sains (Figure 7 et Figure 8). La limite de cette approche vient du fait qu'elle ne permet pas de détecter tous les transcrits anormaux qui pourraient atteindre d'autres exons du gène.

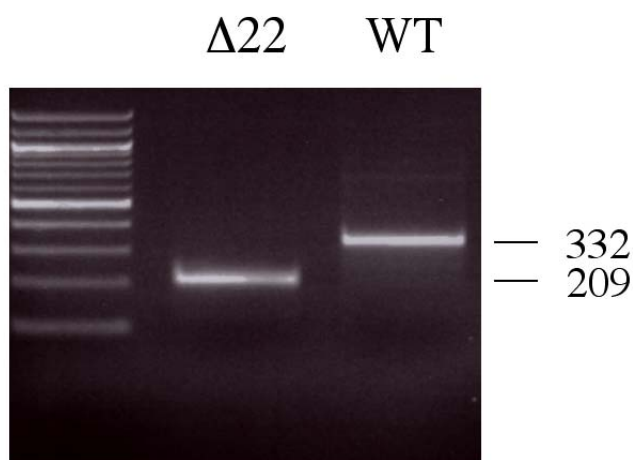


Figure 7: Epissage anormal de l'exon 22 du gène *SCN5A* chez un patient atteint de la famille C. Le fragment génomique obtenu par « exon trapping », sous-cloné dans un vecteur, a été transfecté dans les cellules COS-7. La réaction de RT-PCR réalisée sur ces cellules montrait un produit de 209 pb chez les sujets atteints, correspondant à une délétion de l'exon 22 du gène

SCN5A, alors que chez les sujets sains un seul produit de 332pb correspondant au transcrit normal (WT) était produit.

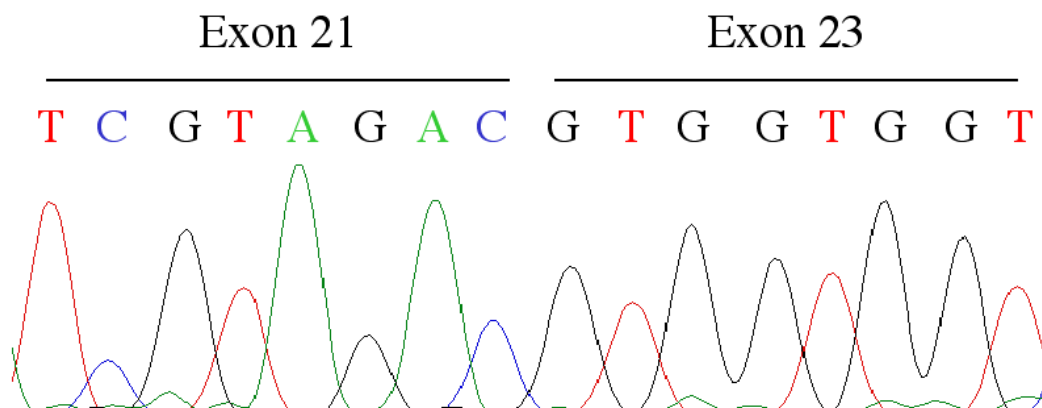


Figure 8: Epissage anormal de l'exon 22 du gène *SCN5A* chez un patient atteint de la famille C. Le séquençage du produit de 209 pb, obtenu par « exon-trapping » chez les sujets atteints, montre que ce produit de RT-PCR correspond à un transcrit *SCN5A* délété de l'exon 22.

Nous avons ensuite caractérisé les conséquences fonctionnelles de cette délétion de l'exon 22 du gène *SCN5A* (*SCN5A*- δ exon22) dans un système d'expression hétérologue de mammifère, par la technique de patch-clamp (Probst V. et al. 2003b) (Figure 9). Des cellules COS-7 ont été transfectées avec 0,8 μ g/ml d'un vecteur d'expression contenant l'ADNc de *SCN5A* délété de l'exon 22 (δ exon22). Aucun courant sodique n'a été enregistré en réponse à des dépolarisations successives (n=15). Des cellules transfectées avec *SCN5A*-WT ou *SCN5A*-WT/ *SCN5A*- δ 22 (rapport 1/1) présentaient des courants sodiques de propriétés identiques. La densité de courant à - 20 mV, était de - 60,8 \pm 10,8 pA/pF (n=23) dans les cellules transfectées avec 0,8 μ g/ml de *SCN5A*-WT et 1,2 μ g/ml de pTR-GFP utilisé comme plasmide inerte. Cette valeur n'était pas différente de la valeur - 57,6 \pm 9,2 pA/pF (n=19) obtenue en transfectant les cellules avec 0,8 μ g/ml de plasmide *SCN5A*-WT, 0,8 μ g/ml de plasmide *SCN5A*- δ exon22 et 0,4 μ g/ml de plasmide pTR-GFP. Le potentiel de demi-activation de *SCN5A*-WT (- 41,6 \pm 1,3 mV, n=14) n'était pas différent de celui obtenu pour *SCN5A*-WT et *SCN5A*- δ exon22 (- 38,7 \pm 1,4 mV, n=10, p>0,05). De même, le potentiel de demi- inactivation de *SCN5A*-WT (- 88,5 \pm 1,4 mV,

n=10) n'était pas différent de celui obtenu pour SCN5A-WT et SCN5A- δ exon22 ($-88,6 \pm 4,1$ mV, n=7, $p>0,05$). Ces résultats suggèrent que la mutation IVS22+2 T \rightarrow C provoque une perte de fonction du canal sodique et que l'haplo-insuffisance du canal serait le mécanisme responsable des troubles de conduction cardiaque isolés (Probst V. et al. 2003b).

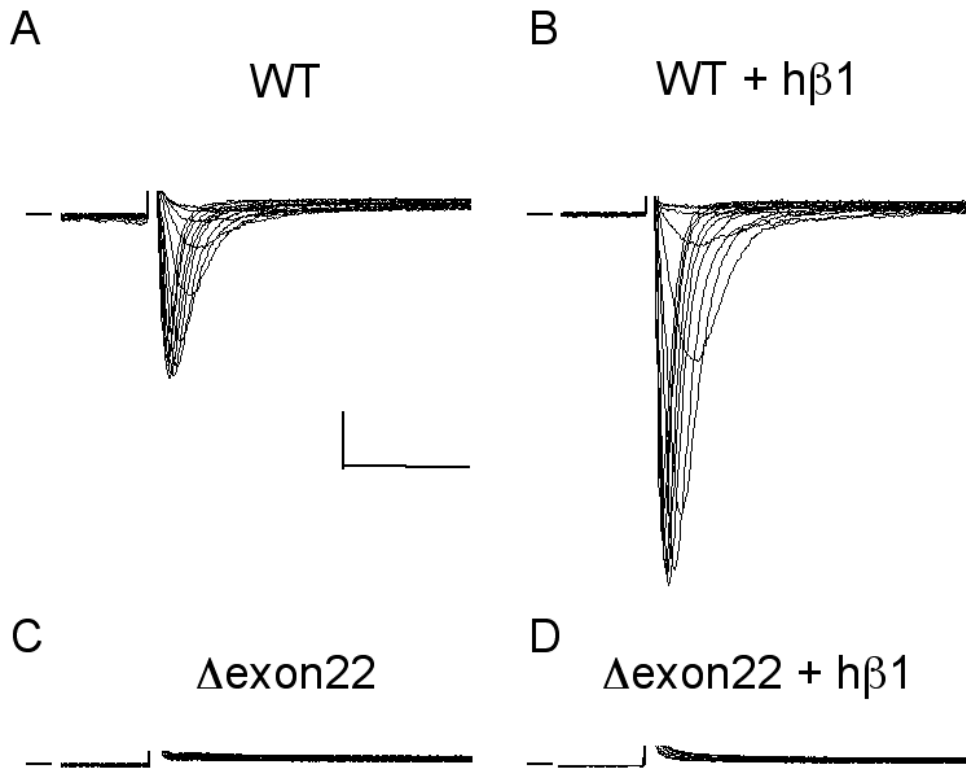


Figure 9 : Etude d'expression fonctionnelle de la mutation IVS22+2 T \rightarrow C du gène SCN5A par la technique de patch clamp. A la différence des canaux sodiques normaux (WT) sans (A) ou en présence de la sous-unité β ($h\beta 1$) (B), les canaux mutés (δ exon22) en présence (D) ou non (C) de la sous-unité $\beta 1$, ne produisent aucun courant.

Pour confirmer l'expression à la surface cellulaire du canal muté SCN5A- δ exon22, des protéines de fusion SCN5A-WT-EGFP ou SCN5A- δ exon22-EGFP ont été exprimées dans des cellules COS-7. Les résultats obtenus en épifluorescence et en microscopie confocale montrent que les protéines de fusion SCN5A-WT-EGFP ou SCN5A- δ exon22-EGFP semblent toutes les deux localisées au niveau de la membrane cellulaire (Figure 10). Ces résultats indiquent que le canal SCN5A- δ exon22, bien que non fonctionnel, est transporté normalement jusqu'à la

membrane plasmique.

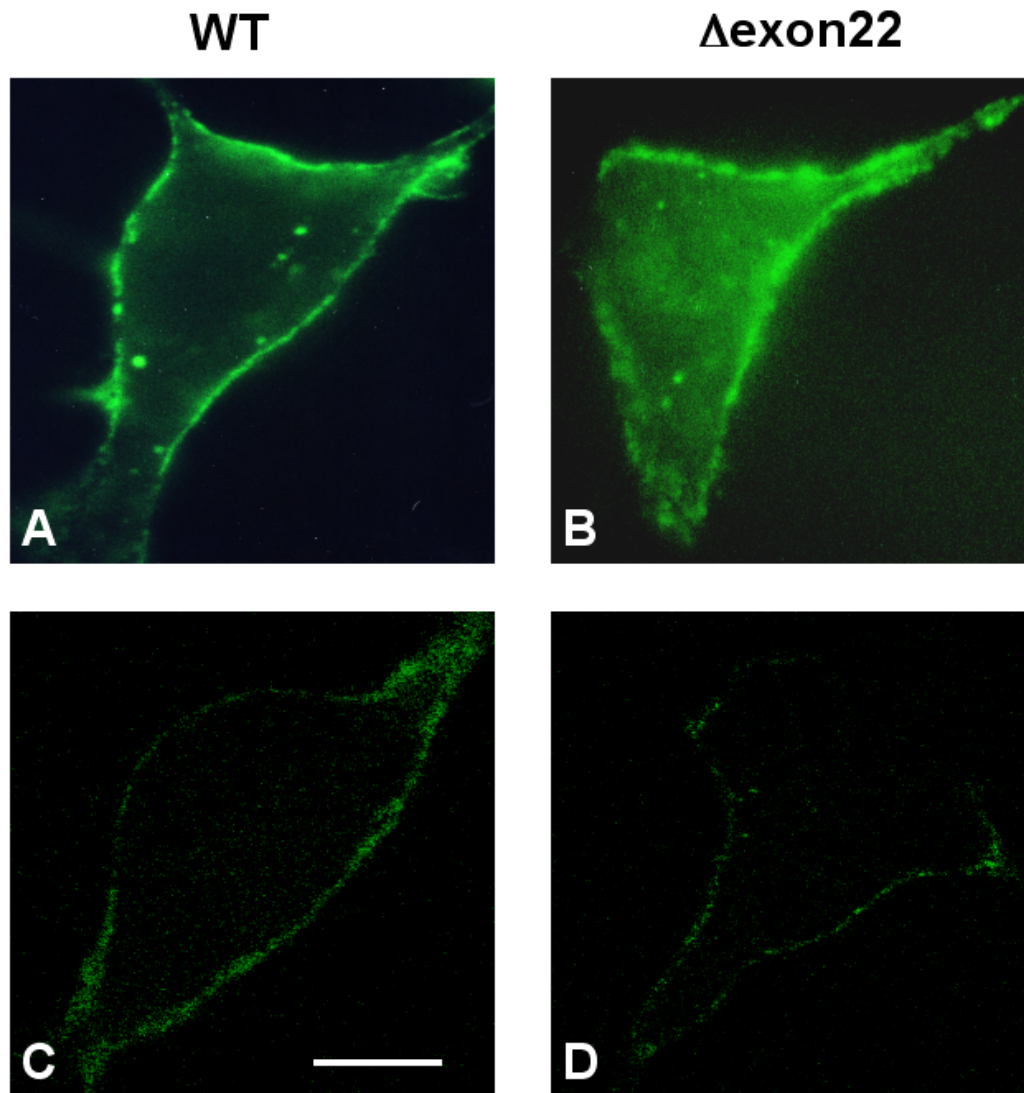


Figure 10 : Adressage de SCN5A- δ exon22 à la surface cellulaire. Cet adressage n'est pas perturbé par la mutation SCN5A- δ exon22. Les cellules ont été transfectées par 1 μ g de SCN5A-WT-EGFP ou SCN5A- δ exon22-EGFP. Trois jours après transfection, la localisation de la protéine de fusion a été examinée en microscopie en fluorescence (A et B) et microscopie confocale (C et D).

I.B.2.d. Analyse genotype-phénotype de la famille C.

En interrogeant plusieurs membres de la famille C, nous avons appris la présence d'autres sujets, que nous n'avions pas examinés initialement. L'augmentation de la taille de la famille et la possibilité de connaître le statut génétique de chaque membre de cette famille, nous a permis de réaliser une étude de relation genotype-phénotype (Probst V. et al. 2003b).

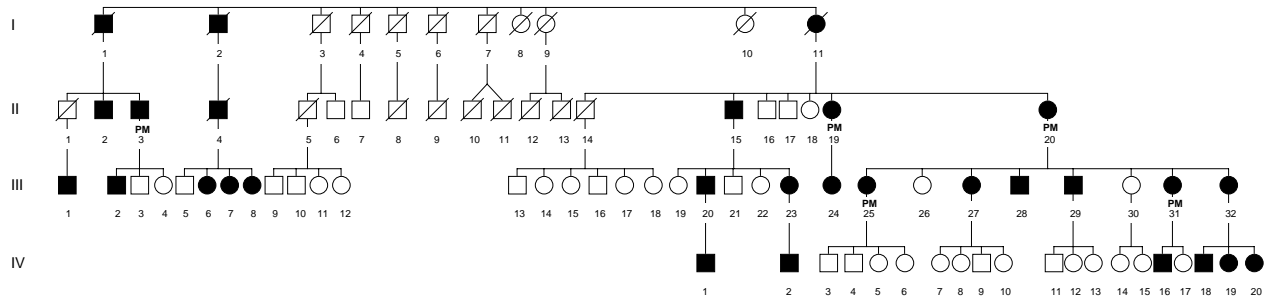


Figure 11 : Arbres généalogique élargi de la famille C.

Parmi les 62 sujets génotypés, 25 patients étaient porteurs de la mutation (IVS22+2 T→C) du gène SCN5A et 40 ne l'étaient pas. Le génotypage a permis de diviser les patients en deux groupes en fonction de leur statut génétique : ceux qui sont porteurs de la mutation et ceux qui ne le sont pas. Ce classement a permis de comparer entre eux les phénotypes des sujets porteurs de la mutation et de comparer les données cliniques entre les sujets porteurs de la mutation et les sujets sains de cette famille.

Il existe une variabilité phénotypique importante entre les patients porteurs de la mutation (IVS22+2 T→C) du gène SCN5A.

Dans cette famille, tous les types de troubles de conduction étaient présents.

Huit patients avaient un bloc de branche complet isolé (III-29, IV-1, IV-16, IV-18) ou associé avec un hémibloc antérieur gauche (III-27, III-31, III-32, IV-19). Un patient avait un bloc incomplet de la branche droite du faisceau de His (III-23). Un patient avait un hémibloc postérieur gauche isolé (II-2). Huit patients avaient un bloc pariétal isolé (III-1, III-2, III-7, III-25, IV-20), ce bloc pariétal était associé à une déviation axiale gauche dans 3 cas (II-3, II-15, II-19). Dix patients avaient un bloc auriculo-ventriculaire du premier degré (II-3, II-19, II-20, III-2, III-23, III-25, III-27, III-28, III-29, III-32). Enfin, quatre patients, un jeune garçon de 11 ans (IV-2) et trois femmes âgées de 36 (III-6), 47 (III-8) et 50 ans (III-24), avaient un ECG dans les limites

de la normale (Figure 12).

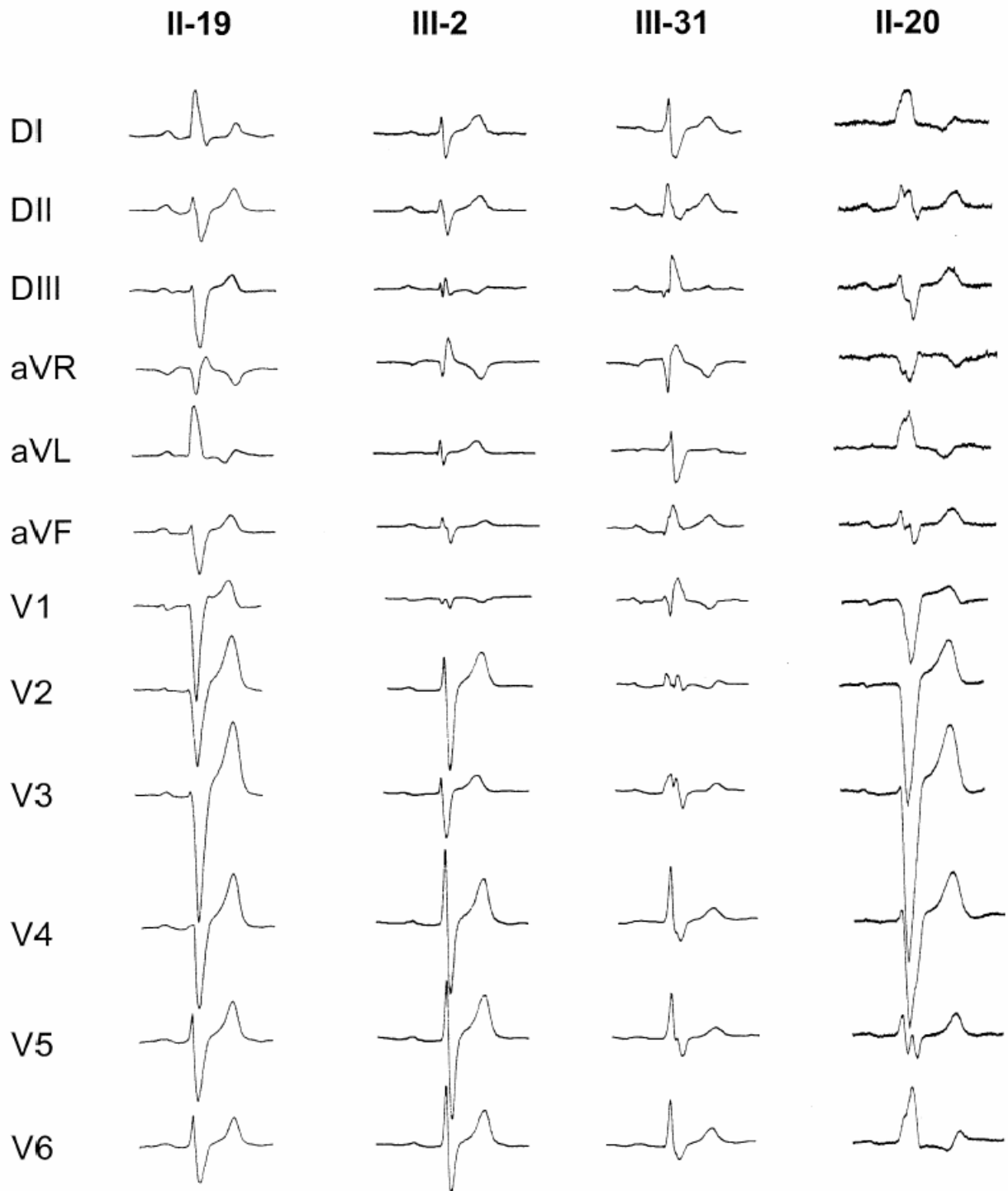


Figure 12 : ECG caractéristiques de la famille. La patiente II-19 âgée de 70 ans avait un bloc pariétal avec une déviation axiale gauche. Elle a été implanté d'un pace-maker en raison de multiples épisodes de syncopes. Le patient III-2 était âgé de 49 ans et avait un bloc pariétal avec

un axe électrique indéterminé. La patiente III.31 était âgée de 48 ans, elle était atteinte d'un bloc de branche droit. L'aggravation rapide de ses troubles de conduction avec la survenue d'épisodes de BAV 2/1 au cours d'un exercice a amené à lui implanter un pace-maker. La patiente II-20 était âgée de 78 ans. Son ECG montrait un bloc de branche gauche. Elle a été implantée d'un pace-maker en raison de la survenue de plusieurs épisodes syncopaux.

Parmi les patients porteurs de la mutation, 7 avaient des symptômes qui pouvaient être attribués aux anomalies de la conduction. Des syncopes survenant au repos étaient le type de symptômes le plus fréquent et pouvaient être retrouvées lors de l'interrogatoire de 5 patients (II-3, II-19, II-20, III-25, III-31). Chez le patient III-25 une exploration électrophysiologique avait été réalisée en raison de la survenue d'une syncope chez ce patient porteur d'un bloc pariétal. L'intervalle HV était dans les limites de la normale de base (HV=55 ms) mais augmentait anormalement à 120 ms après injection d'Ajmaline. L'indication de l'implantation d'un pacemaker avait été retenue et le jour de son hospitalisation, la patiente a présenté un arrêt cardiaque lié à un passage en BAV complet qui a nécessité des manœuvres de ressuscitation cardio-respiratoires. Tous les patients qui ont bénéficié de l'implantation d'un pacemaker sont restés asymptomatiques depuis.

L'âge moyen des membres de la famille était similaire chez les patients porteurs de la mutation (48±20 ans) et non porteurs (40±10 ans). Leur pression artérielle était également similaire 121±14 contre 125±12 mmHg pour la pression artérielle systolique et 77±9 contre 73±9 pour la diastolique. Une échocardiographie avait été réalisée chez l'ensemble des membres atteints de la famille mais aucune anomalie n'avait été retrouvée.

Dans cette famille, la fréquence cardiaque chez les sujets atteints était plus basse que chez les sujets sains (68±10 bpm contre 75±11 bpm; $p=0.03$). L'intervalle PR était plus long chez les sujets atteints que chez les sujets sains (206±33 ms contre 149±22 ms, $p<0.00001$). L'intervalle QRS était plus long chez les sujets atteints que chez les sujets sains (130±28 ms contre 95±13 ms, $p<0.00001$). La durée du QT était identique dans les deux groupes (423±29 ms contre 415±19 ms). La durée de l'onde P moyennée et filtrée était supérieure chez les sujets atteints (143±13 ms contre 119±13 ms; $p<0.0001$). Enfin, le QRS moyenné et filtré était également plus long chez les sujets atteints (140±20 ms contre 116±10 ms, $p<0.0001$) (Figure 13).

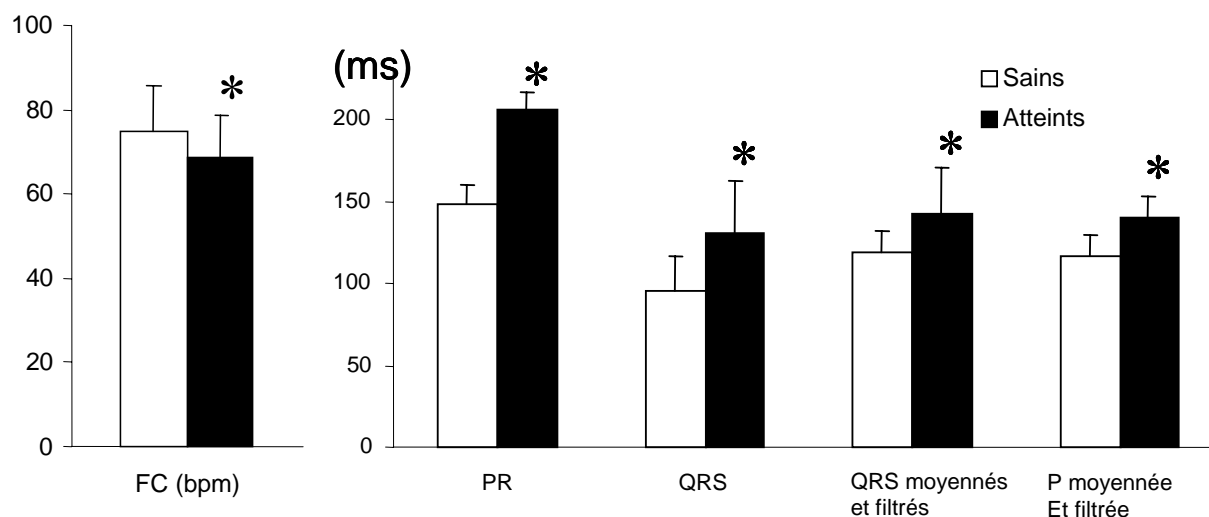


Figure 13 : Principales données cliniques et électrocardiographiques de la famille C.

L'atteinte électrocardiographique est de sévérité variable puisque par exemple le patient III.19 avait déjà un bloc de branche droit complet avec des QRS très larges à 57 ans ce qui a amené à l'implantation d'un pacemaker alors que le patient II.10 âgé de 74 ans n'avait qu'un hémibloc postérieur gauche avec une durée de QRS normale à 94 ms.

I.B.2.d.1. Evolution des troubles de la conduction au cours du temps.

Une des caractéristiques majeures des troubles de la conduction dans cette famille est l'aggravation progressive des anomalies électriques au cours du temps. Deux types de données montrent la progressivité des anomalies de la conduction avec l'âge.

Chez 5 patients, nous avons pu obtenir des ECG enregistrés sur une période allant de 11 à 16 ans. La durée du QRS augmente chez l'ensemble des sujets et la durée du PR augmente chez 4 d'entre eux (Tableau 1). Chez le patient III-31 l'évolution est particulièrement caractéristique (Figure 14).

Patient III-31

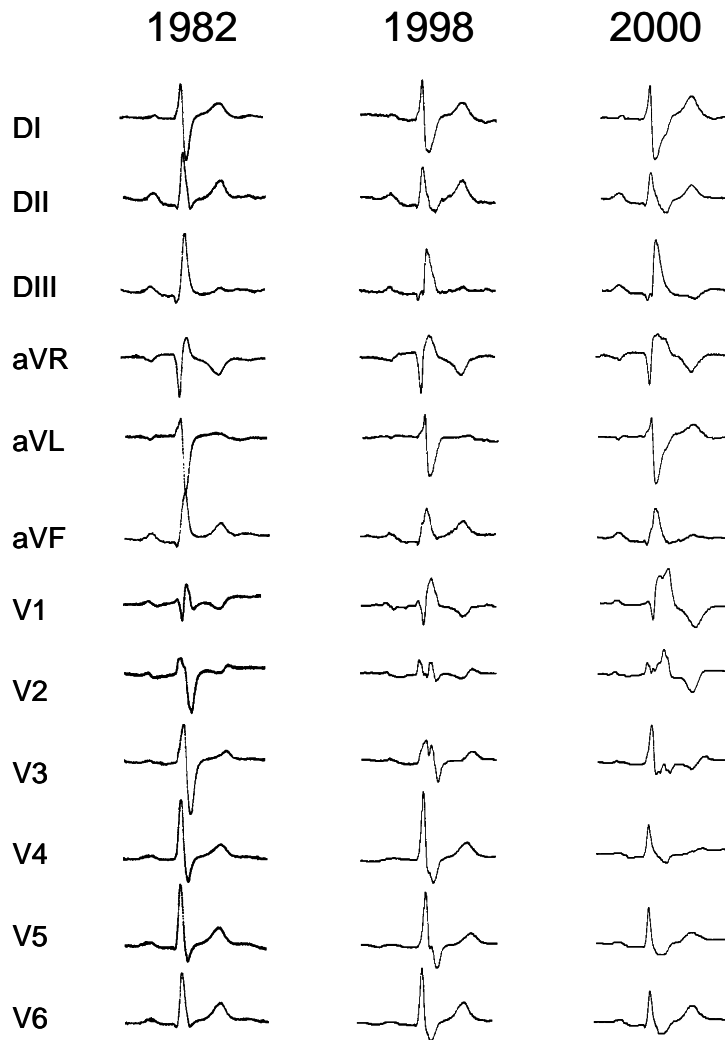


Figure 14 : Evolution caractéristique de l'ECG avec une aggravation progressive du bloc de branche droit.

	Année	PR (ms)	QRS (ms)	Année	PR (ms)	QRS (ms)
III-28	1987	240	160	1998	253	180
III-29	1982	220	130	1998	230	180
III-31	1982	200	130	2000	205	172
II-15	1986	200	150	1998	208	160
II-3	1985	200	160	1998	230	170
		212	146		225	172

Tableau 1 : Evolution des troubles de la conduction chez les patients pour lesquels plusieurs ECG enregistrés au cours du temps étaient disponibles.

L'âge des patients qui ont participé à l'étude variait de 15 à 81 ans. Afin d'évaluer l'évolution des paramètres ECG au cours du temps, nous avons réalisé un graphique montrant la durée des principaux paramètres ECG en fonction de l'âge.

Quel que soit l'âge, la durée de l'onde P moyennée, du PR et du QRS est supérieure chez les sujets atteints en comparaison des sujets sains. Pour l'onde P moyennée et le PR la pente d'évolution des courbes est comparable entre les deux groupes bien que les valeurs de ces deux paramètres soient plus élevées chez les sujets atteints. L'augmentation de la durée de l'onde P moyennée est de 0.37 ms par an chez les sujets sains contre 0.47 ms par an chez les sujets atteints. Pour le PR, l'augmentation est de 0.88 ms par an chez les sujets sains contre 0.60 ms par an chez les sujets atteints. Ces différences ne sont pas significatives. A l'inverse, la durée du QRS évolue différemment dans les deux groupes en fonction de l'âge. D'une manière générale, la progression de la durée du QRS est plus marquée chez les sujets atteints. Cependant, il existe également une variabilité en fonction de l'âge. La variance est significativement différente avant et après 40 ans (ratio variance test ; $p < 0.001$). Cette variabilité n'est pas retrouvée chez les sujets sains, ce qui montre une évolution différente entre les deux groupes en fonction de l'âge. Lorsque le sous-groupe des patients âgés de moins de 40 ans est considéré (7 patients atteints et 19 non-atteints) les paramètres de la conduction sont également prolongés chez les sujets atteints (durée de l'onde P: 132 ± 12 ms *versus* 115 ± 10 ms, $p=0.002$; PR: 179 ± 11 ms *versus* 140 ± 20 ms, $p < 0.00001$; et QRS: 116 ± 8 ms *versus* 92 ± 14 ms, $p=0.0001$). Ces résultats montrent les anomalies de la conduction sont déjà présentes chez les sujets les plus jeunes.

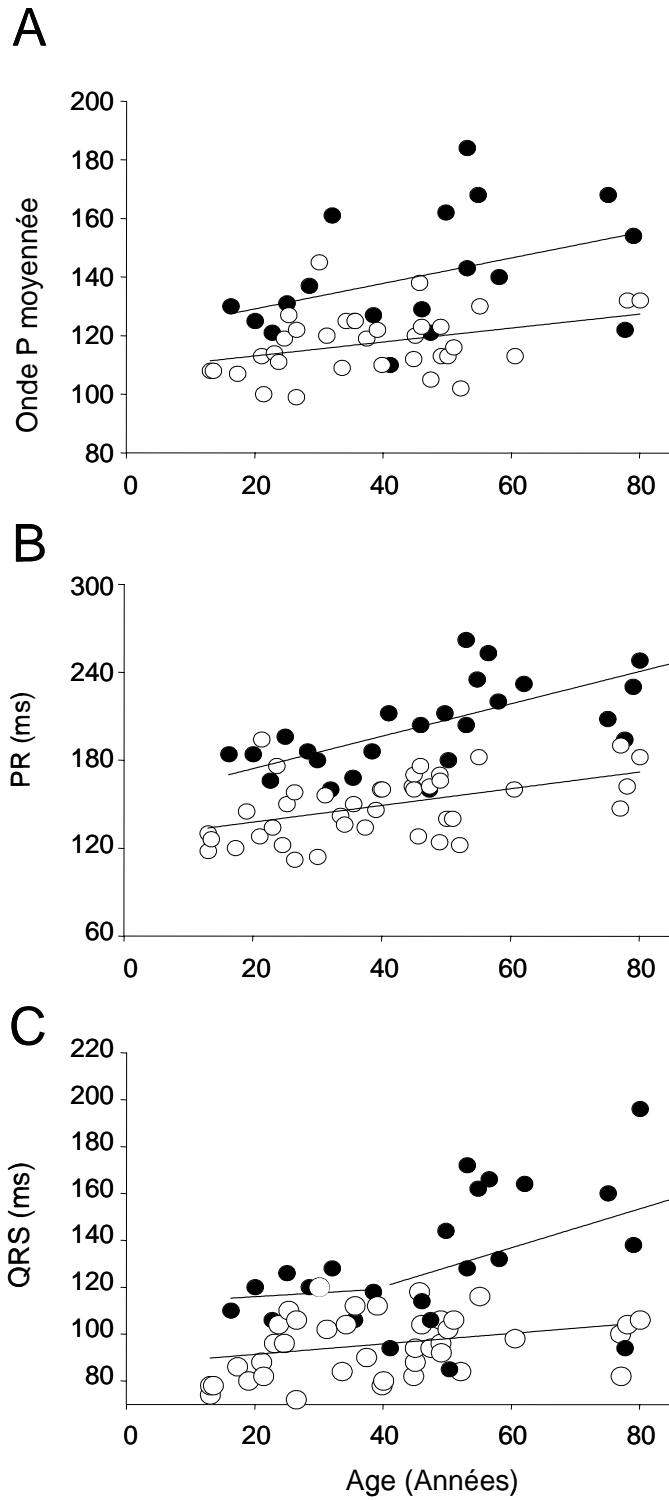


Figure 15 : Evolution des paramètres ECG au cours du temps dans la famille C. Les sujets sains sont représentés en blanc et les sujets atteints en noir.

I.B.2.e. Résumé des résultats.

Ce travail sur la famille C. montre que les troubles de la conduction dégénératifs peuvent être dus à une mutation du gène *SCN5A*.

La mutation du gène *SCN5A* identifiée chez les sujets atteints de la famille C est une mutation d'épissage, située au niveau de l'intron 22, qui donnerait une protéine anormale tronquée au niveau du segment S4 du domaine DIII. La mutation identifiée chez les sujets atteints de la petite famille hollandaise est une délétion d'un nucléotide entraînant un décalage du cadre de lecture et un codon STOP prématuré, tronquant la protéine à partir de la boucle S5-S6 du domaine IV. Ces mutations donneraient des canaux sodiques non fonctionnels qui seraient à l'origine d'une diminution de la vitesse de propagation de l'influx cardiaque et expliquerait ces troubles de conduction.

Dans la famille C. les troubles de conduction sont progressifs et d'apparition retardée alors que dans la famille hollandaise les troubles de conduction sont présents dès la naissance. Le phénotype pourrait donc se révéler à un âge différent en fonction du type de mutation et de ses conséquences fonctionnelles sur le canal sodique. Ces différences pourraient être également liées à de nombreux facteurs modulant la conduction de l'influx cardiaque dont des facteurs génétiques ou environnementaux (Kucera J. P. et al. 1998; Rohr S. et al. 1998; Shaw R. M. and Rudy Y. 1997).

L'étude de cette famille C. nous a permis de recueillir plusieurs arguments montrant l'aggravation progressive des troubles en particulier au niveau intra-ventriculaire aux cours du temps. L'augmentation de la durée des ondes P et du PR est similaire chez les sujets atteints et les sujets sains mais les QRS augmentent significativement plus vite chez les sujets atteints. De même, l'analyse de plusieurs électrocardiogrammes au cours du temps chez les sujets pour lesquels cet examen est disponible montrent une dégradation progressive des paramètres de la conduction avec un allongement du PR et du QRS. Cette aggravation progressive des troubles de la conduction avec le temps montre que plusieurs mécanismes sont impliqués.

Pour que les troubles de la conduction surviennent, il faut d'une part une haplo-insuffisance du canal sodique puisque, comme la moitié des canaux sodiques ne sont pas fonctionnel, il est probable que le courant sodique soit diminué de moitié, et d'autre part, un autre mécanisme lié à la sénescence (par exemple une fibrose de voies de conduction) qui va révéler le

troubles de la conduction. Nos données suggèrent que le deuxième mécanisme pourrait être physiologique car même chez les patients non-mutés les intervalles de conduction ont tendance à augmenter avec le temps, même si cette augmentation est plus faible que chez les sujets mutés.

Il est probable que chez les sujets mutés les plus jeunes, l'absence de 50% des canaux sodiques soit compensé par d'autres mécanismes (par exemple les canaux calciques) ce qui permet de garder une propagation de l'influx électrique satisfaisante bien que moins bonne que chez les sujets non-mutés. Les troubles de la conduction surviendraient lorsque ces mécanismes compensateurs seraient dépassés par l'apparition d'une diminution progressive de la qualité des voies de conduction par les mécanismes normaux de la sénescence.

I.B.3. Etude génétique et phénotypique dans la famille B.

I.B.3.a. Analyse phénotypique de la famille B.

C'est lors de l'hospitalisation d'un patient de 80 ans pour un bloc auriculo-ventriculaire complet dans le service de soins intensif de l'hôpital de Nantes que ce patient nous a signalé que deux membres de sa famille avaient déjà bénéficié de l'implantation d'un pacemaker. Cette découverte a été le point de départ de l'enquête génétique réalisé dans la famille B. Il s'agit d'une très grande famille puisqu'elle se compose d'environ 150 personnes. Nous avons pu ainsi examiner 90 personnes.

Six membres de la famille avaient bénéficié de l'implantation d'un pacemaker pour bloc auriculo-ventriculaire progressif. Les patients II-3, II-4 et II-5 étaient toujours vivants lors de l'étude de la famille alors que les patients II-1, II -12 et II-13 étaient décédés au moment de l'étude (Figure 16).

Les électrocardiogrammes enregistrés chez l'ensemble des autres membres de la famille ont montré que 7 autres individus avaient des anomalies importantes de la conduction. Ces anomalies étaient un bloc de branche droit chez 2 patients, un bloc de branche droit associé à un hémibloc antérieur gauche chez 3 patients, un hémibloc antérieur gauche chez 2 patients et un bloc pariétal chez 2 patients. Trois patients avaient un allongement de la durée du PR. Chez le patient II-3 qui était électroentraîné en permanence pour bloc auriculo-ventriculaire, il n'a pas été possible de déterminer quelles étaient les anomalies de la conduction à l'étage ventriculaire.

L'échocardiographie réalisée chez ces patients était dans les limites de la normale.

Sept autres membres de la famille avaient des anomalies mineures de la conduction qui incluait un bloc incomplet de la branche droite dans 5 cas et une déviation axiale gauche dans 2 cas.

Chez les 62 autres membres de la famille âgés de plus de 45 ans les paramètres électrocardiographiques étaient dans la limite de la normale. Les anomalies de la conduction ségrégeaient de manière autosomique dominante dans cette famille (Figure 16).

L'âge n'était pas significativement différent chez les membres atteints et non-atteints de la famille (68 +/-13 ans contre 61 +/-9 ans NS) de même, la fréquence cardiaque était identique dans les deux groupes (72+/-12 bpm contre 71+/-14 bpm NS). En revanche, la durée du PR (192+/-45 ms contre 158+/-22 ms ; $p < 0.0001$) et la durée du QRS (126+/-25 ms contre 87+/-10 ms $p < 0.0001$) étaient significativement plus longues chez les sujets atteints.

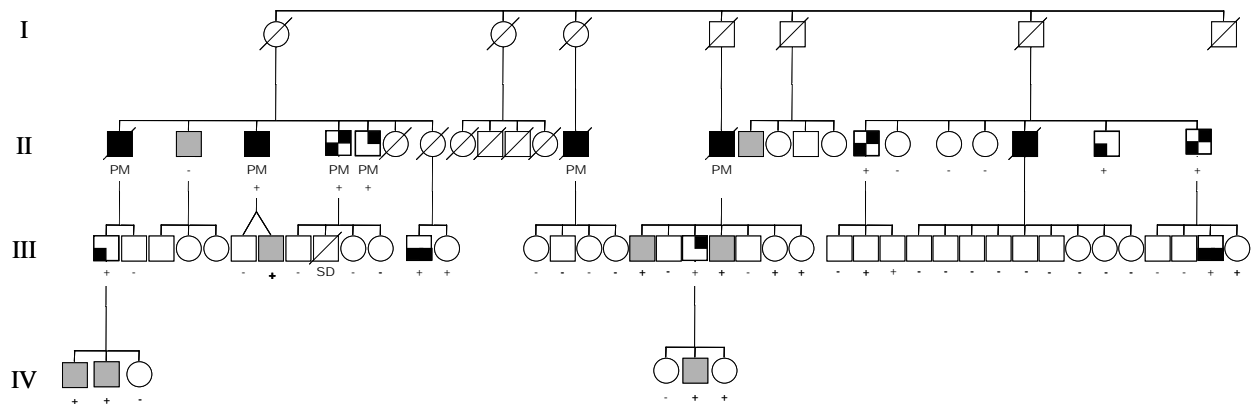






Figure 16 : Arbre généalogique de la famille B. Les patients représentés en noir sont atteints de troubles de la conduction mais sans que nous puissions connaître le type de troubles de la conduction intra-ventriculaire. Les patients en gris ont des anomalies mineures de la conduction. Le symbole  montre un bloc de la branche droite, le symbole  montre un bloc de la branche droite associé à un hémibloc antérieur gauche, le symbole  montre un hémibloc antérieur gauche, le symbole  montre un bloc pariétal. PM signifie pacemaker. Les patients marqués d'une croix sont porteurs de l'haplotype morbide sur le chromosome 16.

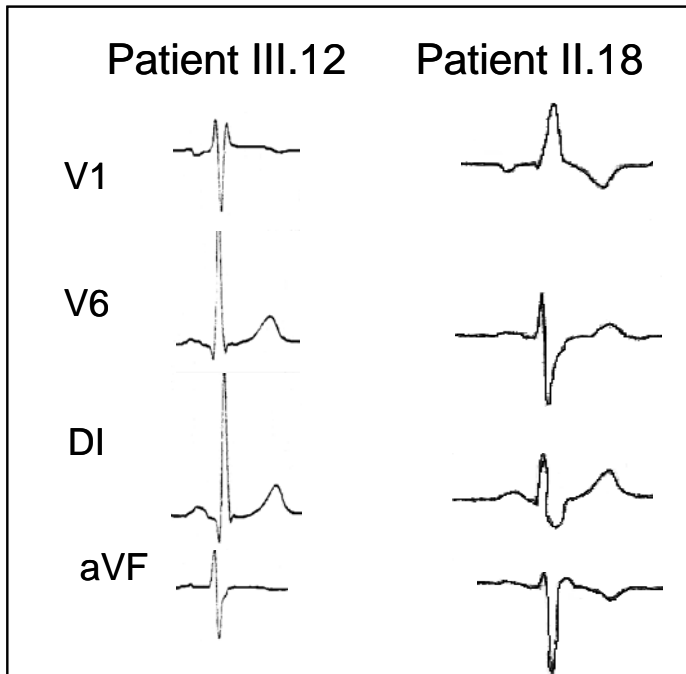


Figure 17: ECG caractéristiques dans la famille B.

I.B.3.b. Analyse génétique de la famille B.

Pour réaliser ces analyses de liaison génétique, considérant l'aspect progressif et la pénétrance incomplète de la maladie chez les sujets jeunes, seuls sept patients âgés de plus de 60 ans et ne présentant pas de troubles de conduction ont été considérés comme sains et ont été inclus dans l'analyse initiale.

Une approche gène candidat a permis d'exclure les deux premiers locus de troubles de conduction isolés en 19q13.3 et 3p21.1 (*SCN5A*), ou associés à d'autres maladies cardiaques ainsi que les différents locus des connexines cardiaques.

Une analyse de liaison sur l'ensemble du génome a ensuite été réalisée en utilisant les 400 marqueurs chromosomiques dinucléotidiques du Génethon espacés de 10 cM (ABI PRISM™ Linkage Mapping Set-MD10 version 2, PE Biosystem). L'analyse et la détermination du génotype ont été réalisées à l'aide des logiciels GENESCAN® et GENOTYPER®. Les tailles des allèles ont été comparées après normalisation à un échantillon d'ADN témoin (CEPH 1347-02). Les lod scores à deux points ont été calculés avec le logiciel LINKAGE® (version 5.2, Lathrop G.M. et Lalouel J.M. 1984). Les lod scores multipoint ont été calculés avec le logiciel

SIMWALK® (version 2). La pénétrance de la maladie a été fixée à 90 %. La fréquence de la maladie était supposée égale entre les deux sexes. La fréquence de l'allèle morbide a été fixée à 0,001 et les fréquences alléliques des microsatellites ont été obtenues à partir des banques de données.

Nous avons utilisé une technique particulière de regroupement des ADN qui a consisté à regrouper sept ADN de sujets atteints qui ont été amplifiés par PCR simultanément et analysés sur un gel de génotypage par comparaison à sept ADN de sujets sains de cette famille traités en parallèle de la même façon. Cette technique était basée sur le principe que l'allèle associé à la maladie devait être majoritaire chez le groupe de sujets atteints comparé au groupe de sujets sains et a permis de sélectionner initialement une cinquantaine de marqueurs génétiques potentiellement liés à la maladie. Le génotypage de ces marqueurs chez l'ensemble des membres de la famille nous a permis de trouver une liaison génétique pour les marqueurs D16S516 et D16S3091 avec des lod scores à 0 % de recombinaison de 4,21 et 6,82 respectivement. Le génotypage des marqueurs flanquant et une analyse de liaison multipoint (Figure 18) a permis de définir un intervalle de liaison de 19 cM en 16q23.3-16q24, entre les marqueurs D16S518 et D16S402 (kyndt F. et al. 2000) (Figure 19). L'analyse génétique sur l'ensemble des membres de la famille montre que tous les sujets considérés comme atteints partagent l'haplotype morbide. Sept membres de la famille considérés comme indéterminés partagent également cet haplotype, six étaient âgés de moins de 55 ans et le septième patient (patient II-14) avait uniquement une déviation axiale gauche. Huit membres de la famille considérés comme non-atteints avaient également l'haplotype morbide. Parmi eux, 7 avaient moins de 55 ans, un patient (III-13) était âgée 65 ans et avait un électrocardiogramme strictement normal. Il peut donc être considéré comme non pénétrant pour la maladie.

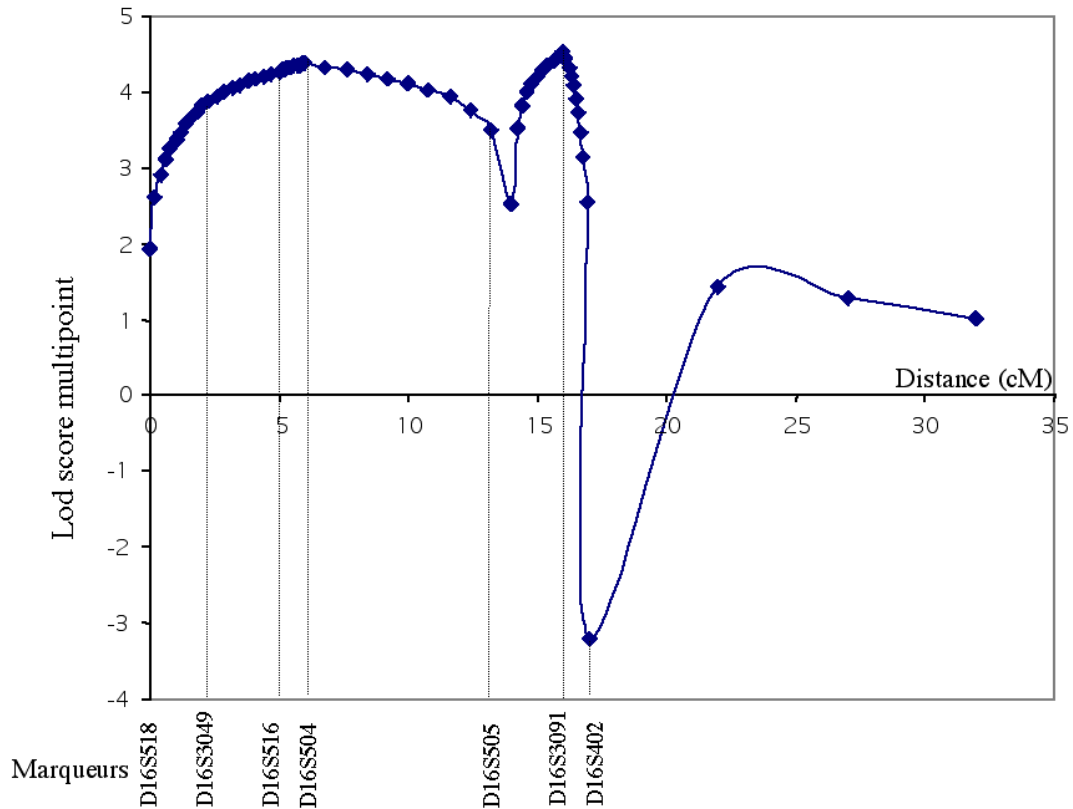


Figure 18: Locus de troubles de conduction progressifs sur le chromosome 16. Une analyse de liaison multipoint a été réalisée en comparant la ségrégation du phénotype et 7 marqueurs microsatellites. La distance séparant les marqueurs (en cM) est indiquée en abscisse et les valeurs de lod score sont indiquées en ordonnées.

De façon surprenante une des branches de cette famille présente des recombinaisons entre les marqueurs D16S3040 et D16S516, ainsi qu'entre les marqueurs D16S3040 et D16S3091. Il existerait donc trois petites régions potentiellement liées à la maladie. La reconstitution des haplotypes des parents de la première génération laisse penser que ces individus pourraient être apparentés, atteints tous les deux de la même maladie, et qu'ils auraient l'un et l'autre transmis l'allèle délétère. Une enquête généalogique ascendante n'a pas encore permis de trouver un lien de parenté entre ces deux individus, mais des arguments génétiques et démographiques suggèrent que ces individus puissent être apparentés de façon très éloignée.

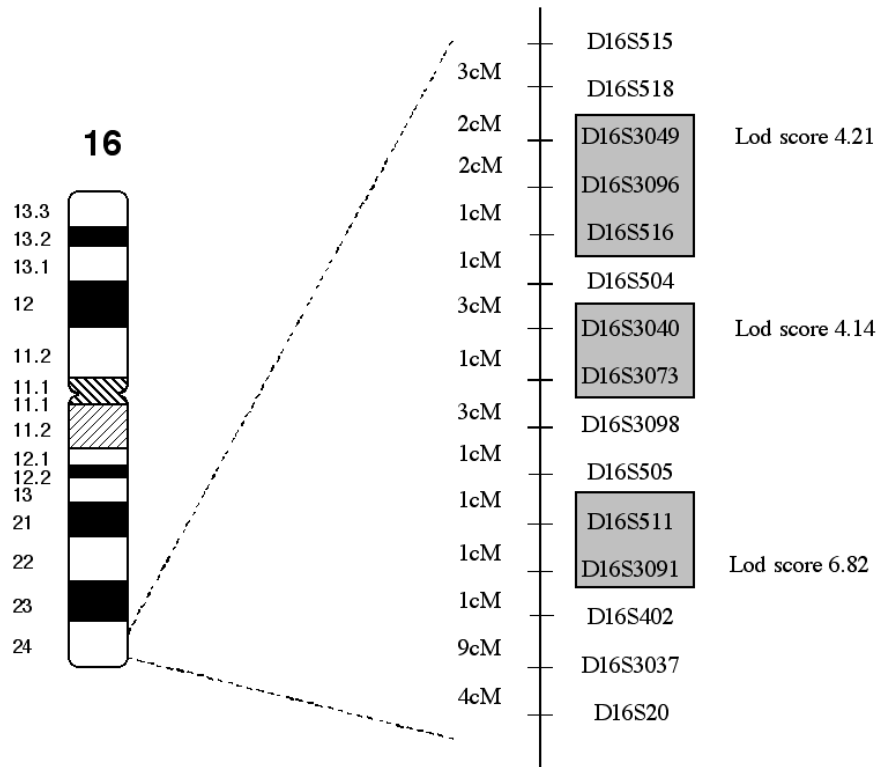


Figure 19: Représentation schématique du chromosome 16 et des marqueurs microsatellites utilisés pour l'analyse de liaison génétique ainsi que les distances génétiques séparant ces marqueurs. Des lod scores de 4,21, 4,14 et 6,82 ont été trouvés à 0% de recombinaison pour les marqueurs D16S3049, D16S3040 et D16S3091 respectivement. Les marqueurs encadrés représentent les marqueurs liés pour l'ensemble de la famille.

Plusieurs gènes potentiellement candidats sont situés dans l'intervalle de liaison génétique délimité par les marqueurs D16S518 et D16S402. Dans le cadre du séquençage du génome humain complet (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) de nombreuses séquences génomiques de cette région sont maintenant disponibles dans les banques de données sous formes de « contigs », mais il existe encore des zones non séquencées. Les régions codantes de trois gènes à expression cardiaque ont fait l'objet d'un séquençage direct : un gène codant une cadhérine cardiaque, un gène codant une oxydoreductase et un gène codant la phosphatidylinositol- phospholipase C gamma 2 (Figure 20). Pour cela des amorces situées dans les introns flanquant les régions codantes de ces gènes ont été choisies à partir des séquences

génomiques disponibles dans les banques de données, en utilisant un logiciel spécifique (Primer 3, Steve Rozen et Helen J. Skaletsky (1998) : http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

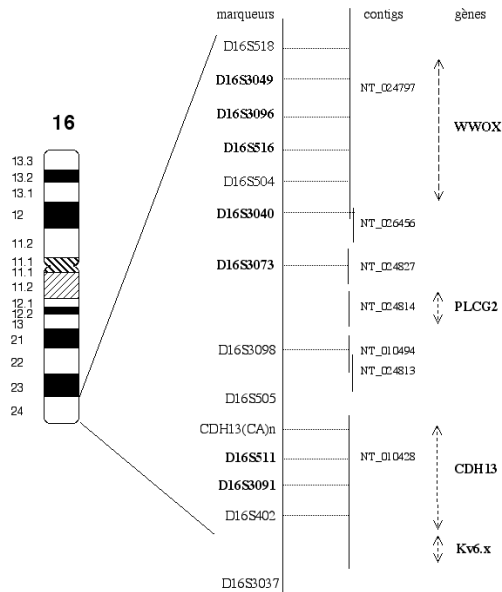


Figure 20: Représentation schématique de l'intervalle de liaison génétique du chromosome 16, montrant la position des marqueurs microsatellites utilisés, les contigs génomiques couvrant actuellement cette zone et la position des gènes testés.

Les sous-unités Kv6 sont des sous-unités régulatrices des canaux Kv. Elles ne génèrent pas de courant potassique fonctionnel lorsqu'elles sont exprimées seules mais sont capables de s'assembler avec d'autres sous-unités pour former des canaux hétéromultimériques fonctionnels et de moduler les propriétés électrophysiologiques de ces canaux.

Un gène codant un canal potassique de la famille Kv6 (*KCNGL1-like*) de 256 acides aminés était présent entre les marqueurs D16S402 et D16S3037. La technique de RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction) a permis de montrer que ce gène était exprimé dans le cœur. Nous avons identifié des répétitions dinucléotidiques (CA)_n polymorphes dans un des introns de ce gène mais ces répétitions ne ségrégeaient pas avec le phénotype dans la famille.

Le gène *WWOX*, localisé entre les marqueurs D16S518 et D16S3040, code une protéine de 414 acides aminés contenant deux domaines WW du côté amino-terminal et une région de

forte homologie avec la chaîne courte des enzymes de la famille déhydrogénase/reductase. Sa fonction est actuellement inconnue, mais il est exprimé dans le cœur et pourrait, par l'intermédiaire de ses domaines WW, interagir avec les canaux sodiques cardiaques, réguler leur densité à la surface cellulaire et par conséquent moduler l'excitabilité et la conduction cardiaque (Abriel H. et al. 2000; Harvey K. F. et al. 1999).

Le séquençage des régions codantes des neuf exons de ce gène n'a pas permis d'identifier de mutation.

Le gène *PLCG2* (Phospholipase C Gamma) est localisé en 16q24.1, entre les marqueurs D16S3073 et D16S3098. Il code une protéine de 1252 acides aminés exprimée dans le cœur.

Les phospholipases C sont des enzymes catalysant l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycerol (DAG). Cette famille de protéines comporte actuellement 11 isoformes différentes qui se différencient par leur structure, leur distribution tissulaire, leur mode d'activation et sont groupées en quatre sous-familles (α , β , γ et δ) (Rhee S. G. 2001).

Plusieurs hypothèses physiopathologiques ont permis de considérer ce gène comme un candidat potentiel.

La phospholipase C modulerait l'automatisme cardiaque par l'intermédiaire des phosphoinositols et du calcium: l'augmentation des niveaux intracellulaires d'IP₃, de D-myoinositol 1,4-biphosphate, D-myoinositol 1-phosphate et de calcium libre serait à l'origine d'une augmentation de l'automatisme cardiaque (Viamonte V. M. et al. 1990).

La deuxième hypothèse serait que des mutations du gène *PLCG2* pourraient provoquer des troubles de conduction par l'intermédiaire d'une désorganisation du cytosquelette d'actine, en altérant les densités ou les cinétiques des canaux ioniques cardiaques (Undrovins A. I. et al. 1998; Undrovins A. I. et al. 1995).

D'autre part la *PLCG2* pourrait intervenir dans l'ancrage dans la membrane plasmique des cadhérines. Certaines cadhérines sont fixées aux lipoprotéines de la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) et ce groupement peut être clivé par les phospholipases C phosphatidylinositol-spécifique (Niermann T. et al. 2000). Des anomalies de ces enzymes pourraient être à l'origine de perturbations de la distribution des cadhérines et des connexines au niveau des jonctions communicantes des cardiomyocytes.

Les 20 exons codants de ce gène ont été séquencés et aucune mutation n'a été trouvée.

Le gène codant la cadhérine 13 (*CDH13*) a expression cardiaque est localisé entre les marqueurs D16S505 et D16S3037. Il s'agit d'une protéine de 713 acides aminés, fortement exprimée au niveau du cœur et dont la fonction exacte n'est pas connue. Cependant, il a été montré que les cadhérines qui sont des glycoprotéines d'adhésion cellulaire dépendant du calcium participeraient à la formation des jonctions communicantes et moduleraient les fonctions des canaux jonctionnels (connexines).

Avant d'atteindre la membrane cellulaire, les connexines s'assemblent par groupes de six molécules pour former des structures tubulaires creuses appelées connexons. Cette oligomérisation survient au niveau d'un compartiment distal de l'appareil de Golgi. Les connexons sont ensuite transportés et incorporés dans les membranes cellulaires, et s'agrègent pour former les plaques jonctionnelles. Lorsqu'un contact intercellulaire est établi, les connexons d'une cellule qui constituent la moitié d'un canal s'alignent bout à bout avec ceux de la cellule voisine, établissant un canal hydrophile continu mettant en communication directe le cytoplasme des deux cellules. Les événements régulant le transport des connexons et leur agrégation au niveau des plaques jonctionnelles sont mal connus. Pour que les connexons d'une membrane cellulaire puissent s'aligner avec ceux d'une membrane cellulaire adjacente, ces membranes doivent être très proches l'une de l'autre et le transport et l'agrégation des connexons d'une cellule doivent être coordonnés avec des événements similaires se produisant dans la cellule adjacente. Il existerait donc des interactions entre les membranes des cellules adjacentes à travers l'espace extracellulaire. Bien que les molécules responsables de ces interactions n'aient pas été clairement identifiées, il semblerait que des molécules d'adhésion cellulaire telles que les cadhérines, jouent un rôle important dans la formation des jonctions communicantes (Fujimoto K. et al. 1997).

Des répétitions de dinucléotides (CA)_n polymorphes, présentes dans l'intron 1 du gène *CDH13* (*CDH13*(CA)_n), ont été testées sur l'ensemble de la famille et recombinent dans une des branches de cette famille. Les 14 exons de ce gène ont été séquencés et nous n'avons trouvé aucune mutation.

I.B.3.c. Evolution des paramètres de la conduction dans la famille B.

Dans le but d'évaluer la progression des troubles de la conduction avec l'âge, nous avons

comparé la progression de la durée du PR et du QRS chez les patients porteurs et non-porteurs de l'haplotype morbide.

Pour les sujets atteints, le coefficient de progression du PR en fonction de l'âge est de 1,11 ms/an avec un PR théorique à la naissance de 117,7 ms. Le coefficient de corrélation est de $R^2 = 0,33$. Pour les sujets sains le coefficient de progression du PR en fonction de l'âge est de 0,57 ms/an avec un PR théorique à la naissance 125,19 ms. Le coefficient de corrélation est de $R^2 = 0,10$ (Figure 21). Les coefficients de progression du PR en fonction de l'âge ne sont pas statistiquement significativement différents.

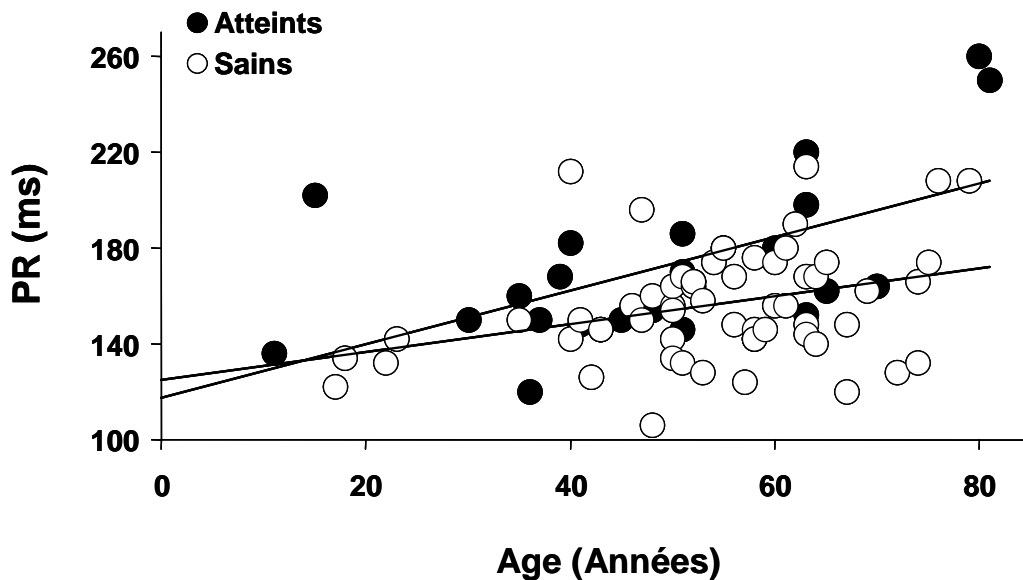


Figure 21 : Evolution de la durée du PR en fonction de l'âge dans la famille B. Les sujets non-porteurs de l'haplotype morbide sont représentés en blanc alors que les sujets porteurs sont représentés en noir.

Pour les sujets atteints, le coefficient de progression du QRS en fonction de l'âge est de 0,81 ms/an avec un QRS théorique à la naissance de 66,4 ms. Le coefficient de corrélation est de $R^2 = 0,33$. Pour les sujets sains le coefficient de progression du QRS en fonction de l'âge est de $-0,079$ ms/an avec un QRS théorique à la naissance 92,6 ms. Le coefficient de corrélation est de $R^2 = 0,0097$. Les coefficients de progression du QRS en fonction de l'âge sont statistiquement significativement différents.

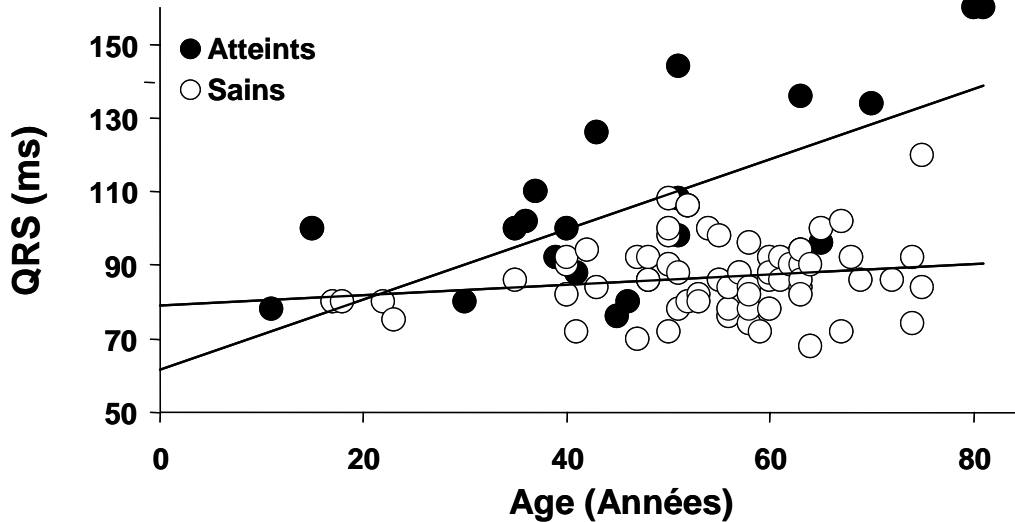


Figure 22 : Evolution de la durée du QRS en fonction de l'âge dans la famille B. Les sujets non-porteurs de l'haplotype morbide sont représentés en blanc alors que les sujets porteurs sont représentés en noir.

I.B.3.d. Résumé des résultats.

Ce travail sur la famille B a permis de mettre en évidence un nouveau locus de troubles de la conduction progressif. Ce locus est complexe puisque composé de trois petites zones liées séparées de deux zones non-liées. La reconstitution des haplotypes des parents de la première génération laisse penser que ces individus pourraient être apparentés et pourraient tous les deux avoir transmis l'allèle délétère. L'analyse gène-candidat que nous avons menée sur cette région ne nous a pas encore permis d'identifier le gène morbide dans cette famille. Cependant, l'analyse des relations génotype-phénotype montre que les troubles de la conduction sont progressifs et que la pathologie dont est atteinte cette famille est une forme typique de la maladie de Lenègre.

I.B.4. Etude phénotypique des familles Ch., G. et N.

Trois autres familles de taille plus modeste ont pu également être identifiées.

La famille Ch. comporte 40 membres incluant 15 patients cliniquement atteints (Figure 23). Dans cette famille, sept membres ont bénéficié de l'implantation d'un pacemaker. Les anomalies de la conduction étaient un bloc de branche droit dans 3 cas, un bloc de branche droit associé à un hémibloc antérieur gauche dans 10 cas et un bloc de branche gauche dans 1 cas. Un bloc pariétal a été retrouvé dans 1 cas. Six patients ont été considérés comme indéterminé car leurs électrocardiogrammes montraient un bloc incomplet de la branche droite (Figure 24).

La fréquence cardiaque était de 74 ± 18 bpm contre 66 ± 11 bpm (NS), le PR était de 186 ± 61 ms contre 145 ± 19 ms (NS) et le QRS était de 136 ± 23 ms contre 90 ± 7 ms ($p < 0.0001$).

Dans cette famille, une analyse de liaison a été réalisée mais elle n'a pas permis de mettre en évidence un locus morbide.

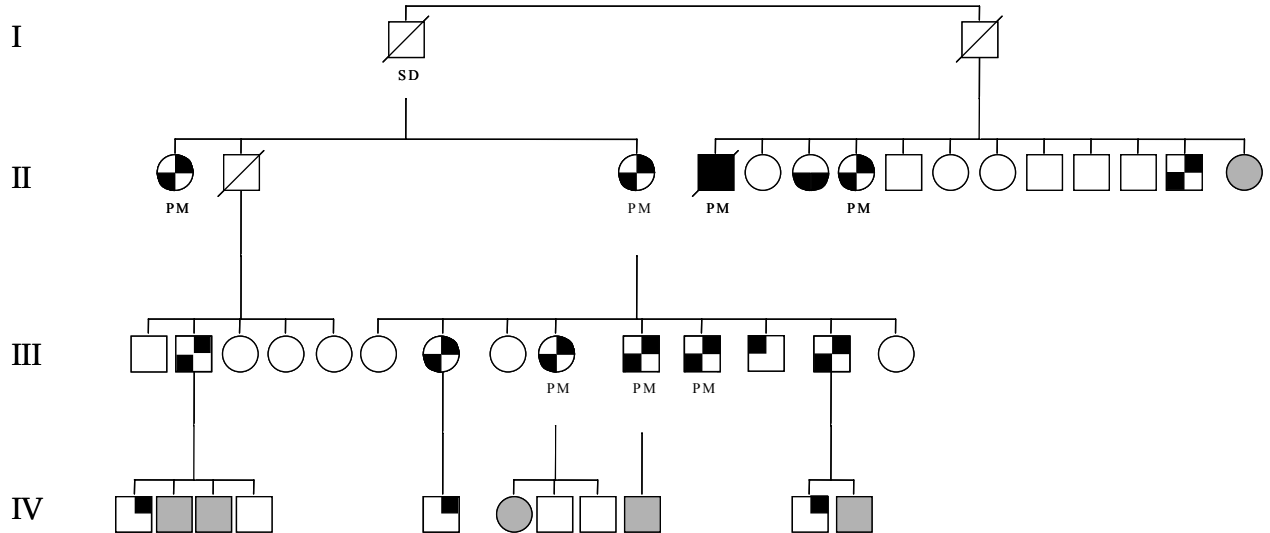


Figure 23 : Arbre généalogique dans la famille Ch montrant une transmission autosomique dominante des troubles de la conduction.

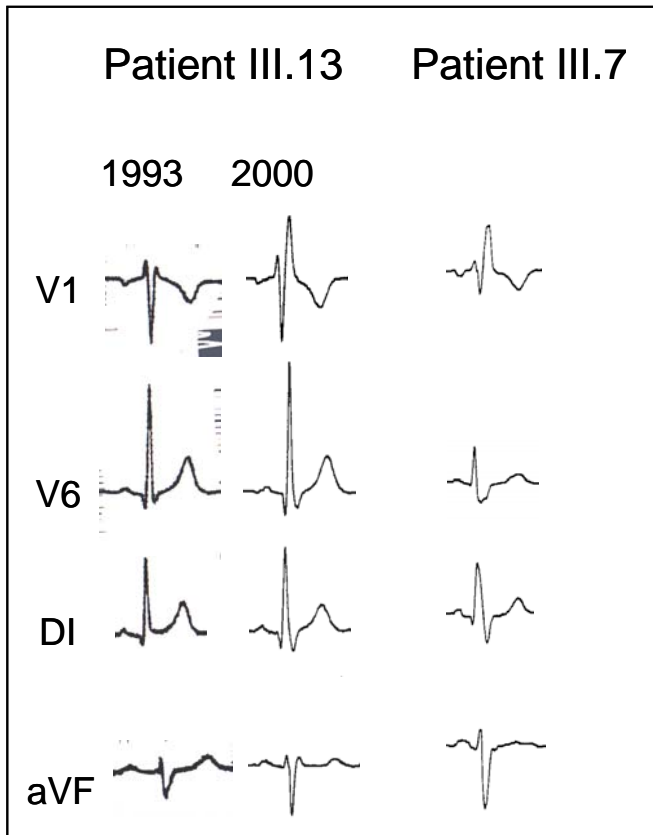


Figure 24 : Electrocardiogramme typique de la famille Ch montrant un aspect de bloc de branche droit associé avec un hémibloc antérieur gauche ainsi que la progression des troubles de la conduction au cours du temps.

La famille G se composait de 31 membres (**Figure 25**). Dix individus étaient atteints et 13 sains. Quatre patients ont bénéficié de l'implantation d'un pacemaker. Les anomalies de la conduction étaient un bloc de branche gauche dans 3 cas et un hémibloc antérieur gauche dans 7 cas.

La fréquence cardiaque était identique dans les deux groupes (61 ± 10 bpm chez les atteints contre 66 ± 11 bpm chez les sains). En revanche, la durée du PR (239 ± 43 ms contre 162 ± 22 ms $p < 0.001$) et la durée du QRS (131 ± 31 ms contre 91 ± 7 ms $p < 0.001$) étaient allongées chez les sujets atteints.

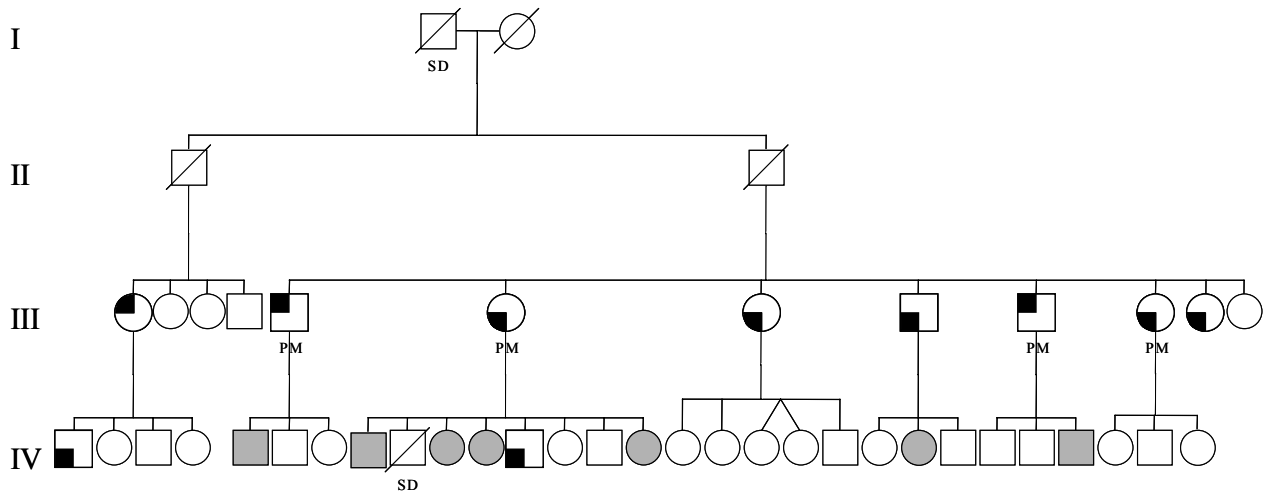







Figure 25 : Arbre généalogique de la famille G. Les patients en gris ont des anomalies mineures de la conduction. Le symbole  montre un bloc de la branche droite, le symbole  montre un bloc de la branche gauche, le symbole  montre un bloc de la branche droite associé à un héli-bloc antérieur gauche, le symbole  montre un héli-bloc antérieur gauche, le symbole  montre un bloc pariétal. PM signifie pacemaker.

La famille N se composait de 32 membres (Figure 26). Six membres étaient atteints et 17 étaient sains. Trois patients avaient bénéficié de l'implantation d'un pacemaker. Les troubles de la conduction étaient un bloc de branche droit dans 2 cas, un bloc pariétal dans 2 cas, et un hémibloc antérieur gauche dans 2 cas (Figure 27). La fréquence cardiaque (57 ± 8 bpm contre 65 ± 11 bpm) et la durée du PR (154 ± 18 ms contre 161 ± 18 ms) étaient similaires dans les deux groupes mais la durée du QRS était allongée chez les patients atteints (122 ± 26 ms contre 87 ± 11 ms $p < 0.001$).

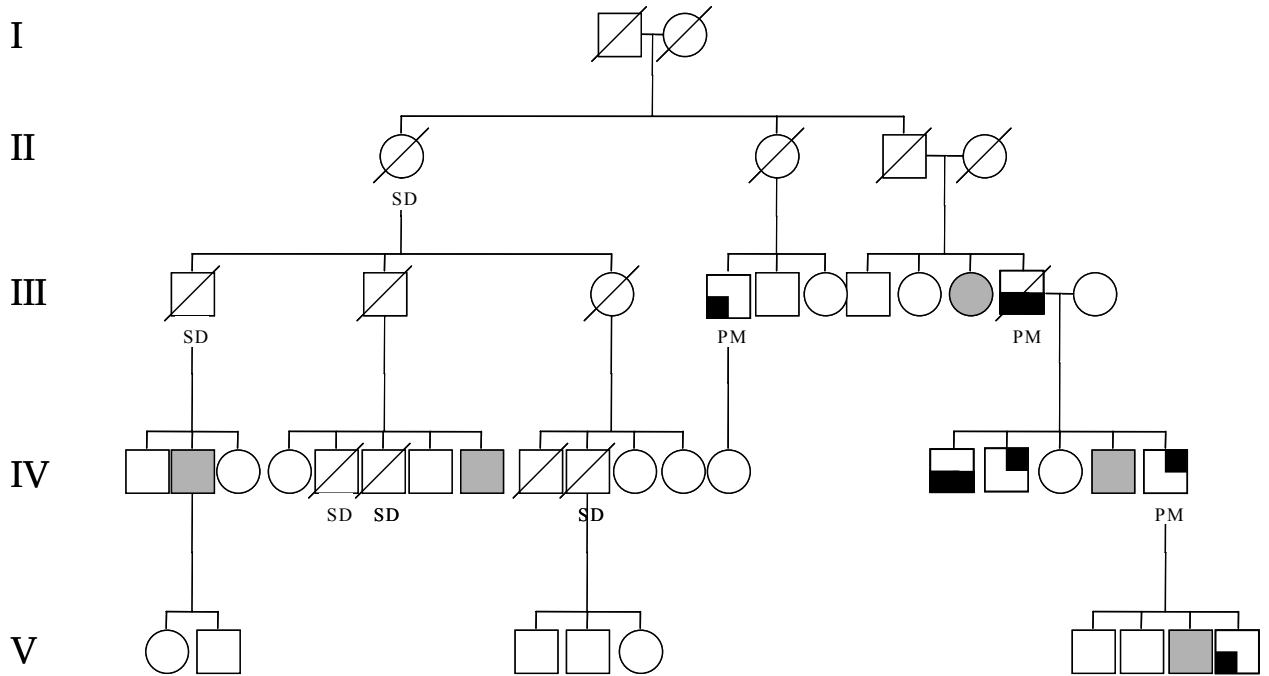







Figure 26 : Arbre généalogique de la famille N. Les patients en gris ont des anomalies mineures de la conduction. Le symbole  montre un bloc de la branche droite, le symbole  montre un bloc de la branche gauche, le symbole  montre un bloc de la branche droite associé à un héli-bloc antérieur gauche, le symbole  montre un un héli-bloc antérieur gauche, le symbole  montre un bloc pariétal. PM signifie pacemaker.

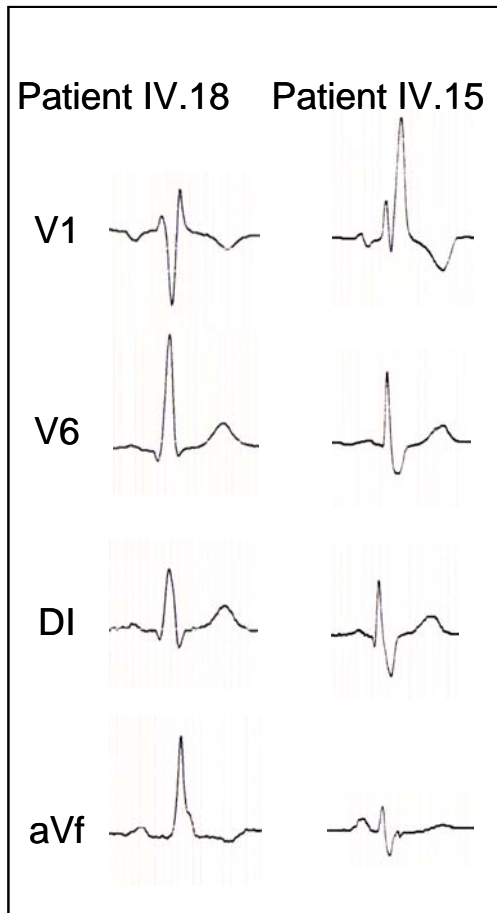


Figure 27 : ECG typiques dans la famille N montrant des blocs de branche droits.

La taille des familles G et N était insuffisante pour permettre la réalisation d'une analyse de liaison sur l'ensemble du génome mais nous avons pu éliminer les locus préalablement décrits.

I.B.4.a. Analyse globale des formes héréditaires de la maladie de Lenègre.

L'analyse du type de troubles de la conduction retrouvé dans ces différentes familles montre qu'en fonction de la famille considérée, les anomalies électrocardiographiques peuvent être spécifiques (Tableau 2).

En effet, si dans les familles B et C tous les types de troubles de la conduction peuvent être retrouvés, en revanche dans la famille G. on ne retrouve que des blocs de branche gauche ou les hémibloc antérieur gauche alors qu'à l'inverse dans la famille Ch, on retrouve essentiellement des blocs de branche droit associés à un hémibloc antérieur gauche.

Il est donc probable que les gènes responsables des troubles de la conduction dans ces familles puissent avoir une localisation spécifique dans les voies de conduction

	RBBB	RBBB+LAHB	RBBB+LPHB	LBBB	LHAB	LPHB	Parietal block	
Family C	4	0	4	3	0	1	8	20
Family B	2	3	0	0	2	0	2	9
Family Ch	3	10	0	1	0	0	1	15
Family G	0	0	0	3	7	0	0	10
Family N	2	0	0	0	2	0	2	6
	11	13	4	7	11	1	13	60

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des types de troubles de la conduction retrouvés dans les différentes familles.

I.B.4.b. Résumé des résultats :

Ce travail sur trois familles atteintes de troubles de la conduction dégénératifs progressifs non liés au locus préalablement décrit montre que la maladie de Lenègre est une maladie génétiquement hétérogène. Les raisons pour lesquelles nous ne sommes pas parvenu à identifier le locus morbide dans la famille Ch alors que cette famille a une taille apparemment suffisante peuvent être multiples. Tout d'abord, s'agissant d'une maladie fréquente dans la population générale, il est possible qu'un nombre anormalement important de phénocopie (patient atteint de la maladie mais non porteur du gène morbide) soit présent dans cette famille. Ce risque est pris en compte dans les analyses de lod-score mais le taux de phénocopie peut avoir été sous-estimé. A l'inverse, nous avons considéré pour ces analyses une pénétrance de la maladie de 90%. Ce taux de pénétrance est purement spéculatif et il est possible que ces valeurs puissent être variables en fonction du gène considéré. Une surestimation de la pénétrance pouvant conduire à écarter un locus potentiellement lié.

Afin de surmonter ces difficultés, il faut pouvoir identifier des familles de plus grandes tailles. Pour cela nous allons tenter d'identifier de nouvelles branches familiales à ces différentes familles. Dans ce but, nous allons contacter les patients implantés de pacemaker et provenant des mêmes régions géographiques que les familles préalablement identifiées. En effet, toutes ces familles sont issues de régions rurales dans lesquelles la mobilité géographique est faible. Les troubles de la conduction dont elles sont atteintes étant d'origine génétique, l'anomalie génétique

leur a été transmise par un ancêtre. Les populations de ces régions étant très sédentaires, il est probable que les troubles de la conduction dont sont atteints d'autres patients issus de ces régions puissent leurs avoir été transmis par le même ancêtre commun et avoir la même origine génétique.

I.B.5. Etude de prévalence des mutations du gène SCN5A dans les troubles de la conduction dégénératifs.

Il nous est apparu important d'évaluer la fréquence des mutations de *SCN5A* dans la survenue de troubles de la conduction dégénératif. Nous ainsi pu sélectionner 50 patients qui étaient atteints de troubles de la conduction dégénératifs ayant nécessité l'implantation d'un pacemaker. Tous ces patients ont donné leurs accords écrits pour participer à cette étude et cette étude a obtenu l'autorisation du CCPPRB de Nantes.

Une première analyse était effectuée par SSCP lorsqu'une bande anormale apparaissait, nous réalisons un séquençage de l'exon impliqué.

Sur les 50 premiers patients étudiés aucune mutation n'a été retrouvée. En revanche, nous avons montré la présence de plusieurs polymorphismes dont certains n'étaient pas connus jusqu'à présent. La liste des polymorphismes que nous avons retrouvés dans *SCN5A* est présentée (Tableau 3).

Le rôle de ces polymorphismes n'est actuellement pas connu cependant le données concernant par exemple le polymorphisme de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et l'hypertension artérielle nous permet de penser que ceux ci pourraient jouer un rôle dans la survenue de troubles de la conduction dégénératifs.

Ces premiers résultats montrent que les mutations dans le gène *SCN5A* ne peuvent probablement pas être considérées comme une cause fréquente de troubles de la conduction dégénératifs. Cependant, comme nous l'avons montré les troubles de la conduction dégénératifs sont génétiquement hétérogènes et il est donc possible que d'autres gènes soient plus fréquemment impliqués.

Exon	Polymorphismes
Exon 2	A29A
Exon 3	H118H
Exon 3	P119P
Exon 3	I120I
Exon 3	IVS 3-24 C-T
Exon 10	IVS 10-3 C-A
Exon 12A	H558R
Exon 12A	R558R
Exon 12A	H558H
Exon 12A	I529I
Exon 13	T632T
Exon 17B	E1061E
Exon 23	S1382Ile
Exon 24	IVS 24+26 C-T
Exon 24	IVS 24+28 C-T
Exon 24	IVS 24+32 G-T
Exon 24	IVS 24+53 C-T
Exon 28A	F1616F
Exon 28C	D1819D
Exon 28C	T1783T

Tableau 3 : Liste des polymorphismes retrouvés dans le gène SCN5A chez les patients implantés d'un pacemaker pour BAV dégénératif.

I.B.6. Approche d'épidémiologie.

Nous développons actuellement une approche de type épidémiologie génétique. Pour cela nous constituons un grand fichier regroupant les patients implantés d'un pace maker pour troubles de la conduction dégénératifs. Dans un deuxième temps, nous déterminons le lieu de naissance des patients inclus dans l'étude grâce à leur numéro de sécurité sociale. Nous évaluons ensuite la fréquence de la maladie dans chaque commune et nous nous intéressons ensuite aux communes qui ont le plus fort taux de la maladie. Nous émettons ensuite l'hypothèse que la fréquence anormalement élevée de la maladie dans ces communes peut être liée au fait qu'un

ancêtre commun très ancien a pu transmettre la maladie à sa descendance. Pour cette approche, il est nécessaire que la population soit peu mobile, ce qui est le cas habituellement dans notre région. Nous réalisons ensuite une enquête généalogique sur l'ensemble des patients atteints de la maladie étudiée et originaire de la région où la fréquence la maladie est élevée. Le but de cette enquête généalogique étant d'identifier l'ancêtre commun à l'ensemble des patients issus de cette région.

Cette approche apparaît d'autant plus prometteuse qu'elle s'adresse à des pathologies rares pour lesquelles le risque de phénocopies est faible.

Cependant, nous l'avons également appliqué aux troubles de la conduction dégénératifs. La carte présentée dans ce travail est incomplète car pour des raisons administratives, nous n'avons pu obtenir que les fichiers des patients implantés pour l'hôpital de Saint Nazaire, les nouvelles cliniques nantaise, le CHD de La Roche sur Yon et le CHU de Nantes. Cependant, cette carte montre une répartition géographique non aléatoire des implantations de stimulateurs cardiaques pour bloc auriculo-ventriculaire dans la région nantaise. A titre de référence, pour Nantes et Saint-Nazaire, les deux agglomérations principales du département, le nombre d'implantations de stimulateurs cardiaques pour 1000 habitants était respectivement de 1,54 (299 implantations / 195185 habitants) et 1,53 (59 implantations / 38350 habitants). Le taux d'implantation le plus élevé (23 pour 2867 habitants soit 8,02 pour 1000 habitants) était retrouvé dans la région R., une zone rurale constituée de 4 communes dans un cercle de 5 km de rayon (Figure 28).

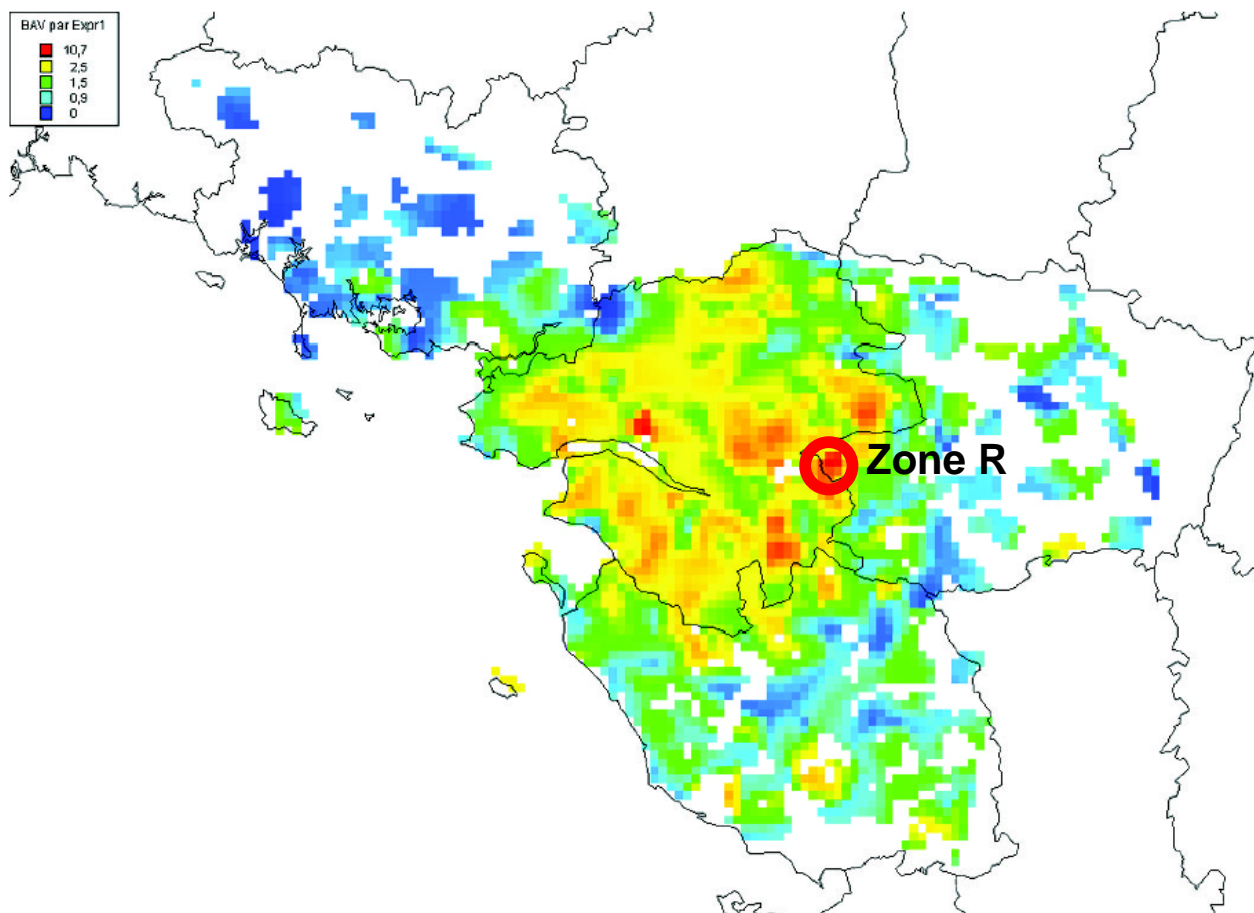


Figure 28 : Répartition de la fréquence des implantations de pacemaker pour BAV dégénératif dans la région nantaise évaluée grâce aux fichiers des patients implantés de pacemaker de l'hôpital de Saint Nazaire, des nouvelles cliniques nantaise, du CHD de La Roche sur Yon et du CHU de Nantes .

Notre approche n'ayant pas pour vocation de tracer une carte exhaustive de la fréquence des implantations dans la région mais d'identifier des zones de haute fréquence de la maladie, nous avons considéré ces résultats suffisamment intéressants pour justifier de focaliser nos investigations sur cette zone R. Nous avons donc réalisé une enquête familiale systématique à partir des cas index des patients implantés de pacemaker dans ces communes.

Les dossiers médicaux des 23 patients implantés natifs de la région R. ont été étudiés. Parmi eux, 19 patients avaient un bloc de conduction infra-hissien sans cardiopathie associée, 3 avaient un bloc de conduction nodal et 1 avait un bloc de conduction infra-hissien et un

rétrécissement aortique calcifié serré. Les 19 patients qui avaient un bloc de conduction infra-hissien isolé ont été sélectionnés comme propositus pour une enquête familiale. Douze d'entre eux étaient décédés avant le début de l'étude. Une enquête familiale a pu être réalisée chez les apparentés de 17 des 19 propositus sélectionnés, en raison du refus de deux d'entre eux de participer à l'étude.

Quatre vingt trois individus (45 femmes et 38 hommes), dont 5 des 19 propositus sélectionnés au départ et 78 apparentés à un de ces 19 propositus de départ ont été inclus dans l'étude. Parmi ces individus, 22 (8 femmes et 14 hommes) avaient un phénotype atteint, 52 (28 femmes et 24 hommes) un phénotype sain et 9 (4 femmes et 5 hommes) un phénotype douteux.

Au stade actuel de l'enquête généalogique, des liens de parenté ont été retrouvés entre 4 des propositus, et les 83 individus recrutés représentent 14 familles. Il n'a pas été retrouvé de lien de parenté entre ces 14 familles à 5 générations.

Parmi les familles de la région R., la famille Br. remplissait les critères d'informativité génétique et a été retenue pour la réalisation d'une analyse de liaison aux locus déjà identifiés et en cas d'exclusion de ces locus à l'échelle du génome entier.

La famille Br. telle que nous la connaissons actuellement est constituée de 3 noyaux familiaux dont le lien a été retrouvé par l'enquête généalogique en identifiant un couple d'ascendants communs nés vers 1810. Elle comporte 22 membres (9 femmes et 13 hommes), dont 8 individus phénotypiquement atteints (2 femmes et 6 hommes), 13 individus sains (6 femmes et 7 hommes) et 1 individu douteux (1 femme). Trois membres de la famille ont bénéficié de l'implantation d'un stimulateur cardiaque en raison d'une syncope ou d'une bradycardie sévère. Parmi les individus atteints, les troubles de conduction observés étaient un bloc de branche droit complet associé à un hémibloc antérieur gauche (2 patients), un bloc de branche droit incomplet associé à un hémibloc antérieur gauche (1 patient), un hémibloc antérieur gauche (3 patients), un bloc auriculo-ventriculaire du premier degré associé à un bloc de branche gauche complet (1 patient) et un bloc auriculo-ventriculaire complet avec complexes d'échappement ventriculaire larges (1 patient). La patiente phénotypiquement douteuse était âgée de 42 ans et avait un bloc de branche droit incomplet. Les autres individus avaient un électrocardiogramme dans les limites de la normale. Un membre de la famille décédé était atteint de maladie de Lenègre et était porteur d'un stimulateur cardiaque (**Figure 29**).

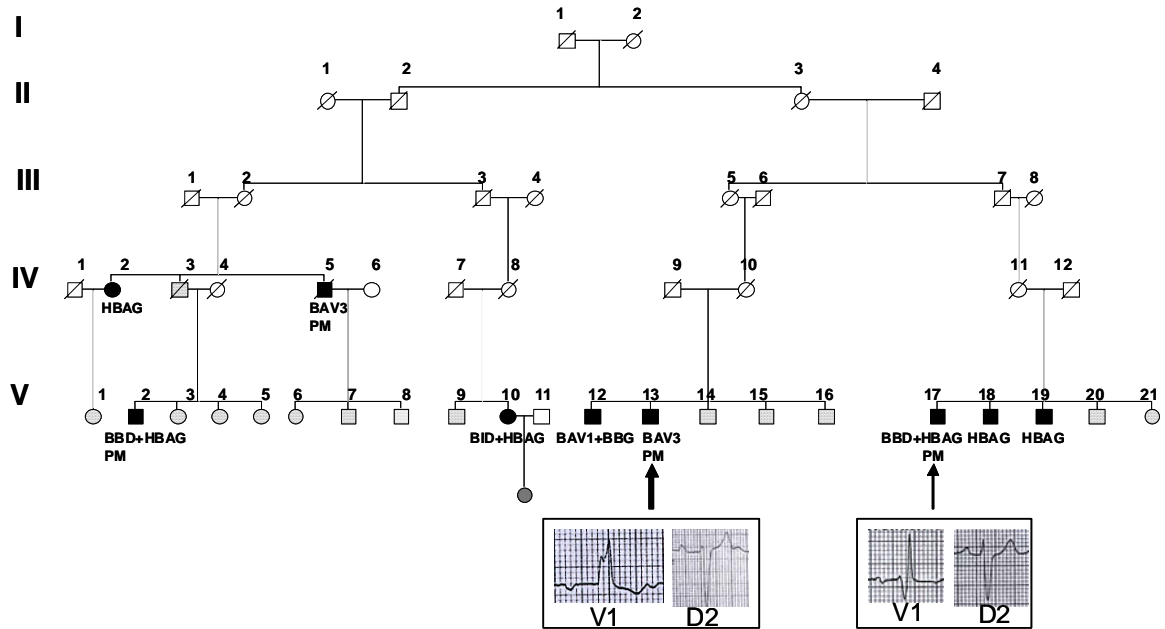


Figure 29 : Famille R identifiée grâce à une approche d'épidémiologie génétique.

La répartition des troubles de conduction dans la famille Br. était compatible avec un trait mendélien transmis sur le mode autosomique dominant. Les critères d'informativité génétique étaient satisfaits, puisque le Lod Score théorique maximal de la famille était de 3,49 pour un marqueur situé à 0 cM du gène recherché et pour une pénétrance de la maladie de 90%.

Les trois locus déjà identifiés de troubles de conduction isolés progressifs, en 19q13.2-13.3, 3p21.1 et 16q24, ont été exclus par analyse de liaison des marqueurs habituellement utilisés à ces locus.

Une analyse de liaison sur l'ensemble du génome a ensuite été entreprise et est actuellement en cours.

L'identification de cette grande famille par cette approche d'épidémiologie génétique permet donc de valider cette approche pour des pathologies fréquentes tel que les troubles de la conduction dégénératifs.

II. SYNDROME DE BRUGADA.

Les fibrillations ventriculaires seraient responsables de plus de 300 000 morts subites par an aux Etats-Unis et environ 70 000 en France (Kannel W. B. et al. 1987; Willich S. N. et al. 1987). La cause de loin la plus fréquente est la maladie athérosclérotique qui représente environ 80 % des cas. Les cardiomyopathies dilatées et hypertrophiques seraient la deuxième cause. La fibrillation ventriculaire resterait pourtant inexplicée chez 3 à 9 % des personnes (Viskin S. et al. 1990).

En 1981, le Centre de Contrôle et de Prévention des maladies des Etats-Unis avait recensé un nombre anormalement élevé de morts subites inexplicées parmi les réfugiés d'origine asiatique. Ces morts subites inattendues touchaient essentiellement les hommes jeunes (moyenne d'âge de 33 ans), apparemment sains, et se produisaient pendant le sommeil (Baron R. C. et al. 1983a; Baron R. C. et al. 1983b).

Ces morts subites inexplicées seraient fréquentes au Japon et en Asie du Sud (Nademanee K. 1997; Nademanee K. et al. 1997). Cette maladie est encore appelée le syndrome de mort subite et inattendue (SUDS: Sudden and Unexpected Death Syndrome) ou syndrome de mort subite inattendue nocturne (SUNDS: Sudden Unexpected Nocturnal Death Syndrome). Elles sont suffisamment fréquentes pour avoir un nom spécifique dans plusieurs pays « Lai Tai » en Thaïlande, « Bangungut » aux Philippines, et « Pokkuri » au Japon et pour influencer les traditions locales. Les morts subites touchant essentiellement les hommes pendant leur sommeil, il est de tradition, dans certains villages, que les hommes s'habillent en femmes la nuit, pour tromper la mort. Environ 40 % de ces patients auraient une histoire familiale de mort subite (Tatsanavivat P. et al. 1992). En Thaïlande, ce syndrome serait la cause naturelle majeure de mortalité des hommes jeunes et serait responsable de 26 à 38 décès pour 100 000 hommes entre 20 et 49 ans (Nademanee K. 1997).

Les morts subites dans ce syndrome sont dues à des tachycardies et des fibrillations ventriculaires. Ce syndrome serait probablement le même que le syndrome de Brugada (SB) car un aspect électrocardiographique compatible est retrouvé chez certains patients. Aucune anomalie n'est retrouvée lors des autopsies (Akai J. et al. 2000; Nademanee K. et al. 1997).

Dès le milieu du XX^{ème} siècle Osher et Wolff (1953) ont identifié un profil électrocardiographique particulier, comprenant un aspect de bloc de branche droit, un sus-décalage du segment ST et une inversion de l'onde T dans les dérivations précordiales droites chez des sujets asymptomatiques (Osher H. L. et al. 1953). En 1989, Martini B. et coll. ont retrouvé ce profil ECG particulier chez trois patients ayant fait des morts subites et suggéraient un lien possible entre ces anomalies de la repolarisation ventriculaire et les morts subites (Martini B. et al. 1989). Cependant, chez ces patients, une forme subclinique ou frustrée de cardiomyopathie du ventricule droit avait été suspectée. Le mérite revient aux frères Brugada d'avoir émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'une maladie cardiaque fonctionnelle et d'en avoir fait une description électrocardiographique précise à partir de huit patients ayant présenté une mort subite récupérée sur fibrillation ventriculaire idiopathique. Chez 4 des 8 patients décrits, une histoire familiale était suspectée (Brugada P. et al. 1992).

II.A. INTRODUCTION.

II.A.1. Critères électrocardiographiques diagnostiques.

Le syndrome de Brugada (SB) est une entité clinico-électrocardiographique. Les critères électrocardiographiques retenus pour le diagnostic positif, en particulier les modifications du segment ST et l'élévation du point J, étaient différents d'un auteur à l'autre jusqu'à l'élaboration d'un rapport de consensus publié en 2002 (Wilde A. A. et al. 2002).

Ainsi 3 types distincts de repolarisation sont décrits dans ce rapport (Figure 30) :

Type 1 : élévation du point J ≥ 2 mm avec un aspect convexe et descendant du segment ST et onde T inversée (« coved type») qui peut également être appelé triangulaire.

Type 2 : élévation du point J ≥ 2 mm avec un aspect en selle du segment ST, sus-décalage du segment ST ≥ 1 mm et onde T positive ou biphasique (« saddle back »).

Type 3 : élévation du point J ≥ 2 mm avec un aspect en selle du segment ST, sus-décalage du segment ST < 1 mm et onde T positive.

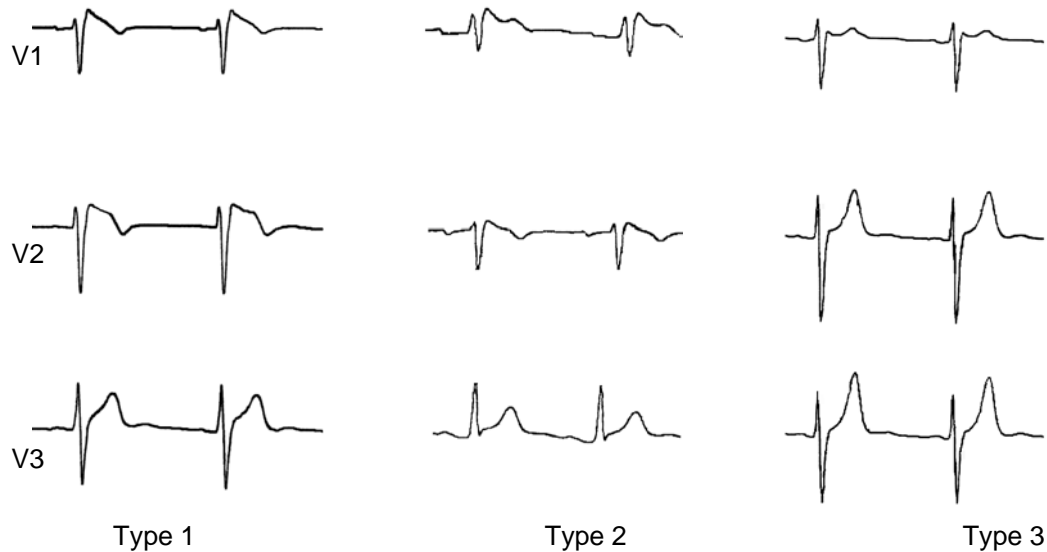


Figure 30 : Différent aspect électrocardiographique retrouvés dans le syndrome de Brugada.

Seule une repolarisation de type 1, présente sur au moins deux dérivations précordiales droites (V1, V2, V3), est considérée comme caractéristique d'un électrocardiogramme d'aspect Brugada.

Le terme de SB ne peut être associé à ce type d'ECG qu'en présence d'au moins un des critères suivants : fibrillation ventriculaire documentée, tachycardie ventriculaire polymorphe spontanément résolutive, histoire familiale de mort subite (âge < 45 ans), apparenté ayant un ECG avec une repolarisation de type 1, induction d'un trouble du rythme ventriculaire lors de la stimulation ventriculaire programmée, antécédent de syncope ou de respiration stertoreuse nocturne.

Ces modifications de la repolarisation s'accompagnent d'un aspect de bloc de branche droite le plus souvent incomplet. Cependant les anomalies typiques du bloc de branche droite, avec la présence d'une onde S dans les dérivations opposées, ne sont pas systématiques.

L'intervalle QT, généralement normal ($QTc < 440$ ms), peut être allongé (Bezzina C. et al. 1999; Brugada P. and Brugada J. 1992; Clancy C. E. et al. 2002).

Ces modifications de la repolarisation siègent le plus souvent dans les dérivations

précordiales droites (V1, V2, V3). Elles peuvent n'être présentes que dans les dérivations précordiales hautes, un espace intercostal au-dessus de V1 et V2 (Sangwatanaroj S. et al. 2001; Takagi M. et al. 2002) ou inférieures en D2, D3, AVF (Potet F. et al. 2003; Takagi M. et al. 2000), dérivations cependant non retenues dans le rapport de consensus (Figure 31 et Figure 32). Devant une suspicion de SB ainsi qu'au cours des enquêtes familiales, l'enregistrement des dérivations précordiales hautes doit être systématique. L'étude de ces dérivations augmente la puissance diagnostique de l'ECG (Sangwatanaroj S. et al. 2001). Des techniques électrocardiographiques de type cartographie de surface, avec enregistrement simultané de 120 dérivations, pourraient aussi améliorer la sensibilité diagnostique et permettre une analyse quantitative plus rigoureuse par la mesure automatisée de la durée de l'intervalle QRS et du sus-décalage du segment ST (Bruns H. J. et al. 2002; Shimizu W. et al. 2000b).

L'aspect électrocardiographique typique est parfois absent : l'ECG de base peut être fluctuant dans le temps, voire normal en permanence. Les modifications de la repolarisation peuvent apparaître ou se majorer avant ou après un épisode rythmique (Matsuo K. et al. 1998). Ces modifications peuvent aussi être induites par certains agents pharmacologiques ayant une action de bloqueurs des canaux sodiques dont : les antiarythmiques de classe I, les antidépresseurs tricycliques type amitriptyline (Rouleau F. et al. 2001), les neuroleptiques phénothiaziniques mais également des variations de la glycémie induite par la prise de sucre (Nishizaki M. et al. 2003) (Figure 31 et Figure 32).

Les antiarythmiques de classe I sont maintenant utilisés couramment à titre diagnostique pour démasquer le SB.

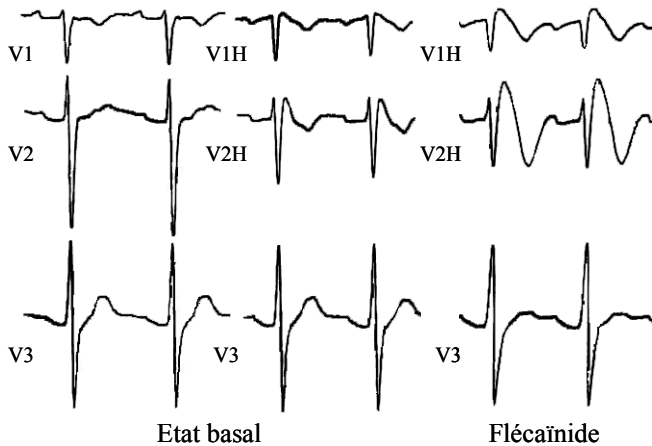


Figure 31 : Aspect électrocardiographique typique d'un syndrome de Brugada bien visualisé dans les dérivations précordiales hautes et majorées après injection de Flécaïvide.

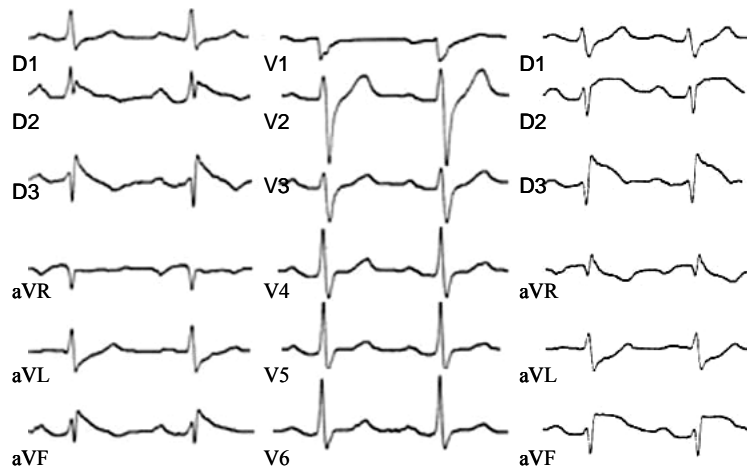


Figure 32 : Aspect électrocardiographique de syndrome de Brugada dans les dérivations inférieures majoré après injection de Flécaïvide.

D'autres anomalies électriques peuvent être associées comme une fibrillation auriculaire (Eckardt L. et al. 2001b; Itoh H. et al. 2001; Morita H. et al. 2002) ou une tachycardie supraventriculaire par réentrée intra-nodale ou en rapport avec une voie accessoire, type syndrome de Wolff-Parkinson-White (Eckardt L. et al. 2001a). Les troubles du rythme auriculaire seraient prédictifs du risque rythmique (Bordachar P. et al. 2004).

II.A.2. Données épidémiologiques et cliniques.

La variabilité des aspects électrocardiographiques et l'absence de consensus concernant les critères diagnostiques jusqu'en 2002 expliquent, en partie, les différences de prévalence du SB. Dans une population préjugée saine, la prévalence varie de 0,05 à 0,15 % (Hermida J. S. et al. 2000; Matsuo K. et al. 2001; Miyasaka Y. et al. 2001). Ce syndrome serait responsable de 40 à 60 % des fibrillations ventriculaires idiopathiques pour les uns mais seulement de 3 à 24 % pour les autres (Chen Q. et al. 1998; Remme C. A. et al. 2001).

Les principales données épidémiologiques sont issues de registres élaborés par différentes équipes mondiales (Alings M. et al. 1999; Atarashi H. et al. 2001; Brugada J. et al. 2002; Matsuo K. et al. 2001; Priori S. G. et al. 2002a) (Tableau 4). L'atteinte prédomine chez les sujets de sexe masculin (75 à 95 % des cas selon les études), de race blanche ou asiatique, et se révèle dans la 3^{ème} ou 4^{ème} décennie.

Une histoire familiale de mort subite, fibrillation ventriculaire documentée ou syncope est retrouvée dans 20 à 35 % des cas.

Selon les auteurs, 25 à 64 % des patients atteints sont symptomatiques. Les événements rythmiques, tachycardie ventriculaire polymorphe ou fibrillation ventriculaire, sont parfois résolutifs spontanément (Gussak I. et al. 1999). Ils sont plus fréquents au repos et pendant le sommeil (Matsuo K. et al. 1999). Ils se traduisent par des troubles de conscience qui vont des malaises lipothymiques à la syncope voire à la mort subite. La fréquence des symptômes est difficile à évaluer car initialement seuls les patients les plus sévèrement symptomatiques étaient identifiés ce qui avait fait considérer le SB comme une pathologie dont le risque létal était très élevé. Actuellement, les dernières données concernant plus de patients asymptomatiques identifiés lors de la réalisation d'un ECG systématique ou au cours d'une enquête familiale montre que la gravité du SB a probablement été initialement sur-évaluée.

Bien que les données épidémiologiques soient incomplètes, la conduite à tenir sur le plan thérapeutique commence à être codifiée. Ce sont les études de grandes cohortes de patients de Brugada et al. et de Priori et al. qui ont permis d'identifier les facteurs prédictifs de survenue de troubles du rythme et donc de risque de syncope ou mort subite (Brugada P. et al. 2003; Priori S.

G. et al. 2002a). En l'absence de traitement médical efficace, l'implantation d'un défibrillateur implantable est indiquée chez les sujets symptomatiques et ceux asymptomatiques dont l'ECG de base est anormal et la stimulation ventriculaire programmée positive. La valeur prédictive de la stimulation ventriculaire programmée reste cependant discutée. Actuellement, la place d'un traitement à base de quinidine reste discuté mais une étude semble montrer que ce traitement pourrait diminuer le risque de survenue de trouble du rythme (Alings M. et al. 2001; Hermida J. S. et al. 2004).

	Brugada et al. Circ 2002	Brugada et al. Circ 2003	Priori et al. Circ 2002
No. (Homme)	334 (255)	547 (408)	200 (152)
Index (Homme)		294	130 (110)
Mort subite	71	0	22
Syncope	73	124	34
Asymptomatique	190	423	144
Age lors du diagnostic	42±16	41±15	41±18
Aspect de Brugada			
Spontanément	234 (70%)	391 (71%)	90 (51%)
Après Class I	100 (30%)	156 (29%)	86 (49%)
Histoire familiale de mort subite	180 of 334 (54%)	302 of 547 (55%)	26 of 130 (22%)
Aborted SCD	23 (38%)	0	na
Syncope	26 (39%)	na	na
Asymptomatic	131 (72%)	na	na

Tableau 4 : Caractéristiques démographiques et cliniques des patients atteints de syndrome de Brugada d'après les données de la littérature.

Différentes atteintes cardiaques peuvent s'accompagner de modifications électrocardiographiques proches de ce qui est enregistré en cas SB. Il peut s'agir d'atteintes myocardiques et en particulier de la dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) (Corrado D. et al. 2001), d'une myocardite, d'une ischémie myocardique par thrombose coronaire et/ou vasospasme ou d'une compression extrinsèque de type tumorale (Buob A. et al. 2003; Tarin N. et al. 1999). La frontière entre DAVD et SB est parfois discutée. Le diagnostic de DAVD est essentiellement anatomo-pathologique. Des critères pour différencier ces 2 entités ont été proposés dans le rapport de consensus de la Société Européenne de Cardiologie (Wilde A. A. et al. 2002). Des atteintes péricardiques sont également décrites (Tomcsanyi J. et al. 2002).

Des anomalies du bilan ionique, en particulier les hyperkaliémies, les hypercalcémies ou une insuffisance rénale sévère peuvent également être responsables d'anomalies mimant l'aspect de SB (Douglas P. S. et al. 1984; Levine H. D. et al. 1956; Ortega-Carnicer J. et al. 2002). De même des intoxications médicamenteuses (phénothiazine, fluoxétine, amytriptyline) peuvent entraîner des aspects proches de ce qui est retrouvé dans le SB alors qu'un test à l'Ajmaline n'avait pas révélé de SB chez ces patients (Rouleau F. et al. 2001). Les même anomalies peuvent être retrouvées au cours d'une intoxication à la cocaïne (Ortega-Carnicer J. et al. 2001). Enfin, un aspect de repolarisation précoce noté chez certains athlètes peut aussi être confondu avec un tracé ECG de type Brugada, mais le sus-décalage du segment ST est généralement moins marqué (Bianco M. et al. 2001).

II.A.3.

Mécanismes physiopathologiques.

II.A.3.a. Courants ioniques et potentiel d'action.

Les mécanismes électrophysiologiques sont imparfaitement connus et ceux décrits actuellement restent hypothétiques. L'aspect du segment ST à l'ECG de surface dépend principalement des phases 1 et 2 et partiellement 0 du potentiel d'action. La phase 1, de repolarisation rapide, met en jeu un courant entrant de type calcique et sodique, auquel s'oppose un courant transitoire sortant (Ito ou transient-outward), de type potassique et chlorure calcium-dépendant (Figure 33).

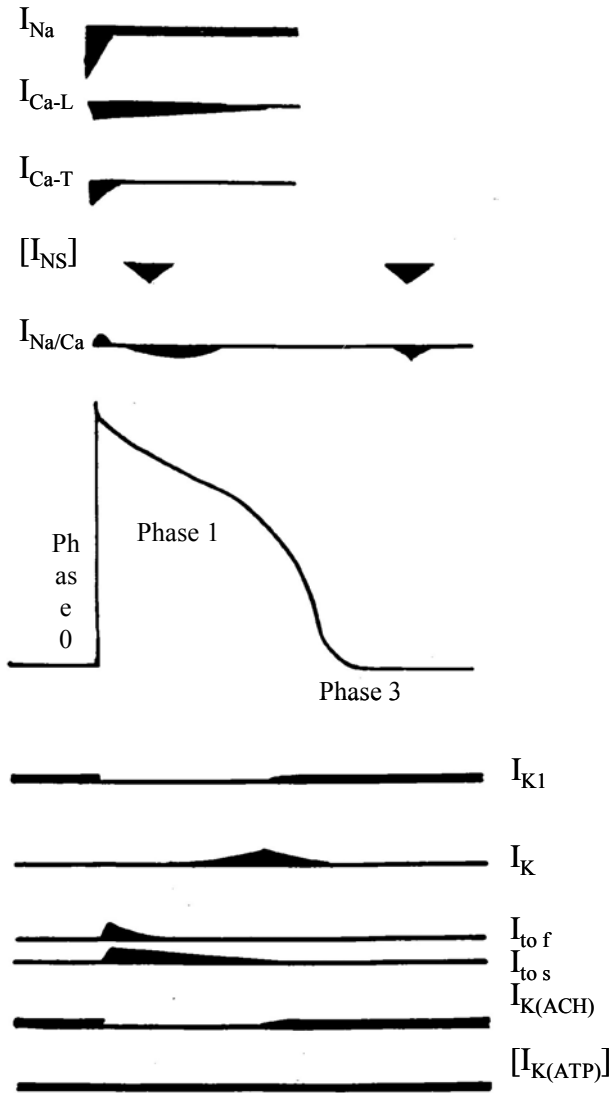


Figure 33 : Courant ionique intervenant pendant le potentiel d'action.

II.A.3.b. Théorie d'Antzelevitch et al.

Dans les cellules de la paroi ventriculaire la densité du courant Ito est plus importante dans l'épicaire que dans l'endocarde, en particulier dans l'épicaire du ventricule droit (Di Diego J. M. et al. 1996; Yan G. X. et al. 2003). Ainsi la phase 1 du potentiel d'action épicaire est caractérisée par une prépondérance du courant sortant (Ito) par rapport au courant entrant

(principalement calcique). Ce déséquilibre de la balance entre les courants entrant et sortant se traduit sur le potentiel d'action épicaordique par une encoche (« notch »). La phase 1 du potentiel d'action épicaordique est suivie d'un dôme, d'où la dénomination « spike-and-dome ». L'hétérogénéité spatiale de repolarisation crée un gradient transmural à l'origine du point J sur l'ECG de surface.

Dans des conditions physiologiques : le point J est quasiment inexistant sur l'ECG de surface en raison de la prépondérance du potentiel d'action ventriculaire gauche (densité moindre de courant Ito) par rapport au droit.

Dans des conditions pathologiques : l'encoche du potentiel d'action épicaordique peut être plus marquée, on note alors une élévation du point J et du segment ST à l'ECG de surface. Chez l'homme cette accentuation du point J a été décrite dans l'hypothermie (onde d'Osborn), et l'hypercalcémie. Ces 2 situations pourraient conduire à un déséquilibre de la balance entre les courants entrant et sortant lors de la phase I de repolarisation, au profit du courant sortant. L'hypothermie induirait une activation plus lente des canaux calciques par rapport aux canaux potassiques, alors que l'hypercalcémie favoriserait l'inactivation plus rapide du courant calcique.

L'équipe d'Antzelevitch a pu reproduire expérimentalement chez le chien les conditions du SB (Yan G. X. et al. 1999). L'activation des canaux potassiques impliqués dans le courant Ito par du pinacidil induisait un déséquilibre de la balance entre les courants, au profit du courant sortant, avec une accentuation de l'encoche mais une perte du dôme du potentiel d'action épicaordique et une surélévation du point J et du segment ST. L'inhibition de ces mêmes canaux potassiques permettait une atténuation de l'encoche et une restauration du dôme du potentiel d'action épicaordique. Cette inhibition peut être directe par des agents type la 4-aminopyridine.

Le système nerveux autonome influençait aussi la repolarisation. Ainsi l'acétylcholine, probablement par blocage du courant calcique et stimulation du courant potassique I_{k-ATP} , facilitait l'accentuation de l'encoche et l'atténuation du dôme du potentiel d'action. Au contraire, l'atropine mais aussi l'isoprénaline (augmentation du courant calcique) permettaient une restauration du dôme et une normalisation du segment ST à l'ECG de surface.

Le courant Ito est plus marqué chez l'homme que la femme. La densité des canaux est plus importante et la vitesse d'inactivation plus lente chez l'homme, en particulier dans le

ventricule droit (Di Diego J. M. et al. 2002). Cette prépondérance du courant Ito chez le sujet de sexe masculin serait une des raisons de la prédominance masculine du syndrome.

Les modifications de la repolarisation dans le SB concernent le segment ST mais aussi l'onde T :

Si la repolarisation des cellules épicrodiques précède celle des cellules M et endocardiqlues alors l'onde T reste positive et le segment ST a un aspect en selle.

Si l'encoche à la phase I du potentiel d'action épicrodique est très marquée le potentiel d'action épicrodique se prolonge. Il existe alors une inversion du gradient de voltage transmembranaire et du vecteur de repolarisation, le segment ST est en dôme avec une onde T négative (Yan G. X. and Antzelevitch C. 1999) (Figure 34).

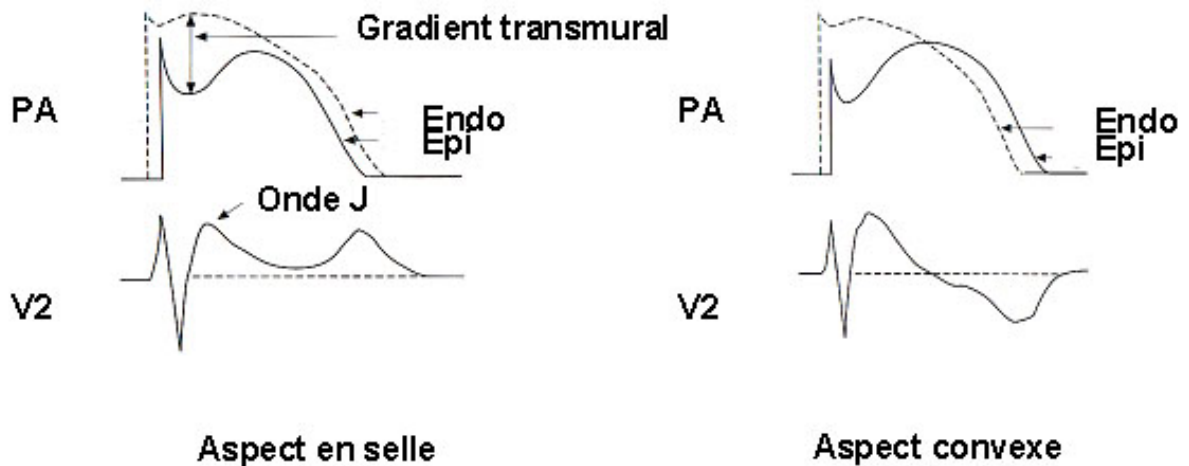
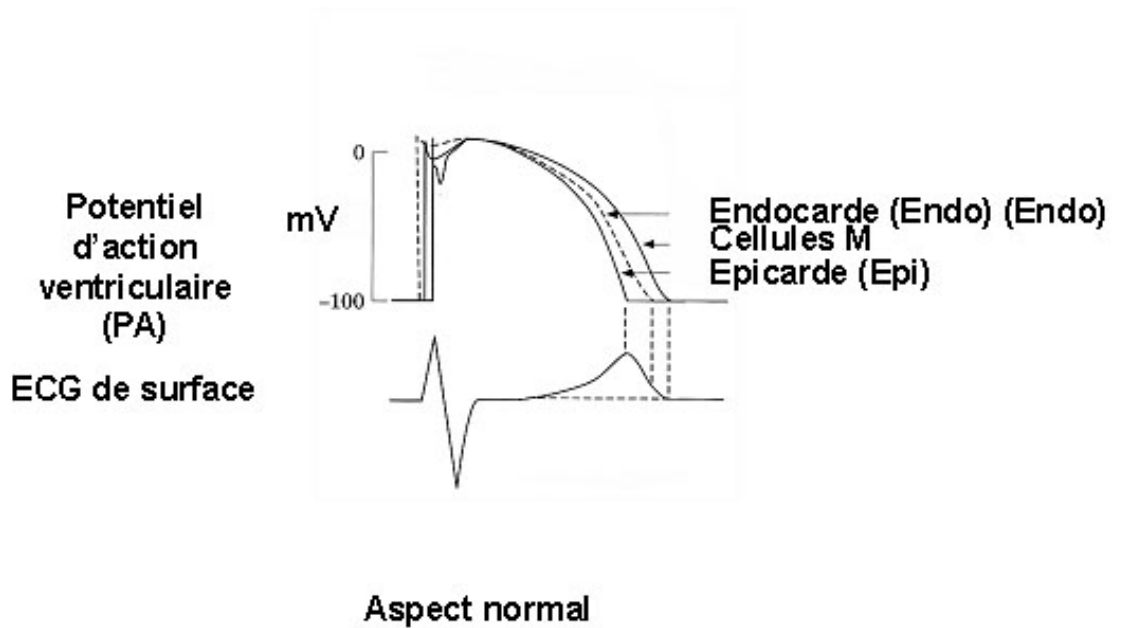


Figure 34 : Mécanisme cellulaire responsable de l'aspect électrocardiographique dans le syndrome de Brugada.

La perte complète du dôme épïcardique, dans certaines zones épïcardiques ventriculaires droites, s'accompagne d'une dispersion de repolarisation et des périodes réfractaires. Cette hétérogénéité électrophysiologique du myocarde constitue un substrat arythmogène à la base des

réentrées en phase 2 (Antzelevitch C. 2001)(Figure 35). La zone épocardique avec un potentiel d'action sans dôme est activée par le dôme du potentiel de la région voisine qui se propage de façon électrotonique. Il en résulte une extrasystole qui va dépolariser la zone à potentiel d'action avec dôme. Cette théorie a pu être démontrée expérimentalement sur des préparations de myocarde ventriculaire droit de chien perfusées et exposées à du pinacidil (Yan G. X. and Antzelevitch C. 1999).

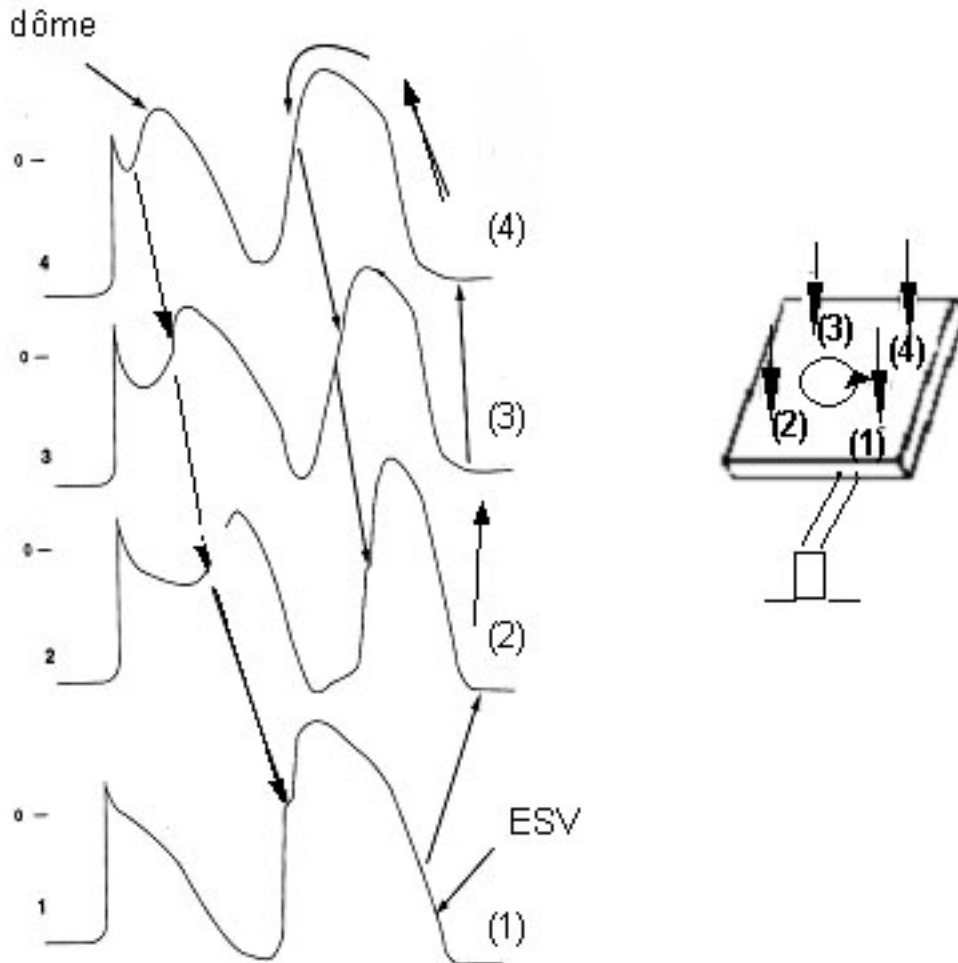


Figure 35: Mécanismes des réentrées en phase 2. Les potentiels d'action 4 et 3 sont caractérisés par un dôme qui se propage en 2 et 1, initiant une extrasystole en 1. Cette extrasystole est conduite vers le site 4 avec constitution d'un circuit de réentrée.

Pour cette théorie, deux mécanismes peuvent être à l'origine de l'aspect électrocardiographique du SB. Soit une diminution des courants entrants, soit une augmentation des courants sortants.

Ces données électrophysiologiques permettent de mieux comprendre le rôle des agents bloqueurs sodiques utilisés lors des tests diagnostiques et de définir des gènes candidats pouvant être responsables de ce syndrome.

II.A.3.c. Mécanismes d'action des agents bloqueurs sodiques.

Sous l'action des bloqueurs du canal sodique, la phase 1 du potentiel d'action débute et se termine à un voltage plus négatif et la disponibilité des canaux calciques est alors moindre. Il en résulte un déséquilibre de la balance entre les courants en faveur du courant sortant, avec facilitation de la perte du dôme du potentiel d'action épicaudique (Yan G. X. and Antzelevitch C. 1999).

Les principaux bloqueurs sodiques utilisés sont les antiarythmiques de classe I dont l'action est cependant hétérogène. La cinétique d'installation du bloc de conduction et de retrait des antiarythmiques de classe I est différente selon le sous-groupe :

les antiarythmiques de classe IB, dont la cinétique de retrait est rapide, n'ont aucun effet sur la repolarisation ;

les antiarythmiques de classe IA et IC ont une cinétique de retrait respectivement intermédiaire et lente permettant un blocage prolongé des canaux.

Dans ces 2 sous-groupes IA et IC on distingue des différences entre les molécules liées aux propriétés associées :

anticholinergiques : la quinidine et à un moindre degré la procaïnamide ;

bloqueurs des courants Ito : la disopyramide et la quinidine.

Les effets sur la phase 1 du potentiel d'action, en rapport avec ces 2 propriétés associées, s'opposent aux effets liés au blocage du courant sodique. Il en résulte une encoche moins marquée lors de la phase 1 et une atténuation moindre du dôme du potentiel d'action épicaudique.

L'ajmaline et la flécaïnide ont un effet dépresseur sodique quasi exclusif et sont donc plus appropriées pour les tests de sensibilisation.

Plusieurs études ont confirmé ces différentes propriétés chez les patients atteints de SB mais aussi chez des sujets contrôles (Miyazaki T. et al. 1996; Shimizu W. et al. 2000a; Shimizu W. et al. 2000b). Si des modifications de la repolarisation sont notées dans les groupes contrôles, celles-ci sont moindres que chez les patients atteints (Brugada R. et al. 2000). Chez le sujet atteint, le déséquilibre de la repolarisation qui pré-existe avant la réalisation du test est majoré par les bloqueurs sodiques et explique le démasquage de l'aspect de SB chez ces sujets.

II.A.3.d. Rôle du système nerveux autonome.

Le système nerveux autonome est impliqué dans la physiopathologie du SB. Une injection intra coronaire d'acétylcholine, chez des patients atteints, induisait une élévation du segment ST alors qu'une stimulation bêta-adrénergique par isoprénaline ou un blocage des récepteurs alpha permettait une diminution du sus-décalage du segment ST (Miyazaki T. et al. 1996). Le rôle du système nerveux autonome serait cependant modeste, et le déséquilibre entre le système sympathique et parasympathique ne semble pas l'élément fondamental de cette pathologie. La diminution de fixation du MIBG I¹²³ traduit une dysfonction présynaptique cardiaque. Contrairement à Miyazaki et al., l'équipe de Wichter et al. a mis en évidence un défaut de fixation du marqueur au niveau des parois ventriculaires inférieure et septale gauche chez 47 % des patients atteints de SB (Miyazaki T. et al. 1996; Wichter T. et al. 2002). L'augmentation de l'activité sympathique, en rapport avec un phénomène de désensibilisation, semble improbable puisque la stimulation bêta-adrénergique a un effet positif sur la repolarisation dans le SB. Par conséquent, le défaut de fixation serait lié à une réduction du nombre ou de la fonction des neurones sympathiques efférents expliquant la diminution de la captation du MIBG et donc de la noradrénaline. Ces anomalies peuvent faire suite à une dénervation ou à une modulation de l'activité neuronale influencée par l'activité des canaux sodiques et le tonus vagal. Il s'agit d'une petite population (17 patients) ; des études sur un échantillon plus large, avec des techniques type PET scan (tomographie par émission de positons), pourraient préciser le rôle exact du système nerveux autonome, en particulier dans les troubles du rythme. Cependant, si le rôle exact du

système nerveux reste discuté son implication est évidente. La plupart des morts subites surviennent en période nocturne lorsque le tonus vagal est élevé et inversement la perfusion d'agoniste bêta-adrénergique permet de diminuer l'amplitude du sus-décalage mais également de traiter un orage rythmique dans ce syndrome (Gronefeld G. et al. 2001; Maury P. et al. 2004; Miyazaki T. et al. 1996; Mizumaki K. et al. 2004; Tanaka H. et al. 2001)

II.A.3.e. Autres hypothèses physiopathologiques.

Pour expliquer les modifications électrocardiographiques typiques du SB, certains auteurs ont proposé un autre mécanisme physiopathologique (Nagase S. et al. 2002). Celui-ci n'impliquerait ni la théorie du gradient de voltage transmural, ni la notion de déséquilibre de la balance entre les systèmes sympathique et parasympathique. Il existerait un retard de conduction dans la paroi libre de la chambre de chasse du ventricule droit. En utilisant une électrode endocavitaire introduite dans l'artère du conus, un électrogramme épicardique de la paroi libre de la chambre de chasse du ventricule droit a pu être enregistré. Un potentiel postérieur à la terminaison du QRS a pu ainsi être isolé dans cette région correspondant à la détection de potentiels tardifs à l'ECG de surface. Sous l'action de bloqueurs sodiques, ces potentiels décalés sont prolongés comme les potentiels enregistrés à l'ECG haute amplification. Il existerait donc une anomalie myocardique épicardique dans la chambre de chasse du ventricule droit à l'origine de ces potentiels tardifs. Parallèlement à la théorie concernant les anomalies de conduction, une équipe japonaise a cherché à identifier des anomalies morphologiques non détectables avec les techniques usuelles et qui expliqueraient les troubles de repolarisation (Takagi M. et al. 2001). Ils ont réalisé chez des patients atteints de SB une imagerie de type scanners ultrarapides (electron beam computed tomography, Imatron®). Dans cette étude, 81 % des patients avaient des anomalies morphologiques du ventricule droit. Mais aucun parallèle n'a pu être établi avec des anomalies tissulaires lors des biopsies endomyocardiques.

II.A.4.

Aspects génétiques du syndrome de Brugada.

En 1998, l'équipe de JA. Towbin a identifié chez 3 familles de SB les premières mutations dans le gène *SCN5A* par une approche gène-candidat (Chen Q. et al. 1998). Ce gène code pour la sous-unité alpha du canal sodique et est situé sur le chromosome 3 (3p21) (Wang Q. et al. 1996). Ces mutations représentaient les 3 classes de mutations restreintes possibles :

- mutation faux-sens (substitution C-T) avec substitution conservatrice d'une thréonine par une méthionine sur le codon 1620,

- délétion d'un nucléotide (A) du codon 1397 produisant un codon stop (mutation non-sens) et donc une protéine tronquée,

- insertion de 2 nucléotides dans la zone du site donneur d'épissage de l'intron 7. Les séquences codantes des gènes ou exons sont séparées par des séquences non codantes ou introns. Le transcrit primaire de ces gènes comporte l'ensemble de ces séquences. La maturation de ce transcrit aboutit à l'élimination des séquences introniques et à la jonction des séquences exoniques. Les 2 nucléotides en début et en fin d'intron ont un rôle important de signalisation pour l'épissage. La région intronique proximale comportant le dinucléotide GT constitue le site donneur d'épissage, toute mutation dans ce dinucléotide conduit à la perte de ce site et à un épissage différent, donc à une protéine différente plus ou moins fonctionnelle.

Depuis 1998, de nombreuses autres mutations ont pu être identifiées, certaines ont fait l'objet de publications (Akai J. et al. 2000; Baroudi G. et al. 2002; Baroudi G. et al. 2000; Baroudi G. et al. 2001; Bezzina C. et al. 1999; Deschenes I. et al. 2000; Grant A. O. 2001; Hong K. et al. 2004; Kyndt F. et al. 2001; Mok N. S. et al. 2003; Potet F. et al. 2003; Priori S. G. et al. 2002b; Rook M. B. et al. 1999; Schulze-Bahr E. et al. 2003; Smits J. P. et al. 2002; Ueda K. et al. 2004; Valdivia C. R. et al. 2002; Valdivia C. R. et al. 2004; Wang D. W. et al. 2002). La liste des mutations identifiées dans le SB peut être consultée sur le site WEB « <http://www.pc4.fsm.it :81/Cardmoc/> ».

Les mutations peuvent siéger à différents niveaux du gène *SCN5A* codant pour la sous-unité alpha du canal sodique avec une traduction électrophysiologique dépendant du site correspondant sur la protéine. La sous-unité alpha du canal sodique est constituée de 4 domaines (D) et chaque domaine est divisé en 6 segments (S) (Figure 36).

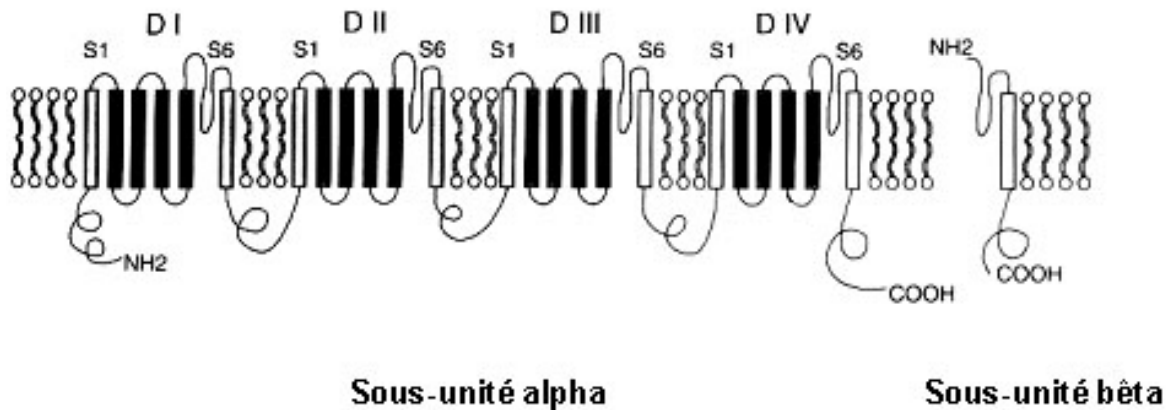


Figure 36 : Structure supposée du canal sodique cardiaque.

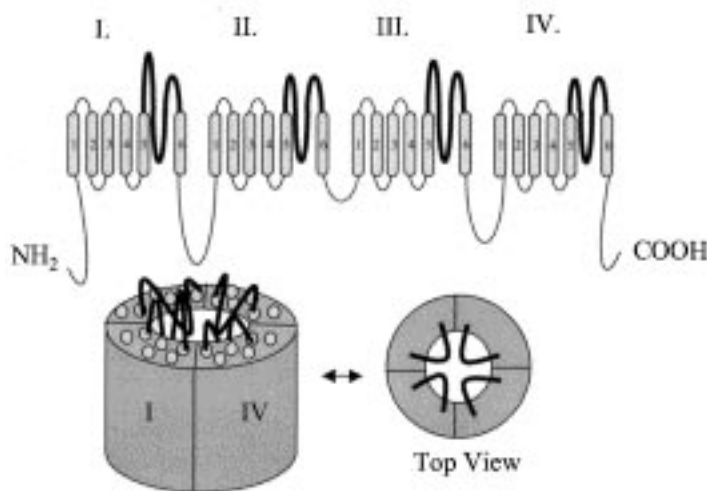


Figure 37 : Aspect tridimensionnel du canal sodique.

Cette segmentation de la sous-unité alpha est fondamentale, en particulier pour la compréhension du fonctionnement du canal sodique (Balsler J. R. 2001). Le canal sodique présente différentes conformations liées à son état d'activation. Lors de la dépolarisation il passe d'un état de repos (fermé) à un état activé (ouvert), cet état est suivi d'une inactivation puis d'un retour à un état de repos.

Le segment S4 de chaque domaine donne au canal sodique sa sensibilité au potentiel, il est responsable de l'activation et de l'ouverture du pore. Ce dernier est délimité par les boucles

intra membranaires P situées entre les 5^{ème} et 6^{ème} segments des 4 domaines.

L'inactivation du canal se fait selon deux mécanismes au moins :

- L'inactivation rapide : elle fait intervenir la portion cytoplasmique de la boucle reliant les domaines III et IV qui interagit avec les éléments constitutifs du vestibule, le lien entre les segments S4-S5 des domaines III et IV et la terminaison du segment 6 du domaine IV.

- L'inactivation lente : son fonctionnement est moins bien connu. Elle impliquerait un changement de conformation de la boucle P (boucle S5-S6). Dans cette dernière forme d'inactivation, on distingue une forme à cinétique intermédiaire impliquée pour des dépolarisations de durée moyenne, qui est facilitée en cas de mutations dans la portion C-terminale.

Cette description, bien que simplifiée, du fonctionnement du canal sodique explique le retentissement variable des mutations dans le gène *SCN5A* selon leur siège (Bezzina C. R. et al. 2001). Cette variabilité d'expression est aussi liée à la nature des mutations. Certaines, dont les non-sens, conduisent à une absence de courant sodique plus ou moins associée à un défaut de migration de la protéine à la membrane. D'autres conduisent à une modification de l'inactivation qui est prolongée en raison d'un début plus précoce ou d'une récupération retardée, il en résulte une diminution du courant sodique. Paradoxalement, les mutations faux-sens entraînent une récupération post-inactivation plus rapide. Mais sous certaines conditions : influence du type cellulaire (oocytes de xénope versus cellules mammifères) (Baroudi G. et al. 2000), co-expression avec la sous-unité $\beta 1$ (Makita N. et al. 2000), hyperthermie (Dumaine R. et al. 1999), ces mutations induisent une réduction du courant sodique par allongement de l'inactivation.

Les mutations dans le gène *SCN5A* peuvent être recherchées par séquençage direct ou après pré-sélection par DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) ou SSCP (Single-stranded conformation polymorphism). Ces mutations ne sont retrouvées que chez 20 à 30 % des patients atteints d'un SB, ce qui montre que d'autres gènes sont donc impliqués dans cette pathologie.

La pénétrance des mutations du gène *SCN5A* reste difficile à déterminer. Dans une étude

rétrospective, Priori et al. rapportait une pénétrance de 71,7 %. Le phénotype était basé sur un ECG standard (sans enregistrement des dérivations hautes) avec test à la flécaïnide (Priori S. G. et al. 2002a).

Par une approche de génétique inverse, l'équipe de Barry London a mis en évidence un nouveau locus situé sur le chromosome 3, en position 3p22-25 (Weiss R. et al. 2002). Les patients atteints de cette famille sont caractérisés par un SB et des troubles de la conduction progressifs. A ce jour, aucun gène n'a encore pu être identifié.

De nombreuses questions, tant cliniques que fondamentales restent posées concernant le SB. Mon travail de thèse a visé à identifier les autres facteurs génétiques impliqués dans ce syndrome par une approche de génétique inverse à partir de grandes familles. Je me suis également efforcé de préciser les caractéristiques cliniques de cette pathologie d'une part par l'analyse génotype-phénotype des grandes familles mutées sur gène SCN5A que nous avons pu identifier mais également par la constitution d'un large fichier clinique et génétique sur l'ensemble des patients atteints d'un SB dans la grande région ouest au sein du réseau Ouest pour les maladies rythmiques héréditaires.

II.B. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Ce travail a cherché à identifier les facteurs génétiques à l'origine du SB mais également à préciser ses caractéristiques cliniques de ce syndrome. Pour cette raison, notre étude a porté à la fois sur des cas index (propositus) mais également sur les cas familiaux.

Nous avons donc, à partir d'un cas index, cherché systématiquement à identifier l'ensemble des membres de la famille. Pour cela nous contactons les membres de la famille après que ceux-ci aient été prévenus par le cas index de la famille dans le respect des bonnes pratiques cliniques. L'ensemble des patients inclus dans l'étude recevait une information écrite et orale concernant le SB et les patients signaient un consentement écrit avant le prélèvement sanguin à but génétique.

II.B.1. Diagnostic clinique du syndrome de Brugada.

II.B.1.a. Critères d'inclusions.

- Patient ayant donné son autorisation écrite de participation à l'étude après information orale et écrite.
- Patient atteint d'un SB selon les critères de la conférence de consensus (Wilde A. A. et al. 2002).
- Membres de la famille des patients atteints d'un SB.

II.B.1.b. Critères d'exclusions.

- Absence de signature du consentement écrit ou impossibilité de comprendre le consentement.

Afin de pouvoir mener à bien ce type de travail, il était impératif de définir précisément les critères permettant la classification phénotypique des patients participants. Les critères d'atteinte et de non atteinte étaient les suivants.

II.B.1.c. Critères d'atteintes :

- Aspect électrocardiographique de type I spontanément ou lors du test à l'ajmaline ou à la flécaïne. Le diagnostic de SB était retenu si l' ECG montrait un aspect de type I de la conférence de consensus (Wilde A. A. et al. 2002).

II.B.1.d. Critères de non-atteintes :

La pénétrance du SB étant trop faible les patients n'ayant pas d'aspect de SB à l'électrocardiogramme n'étaient pas utilisés pour les analyses de biologie moléculaire.

Les patients ayant un aspect électrocardiographique pouvant faire discuter un SB (type II) et sans apparition d'un type I lors du test à l'ajmaline étaient considérés comme indéterminés pour les analyses génétiques.

Pour chacun des patients inclus dans l'étude il était réalisé après obtention du consentement éclairé:

- Un interrogatoire afin de recueillir les antécédents médicaux personnels ou familiaux et construire l'arbre généalogique.

- Un examen clinique cardiovasculaire avec auscultation et prise de la tension artérielle.

- La réalisation d'un électrocardiogramme et réalisation d'un test à l'ajmaline (1 mg/kg en 10 min) ou test à la flécaine (2 mg/kg en 10 min) si l'électrocardiogramme de base ne permet pas de conclure à un aspect de SB de type I. Pendant ce test l'ECG était enregistré en permanence. Ce test était réalisé dans un environnement de réanimation en présence d'un médecin et d'une infirmière.

- La réalisation d'une échocardiographie pour tous les patients considérés comme atteints afin de ne pas risquer d'ignorer une cardiopathie sous-jacente pouvant expliquer l'aspect électrocardiographique.

- La réalisation d'une prise de sang d'environ 30 ml destinée à extraire des cellules sanguines l'acidedésoxyribonucléique (ADN).

Toutes les données concernant les patients inclus dans l'étude étaient centralisées au sein du CIC de Nantes.

Les patients inclus dans l'étude étaient informés de leur statut phénotypique, ils étaient informés que s'agissant d'un protocole de recherche, il était possible que nous ne puissions pas leur donner de résultat de biologie moléculaire mais que si ces résultats devenaient disponibles ils en seraient informés s'ils le souhaitaient au cours d'une consultation individuelle.

II.B.2. Principe et technique de biologie moléculaire.

II.B.2.a. Extraction de l'ADN.

Toutes les techniques de biologie moléculaire que nous utilisons sont basées sur une analyse d'ADN, obtenu par extraction à partir des leucocytes. Du sang total (6ml) est prélevé sur tube EDTA. L'extraction est réalisée, à l'aide du Kit Nucleon BACC2 (Amersham LIFE SCIENCE) selon le protocole suivant : isolement des leucocytes par centrifugation, lyse cellulaire

par détergent, déprotéinisation de l'ADN puis extraction par chloroforme et résine et enfin précipitation avec de l'éthanol absolu froid. L'ADN est remis en solution avec du tampon TE à 20/1 (Tris 20mM, EDTA 1mM) soit une solution d'ADN à 100ng/μL.

II.B.2.b. Détection de mutations.

A ce jour, *SCN5A* est le seul gène sur lequel des mutations ont pu être identifiées dans le SB. Il comporte 28 exons, l'ARN messager (ARNm) contient 8414 paires de bases. Afin d'accélérer le criblage génétique des patients atteints d'un SB le séquençage est précédé par une pré-sélection par DHPLC. En cas de détection d'un profil anormal, nous réalisons le séquençage du gène *SCN5A*.

II.B.2.b.1. La DHPLC.

La DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) est une technique de dépistage. Sa sensibilité, bien que n'atteignant probablement pas 100 %, semble supérieure à celle de la SSCP. Cette méthode d'analyse repose sur la détection de bases mésappariées formées lors de l'hybridation des brins complémentaires d'un allèle mutant et d'un allèle sauvage, cet hybride correspondant à un hétéroduplex. Cet hétéroduplex possède une température de dissociation inférieure aux autres hybrides. Ceci conduit, lors de la chromatographie, à un profil de migration différent. Si un hétéroduplex est détecté, un séquençage est alors effectué. La première étape de la DHPLC comprend une réaction d'amplification standard des différents exons. Chaque exon est analysé individuellement. Plusieurs chromatographies sont effectuées, sur un chromatographe de type TRANSGENOMIC WAVE®, à des températures différentes afin d'augmenter la sensibilité de l'analyse. Ces températures sont déterminées, en fonction du nombre de domaines de la séquence à analyser, par le logiciel WAVEMAKER®.

II.B.2.b.2. Le séquençage.

Il permet de déterminer la séquence nucléotidique d'un gène, et de rechercher une mutation au sein de ce gène. Afin de déterminer que la modification du changement de séquence

identifié est véritablement à l'origine de la pathologie étudiée et donc d'éliminer un simple polymorphisme tout changement de séquence est systématiquement recherchée chez 100 sujets témoins avant de conclure qu'il s'agit d'une mutation.

Après une première réaction d'amplification exponentielle d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) en présence des amorces sens et anti-sens, une réaction d'amplification linéaire d'un seul brin est réalisée. Cette seconde phase nécessite une seule amorce (sens ou anti-sens), un mélange des quatre désoxynucléotides (dNTP) et des quatre didésoxynucléotides (ddNTP) marqués par des fluorophores différents et en concentration nettement inférieure. La réaction d'amplification s'interrompt dès l'incorporation d'un ddNTP. On obtient ainsi de multiples fragments débutant par l'amorce utilisée et se terminant sur un ddNTP. Il y a autant de tailles différentes de fragments que de bases constituant la portion d'ADN étudiée. Pour un gène donné, chaque exon est séquencé individuellement. S'il s'agit d'un exon de grande taille celui-ci est fragmenté.

II.B.3. Etude des relations phénotype-génotype.

L'étude des relations génotype/ phénotype est particulièrement importante pour le SB. En effet, pour ce syndrome actuellement peu de choses sont connues sur ces relations et les premières données montrent que ces relations sont complexes. La constitution de fichiers comprenant un nombre important de patients porteurs de la même mutation devrait nous permettre d'affiner nos connaissances sur cette pathologie. Ce fichier comprend les données cliniques, para-cliniques, génétiques et généalogiques pour l'ensemble des patients.

Afin d'augmenter la taille de l'échantillon de patients que nous pouvions étudier et donc d'améliorer la pertinence de notre fichier, nous avons collaborés avec les équipes d'Amsterdam et de Munster et nous avons mis en commun nos fichiers cliniques et génétiques.

II.C. RÉSULTATS.

II.C.1. Analyses des familles mutées sur le gène SCN5A.

II.C.1.a. Famille P.

Dans cette famille, quatre sujets étaient atteints du SB (II-11 , II-15, III-18 et III-24) et huit sujets étaient atteints de troubles de conduction isolés (II-1, II-3, II-6, III-3, III-4, III-9, III-11 et IV-1). Les deux phénotypes semblaient ségréger de façon indépendante dans les différentes branches de cette famille (Kyndt F. et al. 2001) (Figure 38).

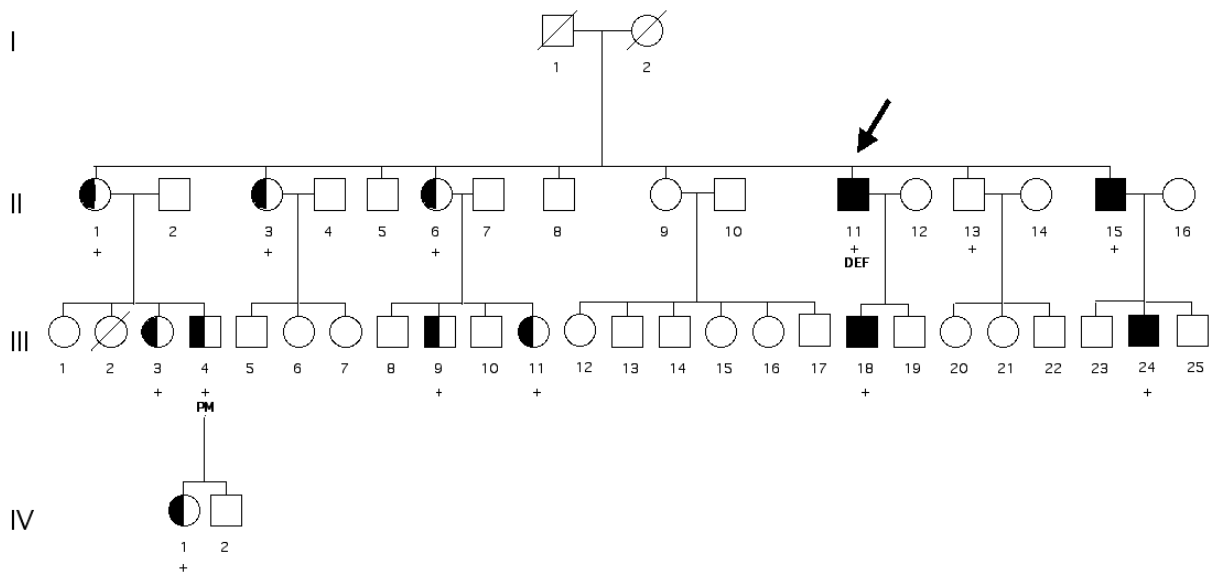


Figure 38: Représentation schématique d'une partie de la famille P. Le propositus (patient II-11) atteint de SB, a reçu un défibrillateur (DEF). Un des sujets de cette famille a reçu un stimulateur cardiaque (PM). Les symboles pleins représentent les sujets atteints du syndrome de Brugada et les symboles à demi-pleins représentent les sujets atteints de troubles de conduction cardiaque isolés. Les deux syndromes sont transmis selon un mode autosomique dominant. Les patients porteurs de la mutation $G \rightarrow T$ en position 4372 du gène SCN5A sont marqués par une croix (+).

II.C.1.a.1. Etude clinique.

Le propositus (patient II-11) est venu en consultation dans le service de cardiologie en raison d'épisodes répétés de palpitations et de vertiges. Un enregistrement ECG à 12 dérivations (Figure 39) présentait un sus-décalage du segment ST caractéristique du SB, associé à un intervalle PR prolongé (284 ms). Une stimulation électrique programmée a déclenché une tachycardie ventriculaire polymorphe en réponse à un seul stimulus et un défibrillateur a été implanté chez ce patient.

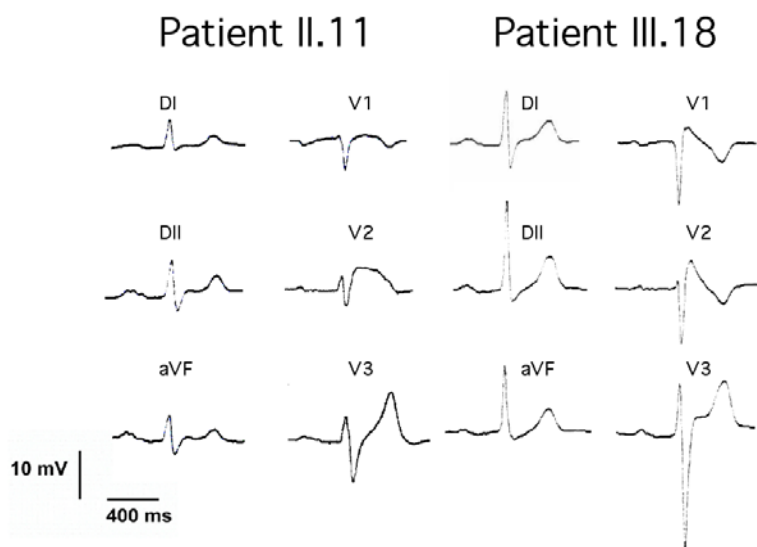


Figure 39: Enregistrements électrocardiographiques du patient II-11 et de son fils (III-18) montrant un phénotype typique du SB comprenant un sus-décalage du segment ST et un aspect rSR' dans les dérivations précordiales droites, associés à un intervalle PR prolongé (284 et 215 ms).

Bien qu'asymptomatique, un de ses fils (patient III-18) avait un ECG compatible avec un SB (Figure 39). Un des frères du propositus (patient II-15) ainsi que l'un de ses fils (patient III-24) présentaient également un phénotype ECG typique du SB. Chez le patient II-15, un test électrophysiologique invasif montrait un intervalle HV prolongé (80 ms), reflétant un retard de conduction intraventriculaire, et a déclenché des tachycardies ventriculaires persistantes.

Trois sœurs du propositus (patients II-1, II-3 et II-6) présentaient un bloc auriculo-

ventriculaire de premier degré (2/3) et/ou des troubles de conduction intra-ventriculaire mais ne présentaient pas de sus-décalage du segment ST ni de bloc de branche droit. Parmi leurs enfants, quatre sujets asymptomatiques (III-3, III-4, III-9 et III-11) présentaient également des troubles de conduction cardiaque isolés: un patient présentait un intervalle PR allongé (> 210 ms), deux patients présentaient un bloc de branche droit complet, un patient présentait un hémibloc antérieur gauche et deux patients présentaient un bloc pariétal. Parmi ceux-ci le patient III-4, âgé de 43 ans, présentait un intervalle PR de durée prolongée (274 ms), un bloc de branche droit complet mais pas de sus-décalage du segment ST (Figure 40). Six mois plus tard, ce patient a fait deux épisodes de syncope. Une étude électrophysiologique invasive et une stimulation électrique programmée ont montré un intervalle HV prolongé (80 ms) mais pas de tachycardie ventriculaire inductible. Un stimulateur cardiaque a été implanté chez ce patient et ce patient n'a présenté aucun symptôme depuis cette intervention. Le patient III-3 qui présentait un BAV de 1^{er} degré et un hémibloc antérieur gauche a été soumis au test à la flécaïne. La flécaïne a aggravé de façon importante les troubles de conduction mais n'a pas provoqué de sus-décalage du segment ST: la durée de l'intervalle PR est passée de 206 à 230 ms, un bloc de branche droit est apparu, les complexes QRS se sont élargis de 100 à 150 ms, et l'intervalle HV est passé de 72 à 104 ms. Enfin, la stimulation électrique programmée n'a pas déclenché d'arythmies. Un test à la flécaïne a été aussi réalisé chez les patients III-9 (l'intervalle PR est passé de 202 à 244 ms, les complexes QRS se sont élargis de 120 à 186 ms) et chez le patient III-11 (Figure 40) (l'intervalle PR est passé de 208 à 222 ms, les complexes QRS se sont élargis de 108 à 136 ms). La flécaïne n'a provoqué de sus-décalage du segment ST chez aucun d'entre eux. Le patient II-13 avait un ECG normal.

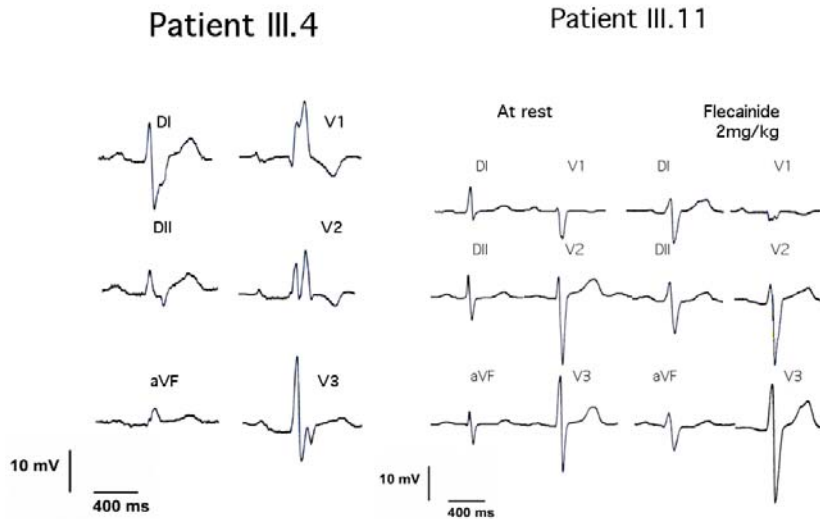


Figure 40: *A gauche : enregistrement électrocardiographique du patient III-4 montrant un intervalle PR de durée allongée (274 ms) et un bloc de branche droit complet sans sus-décalage du segment ST. A droite : enregistrements électrocardiographiques du patient III-11 avant et après le test à la flécaïne (2mg/kg). La flécaïne a aggravé de façon importante les troubles de conduction préexistants, mais aucun sus-décalage du segment ST n'est apparu.*

II.C.1.a.2. Etude génétique.

Le séquençage du gène *SCN5A* chez le propositus (patient II-11) a permis d'identifier une mutation G→T en position 4372, dans l'exon 23 (Figure 41). Cette mutation ponctuelle changerait une glycine en arginine (G1406R) entre les domaines DIII-S5 et DIII-S6 du canal sodique. Le séquençage des autres exons du gène n'a permis de trouver aucune autre anomalie. La mutation G1406R n'a été retrouvée chez aucun des 100 allèles normaux d'individus non apparentés. La ségrégation de la mutation chez les individus atteints du SB et de troubles de conduction cardiaque isolés a été confirmée par RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism) avec l'enzyme de restriction BstXI (Figure 41). Cette mutation a été retrouvée également chez le sujet II-13, considéré initialement sain. Par comparaison aux sujets sains non porteurs de la mutation de cette famille, les sujets porteurs de la mutation ont un intervalle PR plus long (256 ± 36 ms pour les sujets atteints du SB et 212 ± 35 ms pour les sujets atteints de

troubles de conduction cardiaque isolés versus 164 ± 21 ms pour les sujets sains, $p < 0,001$) et une durée de QRS plus large (120 ± 10 ms pour les sujets atteints du SB et 133 ± 18 ms pour les sujets atteints de troubles de conduction cardiaque isolés versus 94 ± 10 ms pour les sujets sains, $p < 0,001$). Les patients atteints du SB ont un intervalle PR plus long ($p < 0,006$) mais des durées de QRS similaires en comparaison avec les sujets atteints de troubles de conduction cardiaque isolés. La comparaison du rythme cardiaque dans les trois groupes a montré que les sujets atteints du SB avaient un rythme cardiaque significativement plus lent (64 ± 5 battements/ minute, $n=4$) par rapport aux patients atteints de troubles de conduction cardiaque isolés (71 ± 3 battements/ minute, $n=7$) ou aux sujets sains (74 ± 2 battements / minute, $n=19$) ($p < 0,05$).

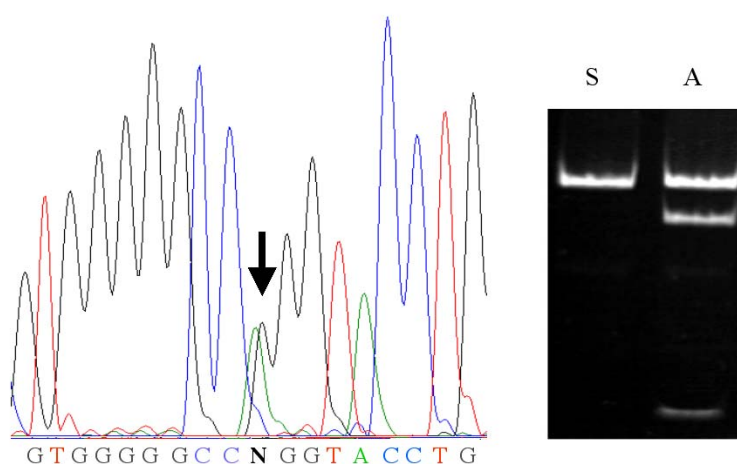


Figure 41: Séquence de l'exon 23 du gène *SCN5A* chez le patient II-11 montrant une mutation $G \rightarrow T$ en position 4372 du gène et les résultats de l'analyse par RFLP avec l'enzyme de restriction *BstXI*: la mutation chez les sujets atteints (A) de la famille crée un nouveau site de restriction enzymatique qui est absent chez les sujets sains (S).

II.C.1.a.3. Etudes fonctionnelles.

Pour étudier les conséquences fonctionnelles de la mutation, les plasmides contenant le gène *SCN5A* sauvage (WT) ou muté (*SCN5A*- G1406R) ont été exprimés dans des cellules COS-7. Les courants, en configuration cellules entières, obtenus en réponse aux dépolarisations entre -60 et 0 mV sont illustrés (Figure 42). Dans les cellules exprimant *SCN5A*-WT, la densité du courant à -20 mV était de $-66,7 \pm 16,2$ pA/pF (moyenne \pm SD, $n=10$). Dans les cellules

cotransfectées avec SCN5A-WT et la sous-unité $\beta 1$ du canal sodique, des courants plus importants ont été enregistrés (à -20 mV, l'amplitude du courant était de $-120,3 \pm 25,2$ pA/pF, $n=12$, $p<0,05$ en comparaison avec SCN5A-WT seul). Les cellules transfectées avec le canal muté G1406R, ne présentent aucun courant en absence ($n=14$) ou en présence ($n=24$) de la sous-unité $\beta 1$ (Figure 42).

Pour confirmer l'expression à la surface cellulaire du canal muté, des protéines de fusion SCN5A-WT-EGFP ou SCN5A-G1406R-EGFP ont été exprimées dans des cellules COS-7. En épifluorescence et en microscopie confocale, les protéines de fusion SCN5A-WT-EGFP ou SCN5A-G1406R-EGFP semblent toutes les deux localisées au niveau de la membrane cellulaire. Ces résultats suggèrent que, bien que non fonctionnel, le canal SCN5A muté soit transporté normalement jusqu'à la membrane plasmique (Figure 43).

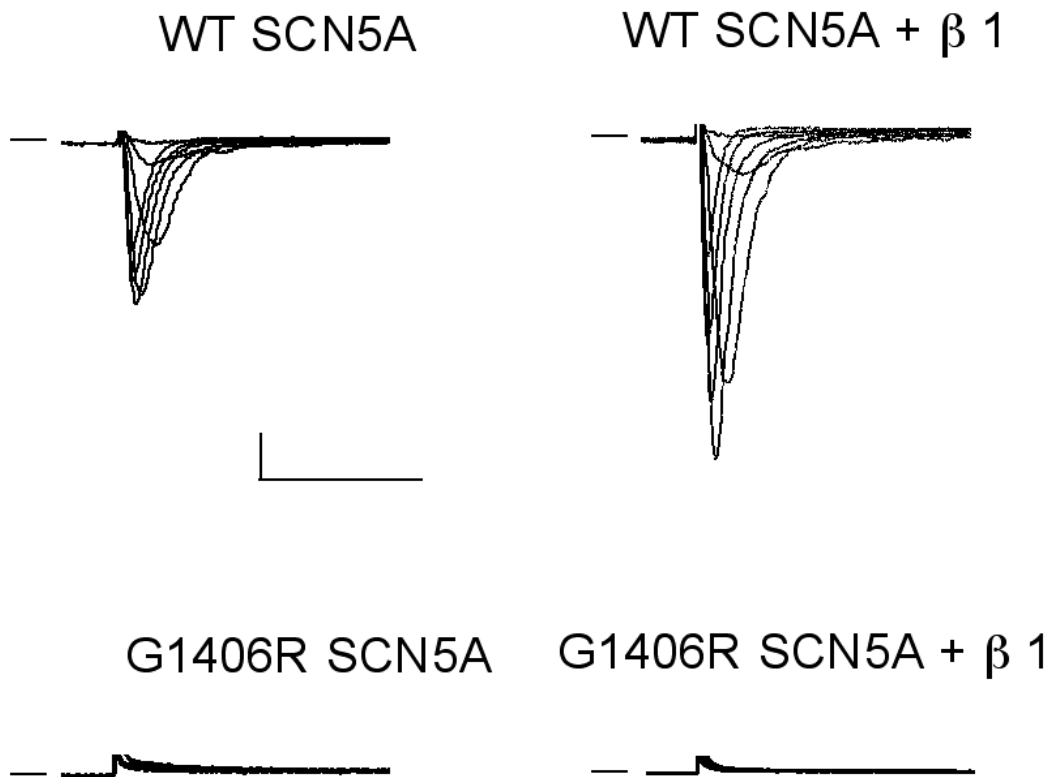


Figure 42: Comparaison des caractéristiques électrophysiologiques des canaux SCN5A-WT et SCN5A-G1406R exprimés dans des cellules COS-7. Courants enregistrés dans les cellules COS

exprimant SCN5A-WT et SCN5A-G1406R en présence ou non de la sous-unité $\beta 1$ du canal sodique. Le protocole de stimulation consistait en une application de paliers de potentiels de 10 mV, entre -60 mV et 0 mV. La membrane était maintenue à un potentiel de -100 mV. La ligne horizontale représente le niveau de courant 0. Barre verticale: 500 pA; barre horizontale: 5 ms.

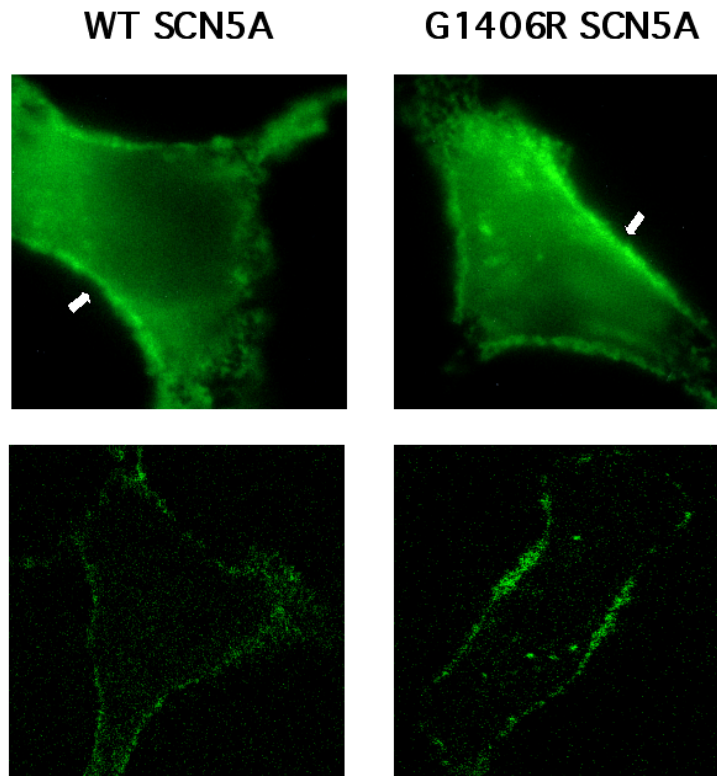


Figure 43: L'adressage à la surface cellulaire de SCN5A n'est pas perturbé par la mutation G1406R. Les cellules COS ont été transfectées par 1 μ g de SCN5A-WT-EGFP ou SCN5A-G1406R-EGFP. Trois jours après transfection, la localisation de la protéine de fusion a été examinée en microscopie de fluorescence (en haut) et microscopie confocale (en bas).

II.C.1.a.4. Résumé des résultats.

L'étude de cette famille a montré qu'une même mutation du gène *SCN5A* pouvait être responsable soit d'un SB chez deux frères et leurs descendants, soit de troubles de conduction cardiaque isolés chez trois sœurs de la même génération et leurs descendants. En fonction des branches de cette famille, la même mutation du gène *SCN5A* peut donner deux phénotypes électrocardiographiques différents. Le canal sodique muté ne serait pas fonctionnel, comme les autres mutations identifiées dans des formes familiales de troubles de conduction progressifs ou du SB. Ces résultats laissent penser que la mutation *SCN5A* seule n'expliquerait pas cette différence phénotypique mais qu'un autre gène modulateur, ségréguant de façon apparemment simple dans les différentes branches de cette famille, pourrait expliquer cette différence de phénotype. Il faut également noter que le SB a toujours été retrouvé dans cette famille chez des hommes alors que les troubles de la conduction sont retrouvés chez des femmes. Il est donc possible que le facteur sexuel soit responsable des différences de phénotype.

II.C.1.b. Famille J.

II.C.1.b.1. Etude clinique.

Le propositus de cette famille, une femme âgée de 59 ans (patient II-4) avaient été hospitalisé en raison de douleurs thoraciques atypiques. Dans le service des urgences, son électrocardiogramme montrait un sus-décalage du segment ST dans les dérivations inférieures avec un intervalle PR allongé (253 millisecondes). Son axe de QRS était à 190°(Figure 44). Son examen clinique était sans particularité mais en raison de cette douleur thoracique et du sus-décalage du segment ST dans les dérivations inférieures le diagnostic d'infarctus inférieur a été suspecté. L'échographie cardiaque, le dosage des enzymes cardiaques, la coronarographie et la ventriculographie gauche étaient dans les limites de la normale.

Finalement, un tracé électrocardiographique réalisé sept ans plus tôt a pu être récupéré et montrait les mêmes anomalies électriques. Cela a permis d'éliminer le diagnostic d'infarctus et un SB atypique a été suspecté. Un test à la flécaïne a montré une aggravation du sus-décalage du segment ST dans les dérivations inférieures et l'apparition d'un sus-décalage dans les dérivations antérieures à confirmer le diagnostic de SB (Potet F. et al. 2003).

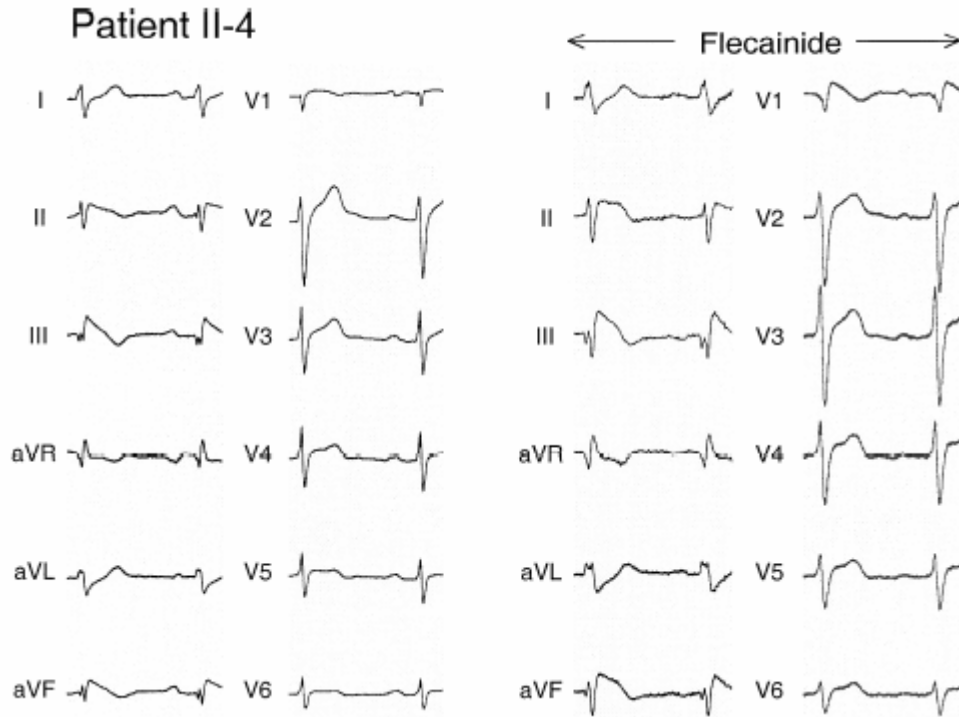


Figure 44 : ECG en registré chez le propositus montrant un aspect de sus-décalage du segment ST dans les dérivations inférieures se majorant lors du test à la flécaïne avec l'apparition d'un sus-décalage dans les dérivations antérieures.

Une enquête familiale a alors été réalisée. Deux frères du propositus (patient II-1 et II-3) étaient décédés brutalement à l'âge de 34 et 36 ans. Le diagnostic de SB a pu être établi chez quatre membres de la famille asymptomatiques en raison de l'aspect électrocardiographique de base ou après test à la flécaïne (Figure 45).

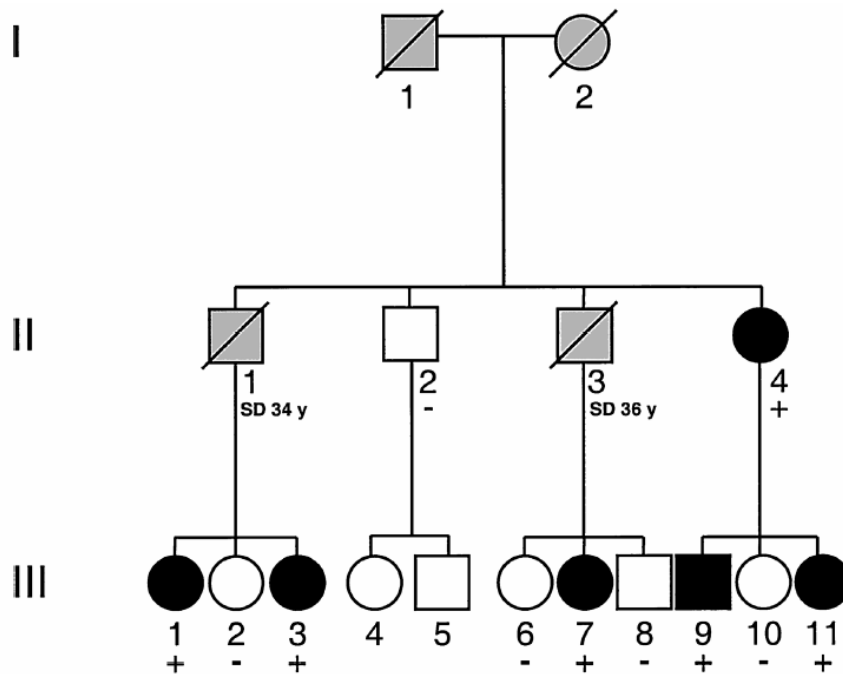


Figure 45 : Arbre généalogique de la famille J. Les croix montrent les patients porteurs de la mutations G752R du gène SCN5A.

La patiente III-1, âgée de 37 ans avaient un sus-décalage modéré du segment ST dans les dérivations antérieures. Le test à la flécaïne a entraîné une majoration des anomalies électriques mais surtout la survenue de doublets d'extrasystoles ventriculaires qui ont ensuite dégénéré en fibrillation ventriculaire qui a dû être réduite par choc électrique externe. Les différents examens comprenant une échographie cardiaque n'ont pas retrouvé d'anomalie morphologique chez cette patiente. La patiente III-3, âgés de 35 ans avaient un électrocardiogramme dans les limites de la normale au repos mais le test à la flécaïne entraînait l'apparition d'un sus-décalage dans les dérivations antérieures (Figure 46). Les patients III-7 et III-9 avaient un SB révélé lors du test à la flécaïne.

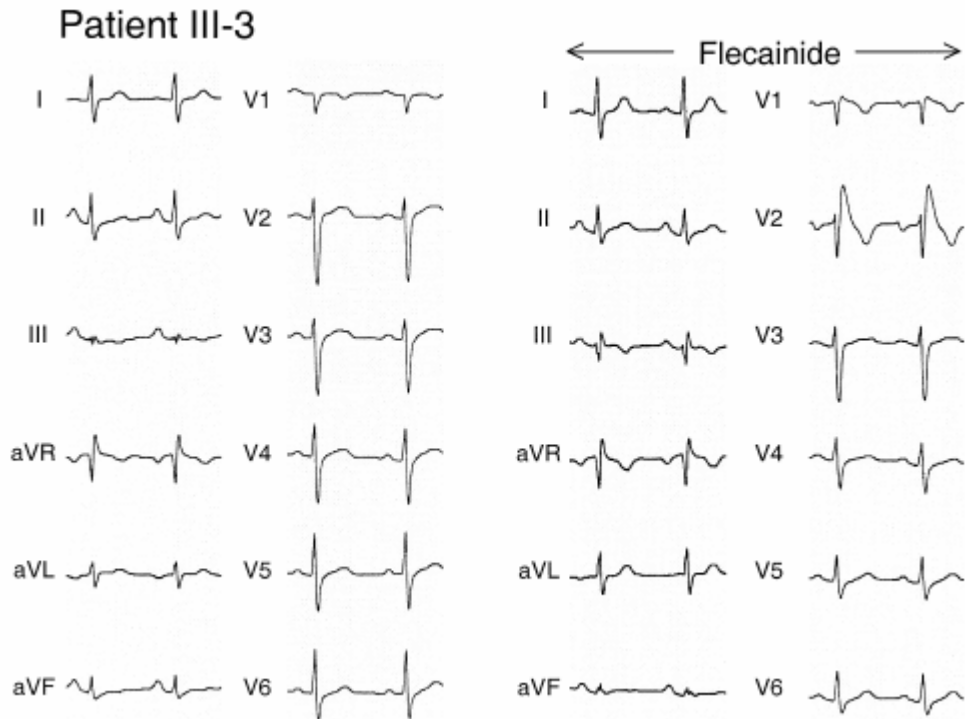


Figure 46 : ECG du patient III-3 montrant l'apparition d'un sus-décalage typique du SB dans les dérivations antérieures lors du test à la flécaïne.

II.C.1.b.2. Etude génétique.

Chez le propositus, le séquençage du gène SCN5A a permis de mettre en évidence dans l'exon 14 une mutation G2254A du gène *SCN5A* (Figure 47). Cette mutation change une Glycine en Arginine dans le domaine DII-S2. Le séquençage des autres exons n'a pas montré d'anomalie et la mutation G2254A n'a pas été retrouvée chez 200 allèles normaux. Cette mutation était retrouvée chez tous les membres atteints de la famille. La patiente III-1 qui avait un bloc pariétal était également porteuse de cette mutation bien qu'elle ne soit pas atteinte du SB même après le test à la flécaïne. Sept membres de la famille sans anomalie électrocardiographique n'étaient pas porteurs de la mutation.

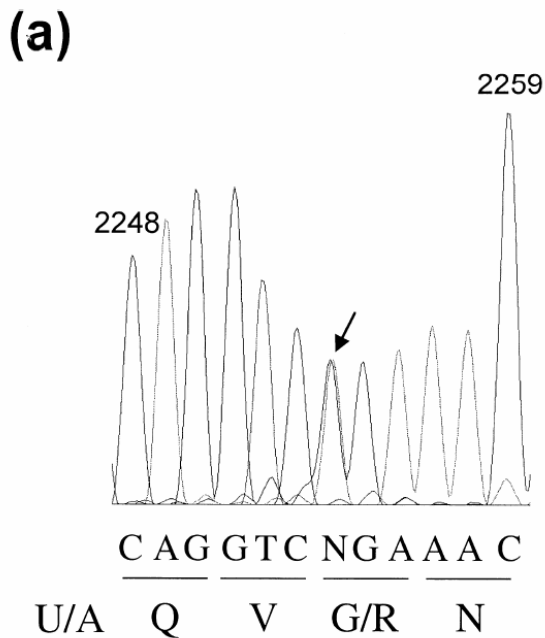


Figure 47 : Analyse de séquence du gène SCN5A du patient II-4 montrant une mutation G2254A.

II.C.1.b.3. Etudes fonctionnelles.

La protéine mutée a été ré-exprimée dans des cellules COS-7. La protéine G752R produit un courant dont l'amplitude est réduite (0.7 ± 0.2 pA/pF à -10 mV contre -58.3 ± 11.2 pA/pF pour la forme sauvage, $n=10$, $p < 0.001$). L'expérience a été renouvelée en augmentant la concentration du plasmide G752R et en augmentant la « driving force » en utilisant une concentration de Na^+ intra-cellulaire inférieure à 1 mM. Dans ces conditions un courant sodique a pu être enregistré. Il montre un shift positif prononcé de la courbe d'activation et un shift positif moins marqué de la courbe de désactivation.



Figure 48 : Caractéristiques fonctionnelles de la protéine mutée. Les cellules étaient transfectées avec 20% de formes sauvages ou mutées de pCI-SCN5A et 80% de pTR-GFP. Le tracé inférieur était enregistré avec une concentration de 75% de pCI-SCN5A et une concentration plus faible de Na⁺ intra-cellulaire (1 mM).

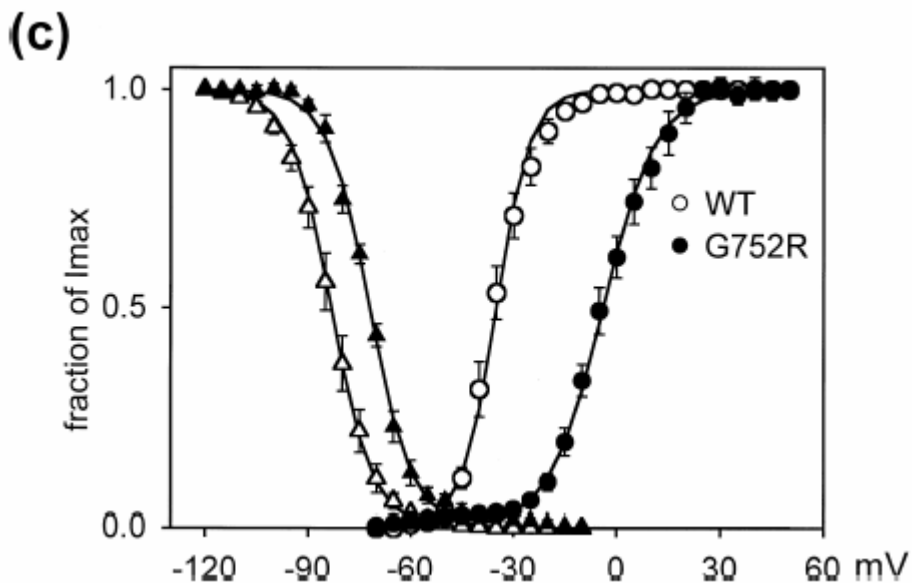


Figure 49 : Courbe d'activation et d'inactivation pour le canal sodique muté en noir et sauvage en blanc montrant shift positif prononcé de la courbe d'activation et un shift positif moins marqué de la courbe de désactivation.

Ces résultats montrent que la mutation entraîne une perte de fonction de la protéine mutée.

II.C.1.b.4. Résumé des résultats.

L'étude réalisée dans cette famille montre qu'avec la même mutation dans le gène *SCN5A* responsable d'une perte de fonction du canal sodique, certain membre de la famille avait un SB atypique localisé dans les dérivations inférieures, que d'autres avaient une forme classique de la maladie avec même la survenue d'une fibrillation ventriculaire au cours d'un test à la flécaïne et enfin qu'un des patients porteurs de la mutation n'était pas atteint par un SB mais avait des troubles de la conduction.

II.C.1.c. Etude de la famille R.

Dans cette famille six sujets étaient atteints du SB (II-4, II-5, III-2, III-8, III-10 et III-11) et trois sujets étaient atteints de troubles de conduction isolés (I-1, II-1 et III-5) (Figure 50).

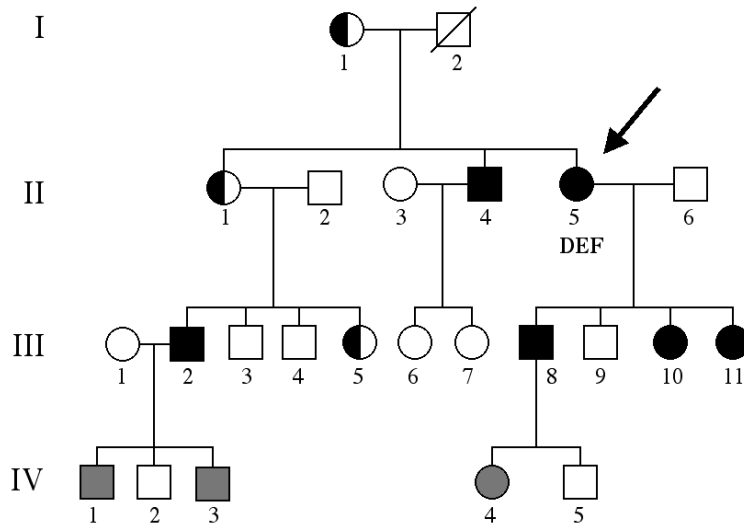


Figure 50: Représentation schématique de la famille R. Le propositus (patient II-5), atteint de SB a reçu un défibrillateur implantable (DEF). Les patients atteints de SB sont représentés en noir. Les patients atteints de troubles de conduction isolés sont représentés par des symboles à demi-plein. Les patients de phénotype indéterminé sont représentés en gris.

II.C.1.c.1. Etude clinique.

Le propositus (patient II.5) a été implanté d'un défibrillateur en raison de syncopes répétées. Un enregistrement électrocardiographique à 12 dérivation (Figure 51) présentait un sus-décalage du segment ST et un bloc de branche droit, associés à un intervalle PR allongé (240 ms). Chez cette patiente une stimulation électrique programmée a déclenché une fibrillation ventriculaire (Figure 52). Trois de ses enfants (III-8, III-10 et III-11) ainsi que son frère (II.4) présentaient aussi des signes de SB. Cependant, le statut phénotypique de l'individu III-10 est difficile à déterminer car son ECG de base est dans les limites de la normale tandis que lors du test à la flécaïne apparaît un sus-décalage du segment ST qui atteint juste 2 mm dans les dérivation droites. Cette patiente asymptomatique a été considérée comme atteinte du SB. La mère du propositus (I.1), âgée de 90 ans, présentait des troubles de conduction isolés comprenant des durées des ondes P et des intervalles PR (140 ms et 220 ms respectivement) prolongées, mais

ne présentait pas de sus-décalage du segment ST ni de bloc de branche droit. La sœur du propositus (II-1) présentait un hémibloc antérieur gauche sans signe de Brugada. Parmi ses enfants, deux patients présentaient des troubles de conduction : le patient III-5 présentait un hémibloc antérieur gauche, et le patient III.2 présentait des troubles de conduction ainsi qu'un SB (Tableau 5). En raison de leur âge, le phénotype des patients de la dernière génération a été considéré comme indéterminé.



Figure 51: Electrogramme du propositus (patient II-5) montrant un sus-décalage du segment dans les dérives précordiales droites (V1, V2 et V3).

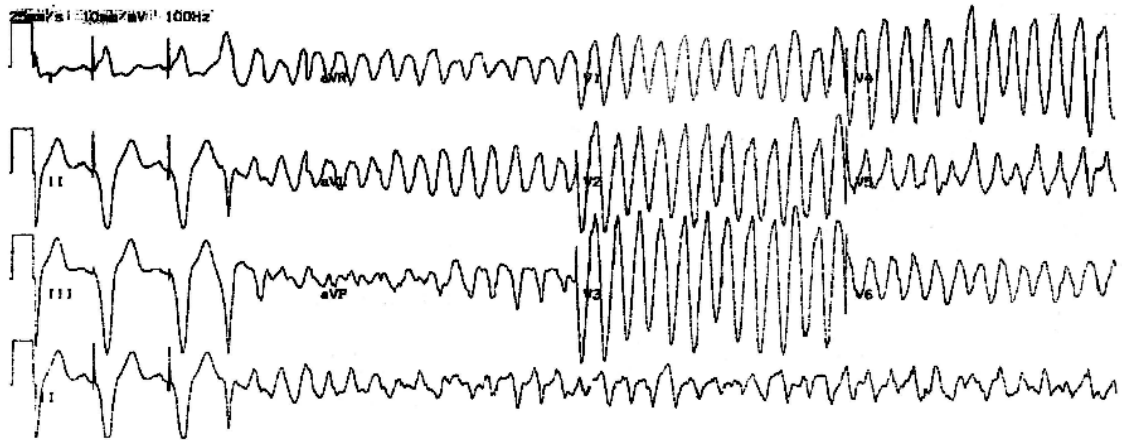


Figure 52: Electrocardiogramme du propositus (patient II-5) montrant une fibrillation ventriculaire induite lors d'une stimulation électrique programmée.

N°	âge	FC	Durée onde P (ms)	Durée PR (ms)	Durée QRS (ms)	Axe QRS	Morpho QRS	Test flécaïne
I-1	90	65	140	220	100	0	BAV 1°	-
II-1	67	62	100	194	120	- 45	HBAG	-
II-4	62	70	80	200	100	0	BP	+
II-5	63	82	120	240	120	60	BBDC	+
III-2	45	73	100	204	110	71	BP	+
III-5	33	66	100	194	108	- 37	HBAG	-
III- 8	39	91	80	174	100	61	BBDI	+
III-10	32	78	100	190	112	-	BBDI	+
III-11	26	81	80	226	108	100	BBDI	+

Tableau 5: Paramètres électrocardiographiques et résultats des tests à la flécaïne chez les patients atteints de la famille R. FC: fréquence cardiaque (battements/min), HBAG: hémibloc antérieur gauche, BP: bloc pariétal, BBDC: bloc de branche droit complet, BBDI: bloc de branche droit incomplet.

II.C.1.c.2. Etude génétique.

II.C.1.c.2.1. Séquençage du gène *SCN5A*.

Le séquençage du gène *SCN5A* chez le propositus (II.5) a permis d'identifier une mutation G → T en position 4295 dans l'exon 23 du gène (figure 53). Cette mutation ponctuelle changeait une serine en isoleucine (S1382I) entre les domaines DIII-S5 et DIII-S6 du canal sodique. Le séquençage des autres exons du gène n'a montré aucune autre mutation. Cette mutation n'a été retrouvée chez aucun des 100 allèles normaux d'individus non apparentés.

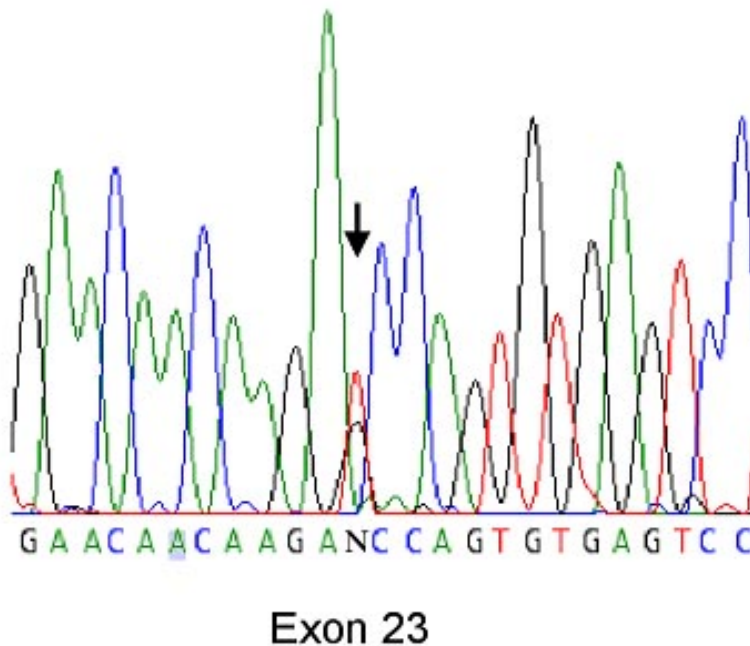


Figure 53: Séquence de l'exon 23 du gène *SCN5A* chez le patient II-5 montrant une mutation G → T en position 4295 du gène.

Cette mutation ségrégeait chez tous les individus de cette famille atteints du SB, à l'exception de l'individu III-8 qui présentait un SB typique avant même le test à la flécaïne mais n'était pas porteur de la mutation G4295T du gène *SCN5A*. Ce patient n'avait pas contrairement au reste de la famille de troubles de la conduction. La mutation G4295T était également retrouvée

chez les individus I-1, II-1 et III-5 qui n'avait que des troubles de la conduction mais pas de SB. Cette mutation ségrégeait donc parfaitement avec les troubles de la conduction mais pas avec le SB. Nous avons donc considéré qu'un autre gène pouvait être responsable du SB dans cette famille.

La taille de la famille étant suffisante, nous avons réalisé une analyse de liaison génétique sur l'ensemble du génome, en considérant uniquement le phénotype Brugada.

I.A.1.a.i.a.8. Analyse de liaison génétique sur l'ensemble du génome.

L'analyse de liaison sur l'ensemble du génome a été réalisée en utilisant les 400 marqueurs chromosomiques dinucléotidiques du Génethon espacés de 10 cM (ABI PRISM™ Linkage Mapping Set-MD10 version 2, PE Biosystem). L'analyse et la détermination du génotype ont été réalisées à l'aide des logiciels GENESCAN® et GENOTYPER®. Les lod scores ont été calculés avec le logiciel LINKAGE® (version 5.2, Lathrop G.M. et Lalouel J.M. 1984). La pénétrance de la maladie a été fixée à 70 %. La fréquence de la maladie était supposée égale entre les deux sexes. La fréquence de l'allèle morbide a été fixée à 0,001.

L'analyse de liaison génétique sur l'ensemble du génome a permis de trouver une liaison pour le marqueur D21S1889 avec un lod score de 3,71 à 0 % de recombinaison.

Les séquences génomiques de cette région sont entièrement disponibles dans les banques de données. Pour confirmer et définir précisément l'intervalle de liaison génétique, nous avons testé d'autres marqueurs flanquant du Génethon ainsi que des marqueurs dinucléotidiques microsatellites (NT-011513 et NT-011514) pour lesquels nous avons choisi les amorces à partir des séquences génomiques des contigs correspondants. L'analyse de ces marqueurs a permis de définir un intervalle de liaison minimal entre les marqueurs D21S268 et NT-011514 (21q22.3). En fonction du statut phénotypique de l'individu recombinant III-10, deux intervalles de liaison ont été définis: un intervalle de liaison minimal de 12 cM en considérant non porteur l'individu III-10 et un intervalle de liaison maximale de 27cM en le considérant comme porteur. (Figure 54).

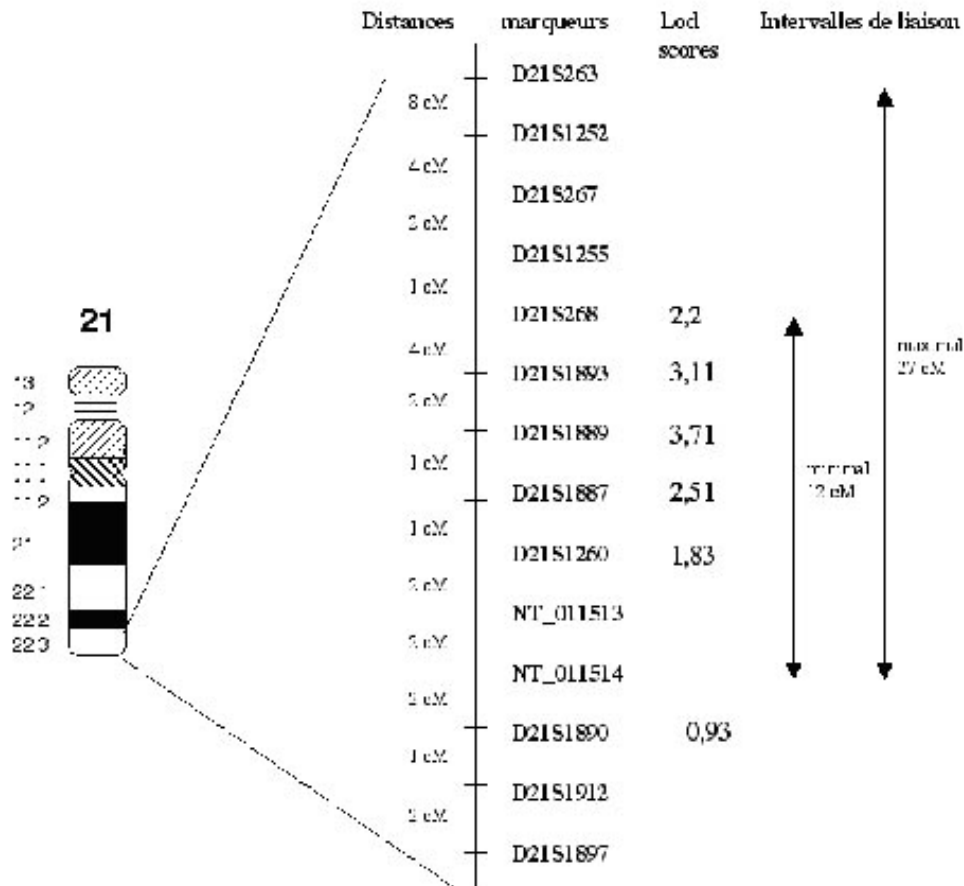


Figure 54: Représentation schématique de l'intervalle de liaison génétique du locus de Brugada sur le chromosome 21. Ce schéma montre les marqueurs microsatellites utilisés pour l'analyse de liaison génétique, les distances qui les séparent, et les valeurs de lod score obtenus pour certains marqueurs. En fonction du statut phénotypique de l'individu recombinant III-10, deux intervalles de liaison ont été définis: un intervalle de liaison minimal de 12 cM en considérant non porteur l'individu III-10 et un intervalle de liaison maximale en le considérant comme porteur.

Par séquençage direct, nous avons testé un certain nombre de gènes situés dans l'intervalle de liaison génétique en raison de leur rôle physiopathologique potentiel ou de leur expression cardiaque. Six gènes localisés dans l'intervalle de liaison maximale ont été séquencés en raison de leur rôle physiopathologique potentiel dans la maladie (KCNE1, KCNE2, KCNJ6, KCNJ15, SH3BGR, WRB). Les gènes *KCNE1* et *KCNE2* codant les protéines minK et MiRP1 respectivement sont localisés entre les marqueurs D21S263 et D21S1252. Ces protéines sont

principalement des sous-unités β régulatrices des canaux potassiques KVLQT1 et HERG, mais pourraient moduler d'autres canaux (Abbott G. W. et al. 1999; Sanguinetti M. C. et al. 1996).

Les gènes *KCNJ6* et *KCNJ15*, localisés entre les marqueurs D21S267 et D21S1255 codent les sous-unités Kir3.2 et Kir4.2 respectivement. Les canaux de la famille Kir (inward rectifier) seraient impliqués dans la régulation du potentiel de repos membranaire, mais la fonction exacte de ces canaux n'est pas encore connue. Ce sont des canaux à deux segments transmembranaires de 423 et 375 acides aminés respectivement (Gosset P. et al. 1997; Sakura H. et al. 1996).

Le gène *WRB* (tryptophan rich basic protein), encore appelé *CHD5* (congenital heart disease 5 protein) code une protéine basique de 174 acides aminés dont la fonction est actuellement inconnue. Cette protéine, localisée au niveau du noyau cellulaire, pourrait intervenir dans les processus transcriptionnels et dans la morphogénèse cardiaque (Egeo A. et al. 1998).

L'ensemble de ces gènes candidats ont été séquencés mais aucune mutation n'a été identifiée.

D'autres gènes présents dans la région ont été séquencés après que nous ayons vérifié leur expression cardiaque par RT-PCR. Il s'agissait des gènes *SH3BGR* (SH3 domain binding glutamic acid-rich protein), *DSCAM* (Down syndrome cell adhesion molecule), *DIK* (PKC-Delta- Interacting protein Kinase), (*ANKRD3*) ou *PKK* (Protein Kinase C-associated Kinase) et les gènes prédits PRED 42, PRED 44.

Le séquençage de ces gènes n'a pas retrouvé de mutation.

Après la réalisation de ce travail de génétique, nous sommes parvenus à identifier une nouvelle branche familiale. Dans cette branche, une femme était porteuse de l'haplotype morbide et l'avait transmis à deux de ses filles. La mère était traitée par flécaine au long cours pour une fibrillation auriculaire paroxystique mais son électrocardiogramme ne montrait pas d'aspect en faveur d'un SB. Cette patiente étant déjà traitée par un bloqueur sodique, nous n'avons pas réalisé de test. Nous avons réalisé le test avec les bloqueurs sodiques chez ses deux filles porteuses de l'haplotype. Dans les deux cas, l'électrocardiogramme de base était normal et l'injection de flécaine n'a pas entraîné de modification en faveur d'un SB.

II.C.1.c.3. Résumé des résultats.

Plusieurs enseignements peuvent être tirés de l'analyse de cette famille. Tout d'abord, l'absence de co-ségrégation entre le phénotype SB et la mutation identifiée dans le gène *SCN5A* montre que la présence d'une mutation sur ce gène chez un patient atteint un SB ne permet pas de conclure à la responsabilité de cette mutation.

D'autre part, l'analyse de cette famille nous a permis d'identifier un nouveau locus situé sur le chromosome 21. Cependant la recherche de mutation dans les gènes candidats compris dans l'intervalle de liaison ne nous a pas permis, jusqu'à présent, d'identifier le gène responsable.

L'identification d'une branche familiale dans laquelle trois femmes bien que porteuses de l'haplotype morbide ne sont pas atteintes du SB doit nous nous amener à nous interroger sur la validité de ce locus. Cependant, il est connu que la pénétrance du SB est faible (que ce soit pour le gène *SCN5A* ou pour le 2e locus identifié sur le chromosome 3) et il est fréquent dans les familles d'identifier des femmes non atteintes et qui pourtant sont transmettrices obligatoires de la mutation.

Cette branche familiale non-atteinte, bien que porteuse de l'haplotype morbide ne permet donc pas actuellement d'éliminer le locus identifié. Seule l'identification de la mutation causale dans cette famille permettrait de valider le locus.

II.C.2. Analyse globale des familles mutées sur le gène SCN5A.

Comme l'a montré l'étude des familles précédentes, les relations génotypes-phénotypes ne sont pas simples dans le SB.

Nous avons analysé globalement ces relations sur l'ensemble des familles dont nous disposons. Pour qu'une famille soit incluse dans l'étude il fallait que le propositus soit atteint d'un SB et porteur d'une mutation dans le gène *SCN5A* et qu'au moins trois membres de la famille soit porteur de la même mutation.

Huit familles remplissaient ces conditions représentant 58 patients porteurs d'une mutation de *SCN5A* (25 hommes et 33 femmes). Les mutations étaient les suivantes : c.3816delG, c.3963+2T→C, c.1603C→T, c.4295G→T, c.2254G→A, c.674C→T, c.4372 G→T et c.5015C→A.

Pour deux patients mutés nous n'avons pas pu obtenir d'ECG et leur statut phénotypique n'a donc pas pu être établi.

Un aspect spontané de SB était présent chez 16 patients (8 hommes et 8 femmes) et révélé au cours d'un test utilisant les bloqueurs sodiques chez 9 patients (4 hommes et 5 femmes). Chez 31 patients aucun aspect de SB n'a été retrouvé (14 hommes et 18 femmes). Le test par les bloqueurs sodique n'a pas été réalisé chez 14 patients considérés comme non-atteint du SB en raison de troubles de la conduction trop sévères dans 5 cas, parce que les patients étaient trop jeunes dans 7 cas (âge inférieur à 15 ans) ou parce que le patient a refusé le test (2 cas).

Des troubles de la conduction étaient retrouvés chez 37 patients (18 hommes et 19 femmes).

La pénétrance du SB est faible spontanément 32% chez les hommes et 25% chez les femmes, après le test à la flécaïne elle augmente à 48% chez les hommes et 42% chez les femmes (Tableau 6). Si on évalue uniquement les patients qui ont bénéficié d'un test aux bloqueurs sodique la pénétrance du SB est de 57%.

	Avant classe I			Après classe I		
	Homme	Femme	Total	Homme	Femme	Total
Phénotype Brugada	8 (32%)	8 (25%)	16 (28%)	12 (48%)	13 (42%)	25 (44%)
Pas de phénotype Brugada	17 (68%)	23 (75%)	40 (72%)	13 (52%)	18 (58%)	31 (56%)

Tableau 6 : Pénétrance de l'aspect électrocardiographique de SB chez les patients porteurs d'une mutation dans le gène SCN5A et issus de familles atteintes d'un syndrome de Brugada.

En revanche, la fréquence des troubles de la conduction dans cette population est élevée puisque, en incluant les patients porteurs d'un bloc incomplet droit, des troubles de la conduction sont retrouvés chez 45 des 56 patients de l'étude pour lesquels un ECG était disponible.

	Morphologie des QRS					
	Normal	Bloc incomplet droit	Bloc complet droit	Bloc de branche gauche	Hémibloc	Bloc pariétal
Homme	3 (12%)	9 (36%)	9 (36%)	0	0	4 (16%)
Femme	7 (22%)	8 (26%)	9 (29%)	1 (2%)	2 (6%)	4 (13%)
Total	10 (18%)	17 (30%)	18 (32%)	1 (1%)	2 (4%)	8 (14%)

Tableau 7 : Aspect électrocardiographique des patients porteurs d'une mutation dans le gène SCN5A et issus de familles atteintes d'un syndrome de Brugada.

Les anomalies de la conduction retrouvée le plus souvent étaient des blocs de branche droit (Tableau 7).

L'âge moyen des patients de l'étude était de 38 ± 21 ans chez les patients mutés et de 44 ± 20 ans chez les patients non-mutés (ns).

La pénétrance des troubles de la conduction dans cette population étaient de 80 % si l'on inclut les blocs incomplets de la branche droite et de 50 % si l'on ne considère pas les blocs incomplets de la branche droite.

Sur cette population, la durée du PR était de 199 ± 35 ms chez les patients mutés et de 157 ± 24 ms chez les patients non-mutés ($p < 0.0001$). La durée du QRS était de 113 ± 18 ms chez les patients mutés et de 93 ± 12 ms chez les patients non-mutés ($p < 0.0001$).

La durée du PR et des QRS augmente progressivement avec l'âge dans cette population. Le PR augmente de 0,70 millisecondes par an chez les patients mutés et 0,33 ms par an chez les patients non-mutés (ns).

PR (ms)

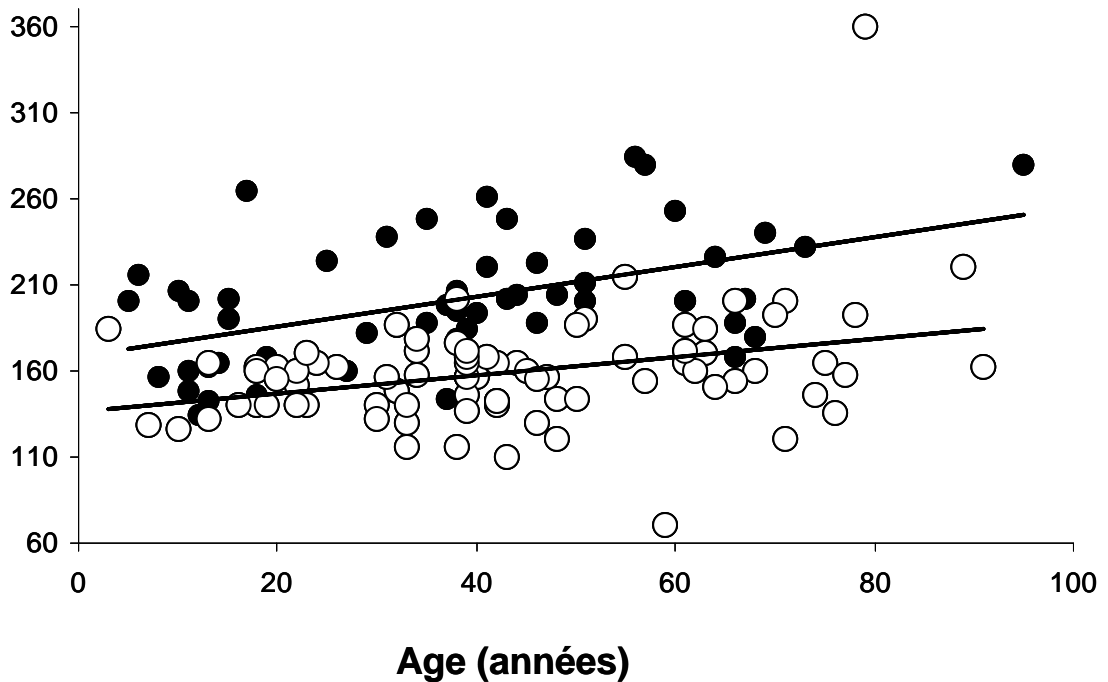


Figure 55 : Evolution de la durée du PR en fonction de l'âge. Les sujets mutés (n=56) sont représentés par des cercles noirs et les sujets non mutés (n=68) sont représentés par des cercles

blancs.

Le QRS augmente de 0,28 ms par an chez les patients mutés et 0,21 ms par an chez les patients non-mutés (ns).

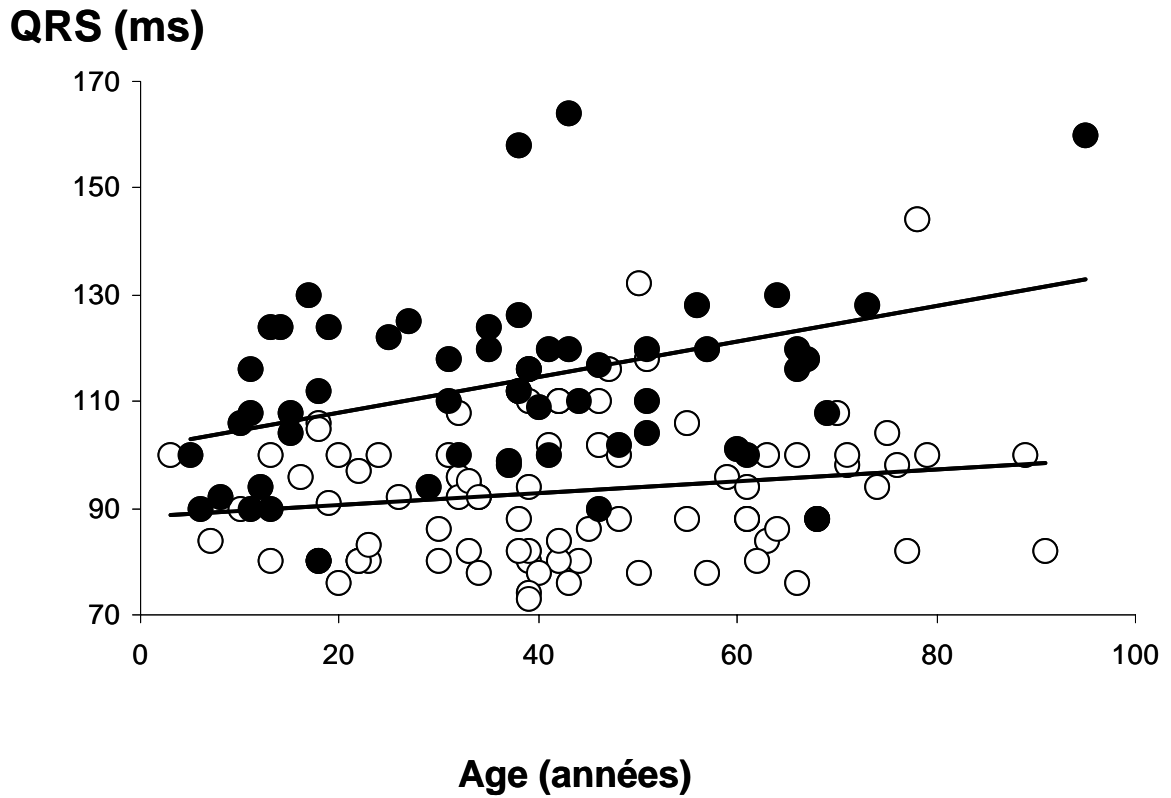


Figure 56 : Evolution de la durée du QRS en fonction de l'âge. Les sujets mutés (n=56) sont représentés par des cercles noirs et les sujets non mutés (n=68) sont représentés par des cercles blancs.

II.C.3. Analyse des familles non-liées au gène SCN5A.

Notre travail pour tenter d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le SB nous a amené à identifier plusieurs grandes familles atteintes de cette pathologie et pour lesquelles le séquençage du gène *SCN5A* n'a pas montré de mutation.

II.C.3.a. Analyse phénotypique.

II.C.3.a.1. FAMILLE W.

Cette famille (Figure 57) a été recrutée en 2000 à Strasbourg. Le propositus (individu III-8) âgé de 50 ans, a bénéficié d'un ECG systématique, montrant un aspect typique de SB. L'interrogatoire retrouvera secondairement la notion de réveils nocturnes avec palpitations et sensation de mort imminente mais sans perte de connaissance. Ces symptômes peuvent être potentiellement en rapport avec un trouble du rythme paroxystique. Le test à la flécaïnide, réalisé dans le cadre du bilan de SB, a entraîné une majoration du sus-décalage du ST, ce dernier disparaît sous isoprénaline (Figure 57). La stimulation ventriculaire a induit une tachycardie ventriculaire. Un défibrillateur automatique a été implanté. Aucun choc électrique n'a été délivré depuis l'implantation.

Sur le plan familial, un des oncles maternels du patient (individu II-3) est décédé subitement à 41ans. Six autres membres de la famille présentent un test à la flécaïnide positif. L'individu II-4 n'a pas eu de test du fait de son âge, il s'agit cependant d'une transmettrice obligatoire comme l'individu II-1, qui à priori est porteur "sain". L'individu III-9 a un ECG de base normal, mais n'a pas reçu de flécaïnide (refus). On ne peut donc pas éliminer formellement un SB pour cette personne. L'enquête familiale n'a pu être poursuivie.

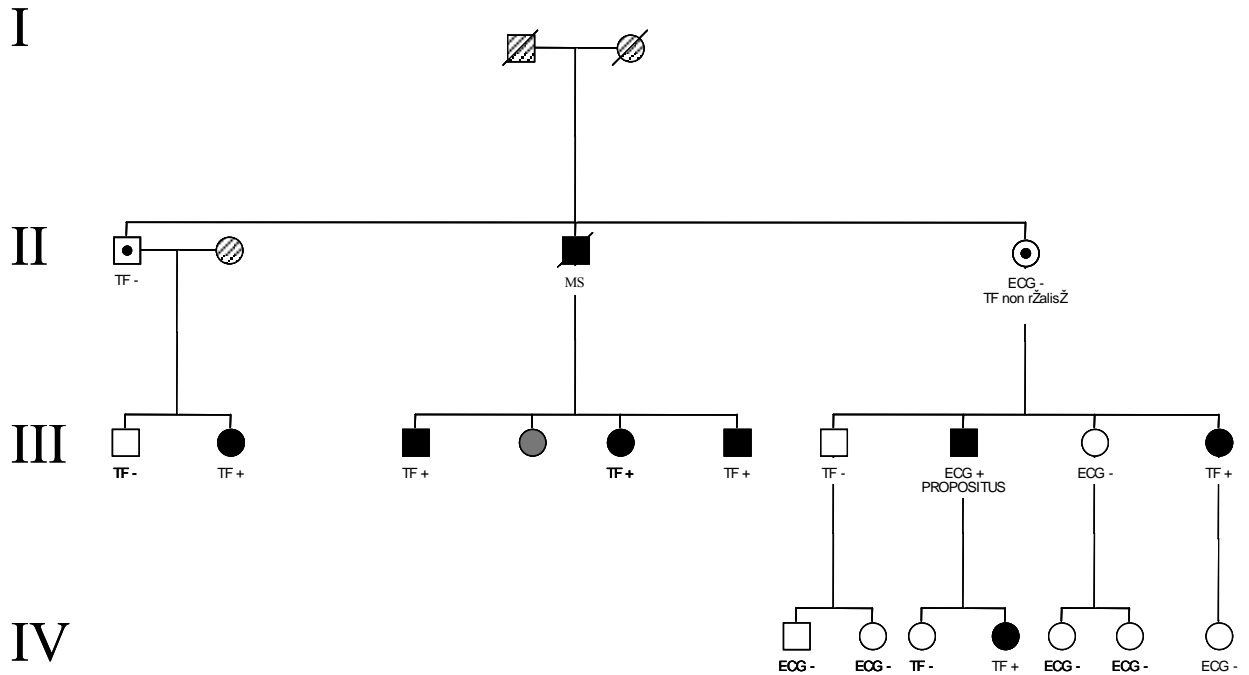


Figure 57 : Arbre généalogique de la famille W. Les individus en blanc sont sains, ceux en gris sont douteux et ceux en noir sont atteints. ECG+ signifie que le patient a un ECG caractéristique de SB sur l'ECG de base, TF+ signifie que le test à la flécaïne a permis de révéler le SB.

II.C.3.a.2. FAMILLE M.

Cette famille (Figure 58) localisée à l'Ile de la Réunion, de race blanche, a été explorée à la suite du décès brutal de l'individu II-6. Il est décédé pendant un repas, à l'âge de 43 ans. Son frère jumeau monozygote (individu II-7), le propositus, présentait un ECG de base évocateur d'un SB. Le test à la flécaïnide était positif, par contre, la stimulation ventriculaire n'a déclenché aucun trouble rythmique. Malgré la négativité de ce test, en raison du contexte familial, un défibrillateur a été implanté. Cinq autres individus sont aussi atteints du syndrome. L'individu II-8, dont la stimulation ventriculaire programmée était positive (Tachycardie ventriculaire polymorphe puis fibrillation), est aussi porteur d'un défibrillateur (aucun choc après 10 mois de suivi). L'individu III-4 est symptomatique avec notion de malaises syncopaux, mais son exploration électrophysiologique est négative. Son Holter ECG était normal, un Reveal® (Holter)

a été implanté. Il montre des pauses sinusales non symptomatiques. L'origine des syncopes reste indéterminée : dysfonction sinusale ou trouble du rythme ? Aucune décision thérapeutique n'a encore été prise, poursuite du suivi par Reveal®.

Bien que les individus III-11 et III-12 soient des jumeaux monozygotes, leur phénotype est différent, cela démontre bien les difficultés de diagnostic de ce syndrome. Comme dans la famille I, on retrouve un transmetteur obligatoire, à priori porteur sain (II-3). Par ailleurs, les individus I-1 et I-2 ont un ECG de base et après sensibilisation négatif, ce qui limite la poursuite de l'étude familiale. Cependant au moins 2 personnes étant atteintes dans la génération II, l'un des 2 individus de la génération I est transmetteur.

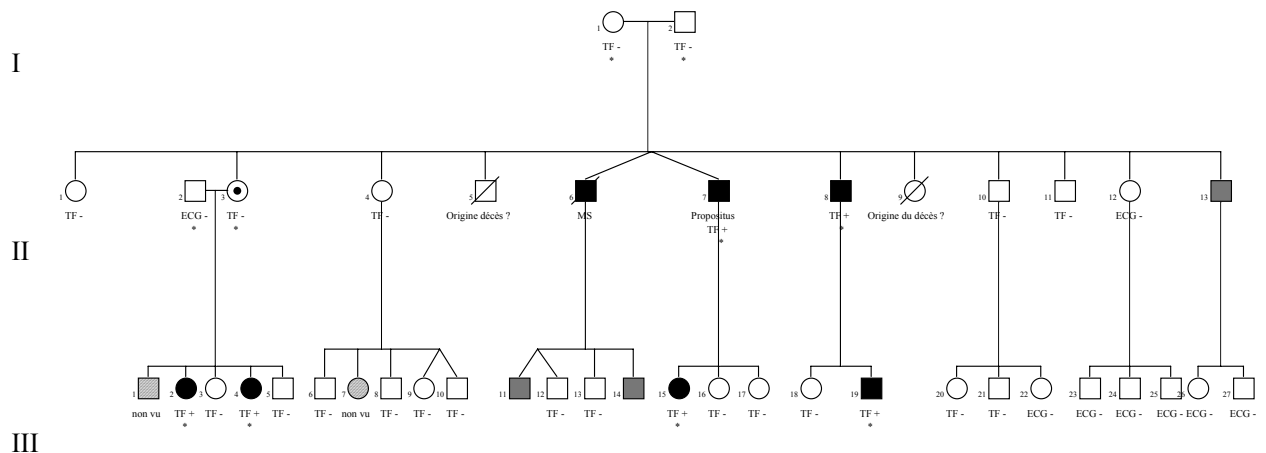


Figure 58 : Arbre généalogique de la famille M. Les individus en blanc sont sains, ceux en gris sont douteux et ceux en noir sont atteints. ECG+ signifie que le patient a un ECG caractéristique de SB sur l'ECG de base, TF+ signifie que le test à la flécaïne a permis de révéler le SB. Les individus représentés en hachuré ont refusé les explorations.

II.C.3.a.3. FAMILLE JU.

Le propositus, âgé de 27 ans, a consulté un cardiologue pour exploration d'un souffle, en fait anorganique. Par contre, l'ECG standard étant douteux avec un bloc de branche droite incomplet et un sus-décalage minime du segment ST. Un enregistrement dans le 3^{ème} espace intercostal a été fait, montrant un sus-décalage du segment ST, typique d'un SB. A l'interrogatoire on retrouve la notion de malaises d'allure vagale mais aussi d'une perte de

connaissance plus sévère de plusieurs minutes, brutale, au repos, ayant fait suite à une prise d'alcool et de cannabis. Il peut s'agir d'une forme sévère de malaise vagal, mais aussi d'un trouble du rythme ventriculaire.

Une exploration électrophysiologique a été réalisée d'emblée. Une fibrillation a été déclenchée lors de la stimulation ventriculaire, au niveau de l'infundibulum pulmonaire, après 2 extrastimuli (S1S2=240ms, S2S3=200ms). Les examens n'ont pas montré d'anomalie morphologique cardiaque. Le défibrillateur implanté en novembre 2001 n'a jamais été activé, après 2 ans de suivi aucun trouble de rythme ventriculaire n'a été détecté.

L'enquête familiale a dépisté dans l'entourage proche 5 autres sujets atteints, dont la mère du propositus, individu IV-7, qui présente sous flécaïnide un ECG typique dans les dérivations précordiales hautes. Parmi ces personnes, seul l'individu V-1, qui signalait des malaises avec palpitations au repos, a eu une exploration électrophysiologique. L'ECG de base étant normal, l'exploration n'ayant déclenché aucun trouble du rythme, l'indication d'un défibrillateur n'a pas été retenue. L'enquête s'est ensuite orientée vers le grand-père maternel du propositus. Sa grand-mère maternelle (III-1) avait un test à la flécaïnide négatif. Nous avons pu retrouver un ECG de son grand-père décédé à 54 ans (individu III-2), celui-ci montrant un bloc incomplet droit, nous nous sommes orientés vers cette branche familiale. Le test à la flécaïne d'une des sœurs de l'individu III-2 (individu III-7) est positif, confirmant l'hypothèse que le transmetteur était le grand-père maternel. Lorsque les examens sont douteux, les enfants sont vus systématiquement. Si l'un d'eux est atteint, le parent douteux peut lui aussi être considéré atteint. La notion de la mort subite nocturne de l'individu III-20 à 55 ans a orienté la suite de notre enquête familiale et nous a permis de dépister un autre sujet atteint. La cause du décès de l'individu III-20 reste indéterminée. En effet nous n'avons pu retrouver d'ECG, il n'avait pas de descendance et son frère (individu III-21) semble indemne. Nous sommes donc en présence d'une famille comportant 8 sujets atteints sur 3 générations.

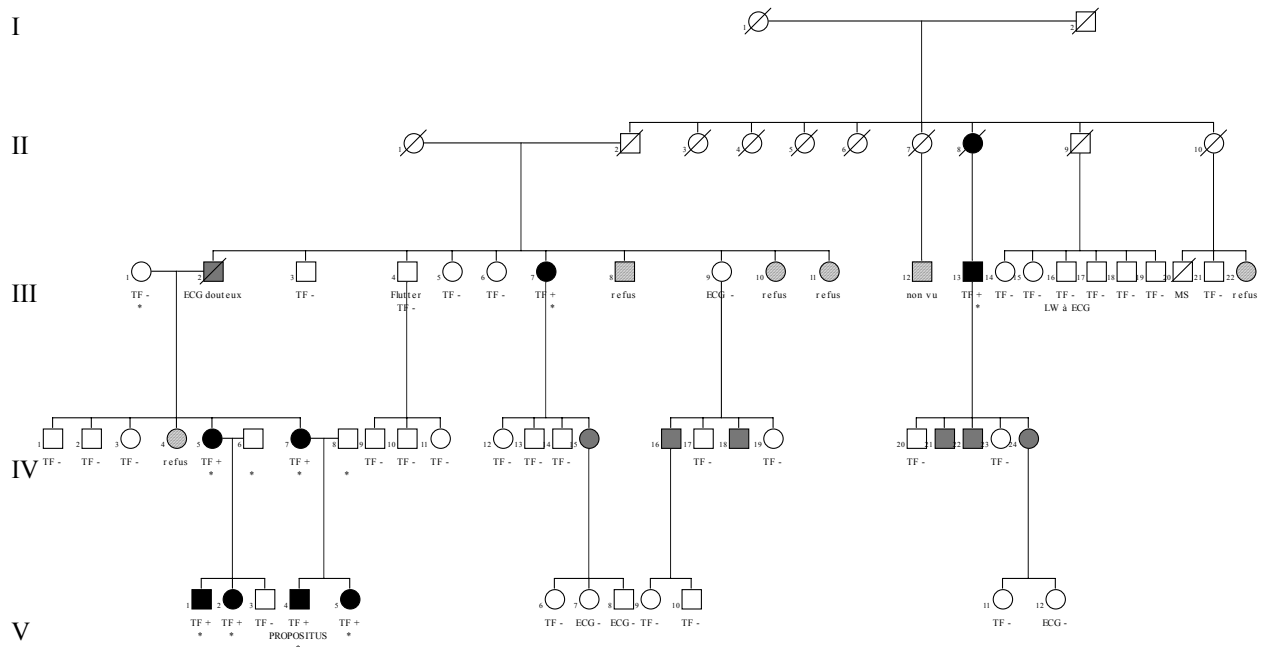


Figure 59 : Arbre généalogique de la famille JU. Les individus en blanc sont sains, ceux en gris sont douteux et ceux en noir sont atteints. ECG+ signifie que le patient a un ECG caractéristique de SB sur l'ECG de base, TF+ signifie que le test à la flécaine a permis de révéler le SB. Les individus représentés en hachuré ont refusé les explorations.

II.C.3.b. Analyse de biologie moléculaire.

II.C.3.b.1. Analyse gène candidat.

Pour l'ensemble de ces familles, différents gènes pouvant être considérés comme de bons candidats ont été éliminés soit par séquençage, soit par génotypage. Aucune mutation n'a été retrouvée dans les gènes *SCN5A*, *KCND2*, *KCND3*, *KCNE2*, *KCNIP2*. Le deuxième locus sur le chromosome 3 décrit par Weiss a également été éliminé sur ces différentes familles (Weiss R. et al. 2002).

II.C.3.b.2. Analyse de liaison sur génome entier

En raison de la faible pénétrance supposée du SB ; deux lod-scores différents, lod-scores

théoriques maximum ($Z(\max)\theta=0\%$), ont été calculés pour chaque famille. Le premier pour la famille entière, avec les sujets supposés sains, atteints et les douteux (lod-score A). Le second, en ne prenant en compte que les sujets atteints ou utiles pour l'analyse de liaison (lod-score B).

Les lod-scores théoriques B des trois familles sont tous inférieurs à 3. pour cette raison, nous avons utilisé une approche visant à additionner les lod score en partant de l'hypothèse que le gène morbide pouvait être identique dans plusieurs familles. Cette approche avait déjà montré son efficacité pour l'identification du locus de fibrillation auriculaire (Brugada R. et al. 1997). Le lod-score B des trois familles additionnés est supérieur à 3, d'où l'intérêt de cette analyse simultanée des 3 familles.

L'analyse de liaison sur l'ensemble du génome, n'a retrouvé aucun locus lié sur les trois familles. Les zones communes à 2 familles, potentiellement liées ou non informatives et la seule zone non informative pour les 3 familles simultanément, sont classées dans le tableau suivant :

	FAMILLE I	FAMILLE II	FAMILLE III
D1S450			
D1S2697	Z _{max} =0,78 θ = 0%		
D3S1614			
D5S416	Z _{max} =1,22 θ = 0%		
D5S471			
D6S289	Z _{max} =1,44 θ = 0%		
D7S484			
D7S519			
D9S1826			
D12S336			
D13S218			
D14S985			
D18S464			


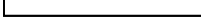

 Marqueur possiblement lié  Marqueur non lié
 Marqueur non informatif Z_{max} : Lod-score B
θ : % de recombinaison

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des marqueurs non informatifs ou liés communs à au moins 2 familles.

Cette approche cumulative sur trois familles ne nous a donc pas actuellement permis d'identifier de nouveaux locus pour le SB. L'échec de cette approche peut être du soit au fait que le SB soit génétiquement très hétérogène et que le gène morbide soit différent dans chacune de ces familles. Il est également possible qu'il puisse y avoir des erreurs dans la classification phénotypique des patients. En effet, même si l'analyse génétique n'a porté que sur les sujets considérés comme atteints, certains d'entre eux n'avaient un aspect électrocardiographique de SB qu'après l'injection de bloqueurs du canal sodique. Il est possible que ce test puisse être à l'origine de faux positifs qui peuvent fortement influencer les résultats de l'analyse de liaison.

II.C.4. Relation génotype-phénotype dans le syndrome de Brugada.

II.C.4.a. Fichier collaboratif.

II.C.4.a.1. Critères ECG prédictifs d'une mutation SCN5A.

Dans un premier travail, nous avons cherché à identifier les critères électrocardiographiques permettant de prédire, parmi les patients qui étaient atteints d'un SB quels étaient ceux qui seraient porteurs d'une mutation dans le gène *SCN5A*. Les mutations dans le gène *SCN5A* n'étant retrouvées que chez 15 à 30% des patients atteints d'un SB, il était intéressant de pouvoir distinguer les patients mutés afin de pouvoir mieux choisir ceux pour lesquels le séquençage du gène est indiqué.

Dans ce travail, seuls les cas index étaient retenus. Le diagnostic de SB était retenu lorsque l'ECG montrait un aspect de sus-décalage du segment ST convexe ou triangulaire dans les dérivations précordiales droites de plus de 2 mm sur l'ECG de base ou lors du test utilisant les bloqueurs sodiques conformément à la conférence de consensus (Wilde A. A. et al. 2002).

Soixante dix sept patients ont été inclus, tous ont bénéficié d'une étude du gène *SCN5A*, soit par séquençage direct ou plus fréquemment par SSCP ou DHPLC avec séquençage du gène en cas de conformation anormale (Smits J. P. et al. 2002).

Parmi les 77 patients inclus 23 avaient une mutation dans le gène *SCN5A*. Les caractéristiques cliniques de cette population sont rapportées (Figure 60). Avant le test aux bloqueurs sodiques la seule différence significative entre les patients mutés et non-mutés est la présence d'un intervalle PR et d'un intervalle HV plus long chez les patients mutés (Figure 61).

	Brugada Patients With SCN5A Mutation	Brugada Patients Without SCN5A Mutation	p Value
Total (n)	23	54	—
Gender (m/f)	15/8	44/10	NS
Age (yrs)	45 ± 15	48 ± 11	NS
Family history + Index event	11/23 (48%)	24/54 (44%)	NS
VF/VT	6/23 (26%)	15/54 (28%)	NS
Syncope	8/23 (35%)	19/54 (35%)	NS
Asymptomatic	7/23 (30%)	15/54 (28%)	NS
Others*	2/23 (9%)	5/54 (9%)	NS
Baseline ECG (n)	23	54	—
Heart rate (beats/min ⁻¹)	67 ± 15	71 ± 12	NS
PQ interval (ms)	209 ± 51	163 ± 24	<0.0001
QRS duration (ms)	110 ± 24	102 ± 22	NS
QTc interval (ms ^{1/2})	405 ± 31	400 ± 35	NS
ST-segment elevation (mm)	2.5 ± 1.3	1.9 ± 1.3	NS
Electrophysiologic testing (n)	8	38	—
VT/VF inducible	6/8 (75%)	27/38 (71%)	NS
HV time	66 ± 13	48 ± 9	< 0.001

Figure 60 : Caractéristiques cliniques de la population étudiée. HV = Temps de conduction du faisceau de His aux ventricules lors de l'enregistrement endocavitaire. VF = ventricular fibrillation; VT = ventricular tachycardia.

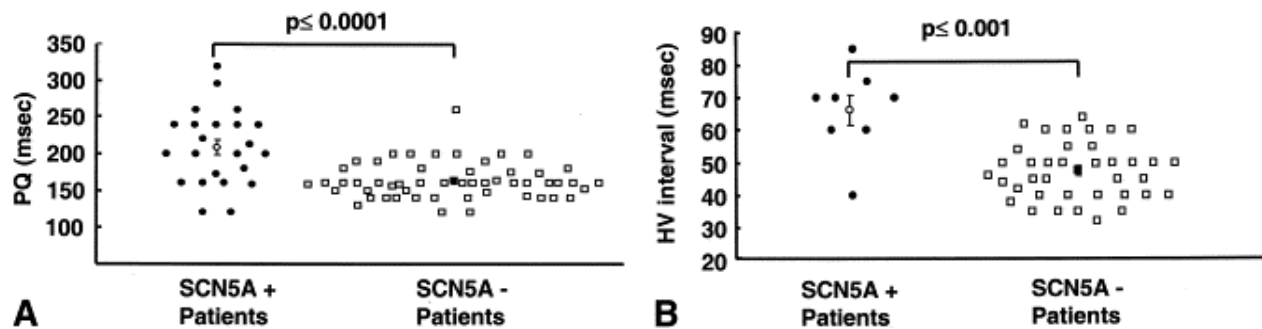


Figure 61 : Les patients mutés sur le gène SCN5A ont un intervalle PR et un intervalle HV significativement plus long (Smits J. P. et al. 2002).

L'évolution des paramètres électrocardiographiques a également été évaluée lors du test avec les bloqueurs sodiques. Au cours de ce test le PR et le QRS augmentent chez les patients mutés et non mutés. L'augmentation de la durée du PR n'est pas différente entre les deux groupes mais la durée du PR reste significativement plus longue chez les sujets mutés. En revanche, l'augmentation de la durée du QRS est significativement plus importante chez les sujets mutés (38+/- 31 contre 18+/- 18 ms p<0.05) et la différence de durée du QRS entre les deux groupes devient significative (*Figure 62*).

	Brugada Patients With SCN5A Mutation	Brugada Patients Without SCN5A Mutation	p Value
ECG before class I antiarrhythmic drug			
(n)	11	42	—
HR (beats/min ⁻¹)	65 ± 16	72 ± 12*	NS
PQ interval (ms)	195 ± 40*	164 ± 27‡	< 0.005
QRS duration (ms)	104 ± 26†	100 ± 17‡	NS
QTc interval (ms ^{1/2})	402 ± 28	405 ± 34‡	NS
ST-segment elevation (mm)	2.3 ± 1.6†	1.8 ± 1.0‡	NS
ECG after class I antiarrhythmic drug			
(n)	11	42	—
HR (beats/min ⁻¹)	72 ± 17	76 ± 13*	NS
PQ interval (ms)	222 ± 37*	195 ± 33‡	< 0.05
QRS duration (ms)	142 ± 31†	118 ± 21‡	< 0.05
QTc interval (ms ^{1/2})	426 ± 60	431 ± 40‡	NS
ST-segment elevation (mm)	4.5 ± 1.1†	3.9 ± 1.2‡	NS
Difference in ECG parameters after class I antiarrhythmic drug			
(n)	11	42	—
ΔHR (beats/min ⁻¹)	10 ± 15	4 ± 12	NS
ΔPQ interval (ms)	26 ± 28	32 ± 21	NS
ΔQRS duration (ms)	38 ± 31	18 ± 18	< 0.05
ΔQTc interval (ms ^{1/2})	23 ± 64	27 ± 40	NS
ΔST-segment elevation (mm)	2.2 ± 1.4	2.1 ± 1.3	NS

Figure 62 : Evolution des paramètres électrocardiographique lors du test avec les bloqueurs sodiques (Smits J. P. et al. 2002).

Dans un deuxième temps, nous avons recherché le meilleur critère prédictif de la présence d'une mutation dans le gène *SCN5A*.

Un intervalle PR supérieur ou égal à 210 ms permet de prédire la présence d'une mutation dans le gène *SCN5A* avec une sensibilité de 48% et une spécificité de 98%. De même, un intervalle HV supérieur ou égal à 60 ms prédit la présence d'une mutation de *SCN5A* avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 82% (Figure 63).

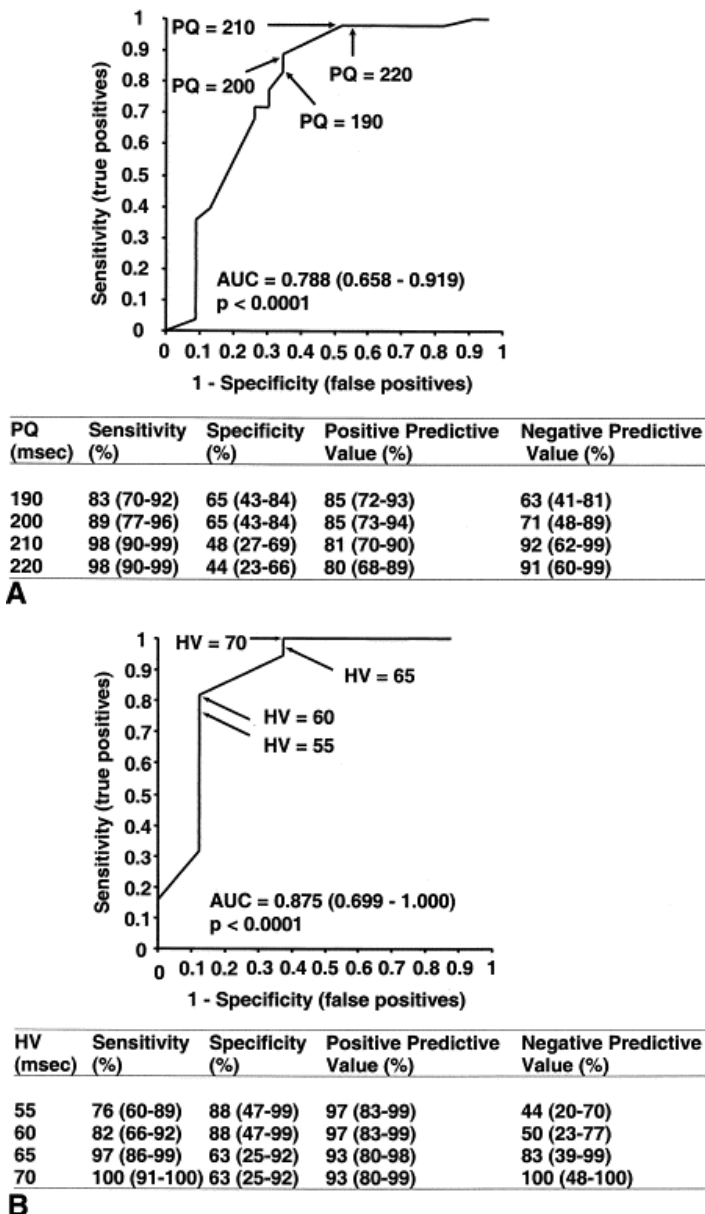


Figure 63 : Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des différentes valeurs de PR et de HV pour prédire la présence d'une mutation dans le gène *SCN5A* (Smits J. P. et al. 2002).

Ce travail a montré qu'il est possible de prédire la présence d'une mutation dans le gène SCN5A en fonction de critères électrocardiographiques simples.

Cette approche sera particulièrement importante lorsque plusieurs gènes responsables du SB seront identifiés car elle permettra, comme pour le syndrome du QTL de prédire le gène morbide chez un individu et donc de faciliter la recherche du gène en cause.

II.C.4.a.2. Pronostic à long terme du syndrome de Brugada.

Actuellement, le pronostic à long terme des patients atteints d'un SB reste mal connu. L'attitude thérapeutique chez ces patients est essentiellement basée sur les données de deux fichiers, l'un tenu par Brugada et coll l'autre par l'équipe de Sylvia Priori (Brugada J. et al. 2002; Priori S. G. et al. 2002a). Cependant, les résultats de ces fichiers sont contradictoires pour plusieurs points essentiels. Le fichier de Brugada et coll retrouve un taux élevé d'événements chez les patients atteints d'un SB et cela même chez les patients initialement asymptomatiques alors que le fichier de Priori et coll retrouve un taux faible d'événements dans cette population. De plus, ces deux fichiers divergent également quant à la valeur prédictive de l'exploration électrophysiologique. Ce point est particulièrement crucial puisque actuellement, basé sur les résultats du fichier de Brugada et coll, tous les patients chez lesquels un trouble du rythme grave est induit pendant l'exploration électrophysiologique bénéficient de l'implantation d'un défibrillateur automatique. Cette attitude ne semble pas fondée d'après les résultats du fichier de Priori et coll.

Le but de ce travail collaboratif était à partir d'un grand fichier de patients atteints d'un SB de tenter de réévaluer l'évolution à long terme des patients inclus ainsi que le pouvoir pronostique de l'exploration électrophysiologique. Notre but était également d'identifier les facteurs pronostiques permettant de définir les patients à risque rythmique dans le cadre du SB afin de pouvoir définir ceux qui doivent bénéficier de l'implantation d'un défibrillateur.

Les patients ont été répartis en trois groupes. Le groupe A représentait les patients qui avaient présenté un arrêt cardiaque, le groupe B concernait les patients qui avaient présenté une syncope et le groupe C était composé de patients asymptomatiques diagnostiqués au cours d'une enquête familiale ou lors d'un électrocardiogramme systématique.

Les courbes de survie ont été réalisées par la méthode de Kaplan-Meier et analysée par le test du log-rank.

Notre population est composée de 212 patients (152 hommes) atteints d'un SB. L'âge moyen des patients de l'étude était de 45 ± 6 ans. Au moment du diagnostic 123 (58 %) étaient asymptomatiques, 65 (31 %) avaient eu un épisode de syncope et 24 (11 %) avaient présenté un arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire (Tableau 9).

Cent soixante cinq patients (78 %) étaient des cas index alors que 47 patients (22 %) avaient été identifiés au cours d'une enquête familiale. Parmi les 24 patients qui avaient présenté un arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire 22 étaient des hommes. Cependant, la répartition du sexe était équivalente entre les patients symptomatiques et asymptomatiques.

Dans notre population 57 patients (27 %) étaient porteurs d'une mutation dans le gène *SCN5A*.

Parmi les patients index, 34 (21 %) avaient une histoire familiale de mort subite et 29 d'entre eux (17 %) étaient porteurs d'une mutation dans le gène *SCN5A*.

Présentation clinique	Mort subite	Syncope	Asymptomatique	P
No.	24	65	123	
(Cas Index)	-24	-56	-85	
Homme/femme	22/2	46/19	84/39	NS
(Cas Index)	(22/2)	(43/13)	(67/18)	
Age	45.7±10.8	45.6±15.6	43.8±14.4	NS
(Cas Index)	(45.7±10.9)	(46.1±15.0)	(46.8±13.0)	
ECG type I spontané	15	40	70	NS
(Cas Index)	-15	-38	-62	
Histoire familiale de mort subite	3	16	41	Ns
(Cas Index)	-3	-10	-21	
Histoire familiale de syndrome de Brugada	6	36	62	NS
(Cas Index)	-6	-28	-24	
EEP +	15	41	39	0.003
(Cas Index)	-15	-37	-34	
mutations de SCN5A	3	16	38	NS
(Cas Index)	-3	-12	-17	
Suivi en mois	83.2±66.4	38.9±37.3	33.7±52.2	0.0001
	(83.2±66.4)	(40.3±39.7)	(32.4±60.0)	

Tableau 9 : Résumé des caractéristiques de la population de notre étude.

Chez 125 patients (59 %), le SB avait été identifié avant le test par les bloqueurs sodique. Le sus-décalage du segment ST mesurait 2.3 ± 1.2 mm chez les patients symptomatiques (2.6 ± 1.4 mm dans le groupe A; 2.2 ± 1.2 mm dans le groupe B) alors qu'il ne mesurait que 1.9 ± 1.5 mm chez les patients asymptomatiques ($p=0.04$). La fréquence du sus-décalage du segment ST sur l'électrocardiogramme de base était identique chez les sujets symptomatiques (60 %) et asymptomatiques (55 %).

Cent quatre-vingt-six patients ont bénéficié d'une exploration électrophysiologique. Une tachycardie ventriculaire ou une fibrillation ventriculaire a pu être induite de chez 93 patients (50 %). La fréquence des arythmies induites était plus élevée chez les patients symptomatiques (63

%) que chez les patients asymptomatiques (30 %) ($p < 0.001$).

La moyenne de suivi des patients de l'étude était de 40 ± 50 mois. Le suivi était cependant plus long chez les patients ayant présenté une mort subite récupérée 83 ± 66 mois comparé aux patients qui avaient présenté une syncope 39 ± 37 mois et aux patients qui étaient asymptomatiques 34 ± 52 mois ($p = 0.0001$).

Au cours du suivi, 4 des 24 patients (17 %) qui avaient présenté un arrêt cardiaque ont eu un nouvel événement rythmique grave (tachycardie ventriculaire soutenue ou fibrillation ventriculaire). Chez les patients du groupe B, 4 des 65 patients (6 %) ont eu un événement rythmique. Chez les patients asymptomatiques, 1 parmi les 123 individus a eu un événement rythmique (1 %). La différence d'évolution de ces trois populations est statistiquement significative (Figure 64).

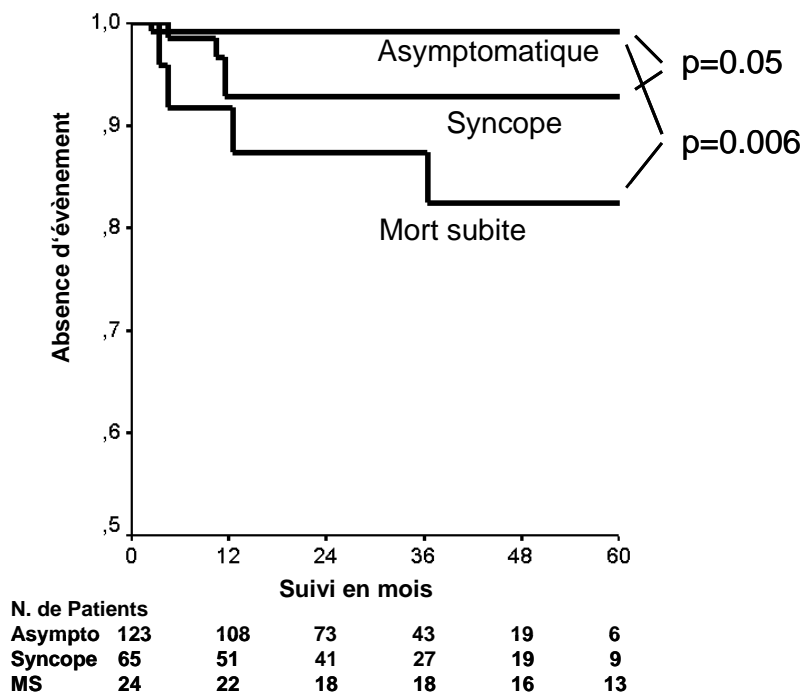


Figure 64 : Evolution à long terme des patients atteints d'un SB en fonction du mode de diagnostic.

Tous les patients, à l'exception d'un seul, qui ont eu un événement rythmique au cours du

suivi avaient un aspect électrocardiographique de SB sur électrocardiogramme de base.

Les neuf patients qui ont expérimenté un événement rythmique au cours du suivi avaient tous bénéficié d'une exploration électrophysiologique. Cette exploration avait déclenché un trouble rythmique grave chez quatre d'entre eux. Seul un de ces patients avait une histoire familiale de mort subite.

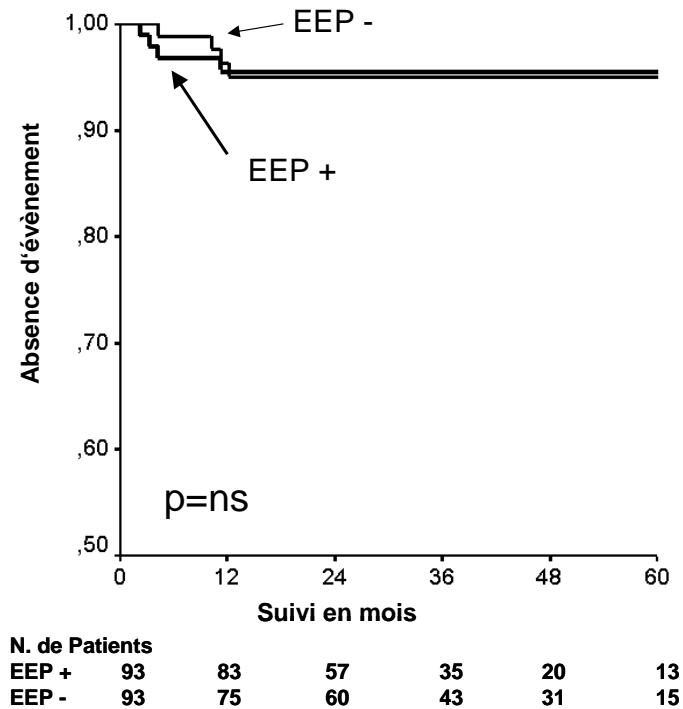
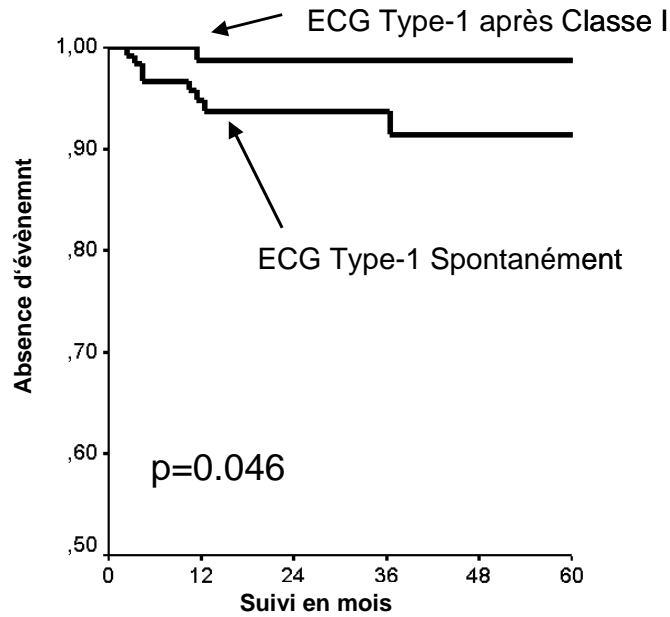


Figure 65 : Evolution des patients en fonction des résultats de l'exploration électrophysiologique. EEP : Exploration électrophysiologique.

L'analyse des courbes de survie des trois groupes montre que l'exploration électrophysiologique n'est pas prédictive du risque rythmique (Figure 65). En revanche, la présence d'un sus-décalage du segment ST sur électrocardiogramme de base est un élément prédictif du risque de survenue d'événements rythmiques (0.046) (Figure 66).

Notre étude a donc montré que la fréquence des événements rythmiques chez les patients atteints d'un SB était faible.

Le risque est plus élevé chez les patients qui ont présenté un arrêt cardiaque ou qui ont déjà fait des syncopes ainsi que chez les patients qui ont un aspect de SB spontanément. En revanche, l'exploration électrophysiologique ne semble pas être un critère prédictif du risque rythmique.



N. de Patients						
Class I	87	80	58	43	24	13
Spont	125	104	78	49	34	19

Figure 66 : Evolution en fonction de l'aspect ECG lors de l'inclusion.

En fonction de nos résultats, l'attitude habituellement préconisée visant à implanter un défibrillateur chez les patients pour lesquels l'exploration électrophysiologique a déclenché des troubles rythmiques ne semble pas être appropriée. Les raisons pour lesquelles nos résultats comme ceux de l'équipe de Priori et coll sont si différents de ceux de Brugada et coll restent difficiles à préciser (Tableau 10).

	Brugada et al. Circ 2002	Brugada et al. Circ 2003	Priori et al. Circ 2002	Fichier collaboratif
No. (Homme)	334 (255)	547 (408)	200 (152)	212 (152)
Index (Homme)		294	130 (110)	165(132)
Mort subite	71	0	22	24
Syncope	73	124	34	65
Asymptomatique	190	423	144	123
Age lors du diagnostic	42±16	41±15	41±18	45±6
Aspect ECG de syndrome de Brugada				
Spontanément	234 (70%)	391 (71%)	90 of 176 (51%)	125 (59%)
Après Classe I	100 (30%)	156 (29%)	86 (49%)	87 (41%)
Histoire familiale de mort subite	180 of 334 (54%)	302 of 547 (55%)	26 of 130 (22%)	60 of 212 (28%)
Mort subite	23 (38%)	0	na	3 (13%)
Syncope	26 (39%)	na	na	16 (25%)
Asymptomatique	131 (72%)	na	na	41 (33%)
SCN5A Mutation	na	na	28 (22%)	32(24%)
EEP	252	408	86	186
Patient inductible	130 (52%)	163 (40%)	57 (66%)	93 (50%)
ATCD de Mort subite	44 of 54 (83%)	na	18 (82%)	15 of 22 (68%)
Syncope	41 of 62 (68%)	na	na	40 of 65 (62%)
Asymptomatique	45 of 136 (33%)	na	na	38 of 98 (39%)
DAI	na	177 (32%)	Na	113 (53%)
Suivi en mois	33±39	24±33	34±44	40±50
Mort subite	54±54	na	na	83±66
Syncope	26±36	na	na	39±37
Asymptomatique	27±29	na	na	34±52
Evènement au cours du suivi	74 (39%)	45 (8%)	na	9 (4%)
Mort subite	44 (62%)	na	na	4 (17%)
Syncope	14 (19%)	na	na	4 (6%)
Asymptomatique	16 (8%)	na	na	1(1%)

Tableau 10 : Résultat de notre fichier collaboratif comparé aux principaux fichiers de la littérature.

II.C.4.b. Fichier du réseau Ouest.

Parallèlement au projet collaboratif avec les autres centres européens, nous avons développé notre propre fichier dans le cadre du réseau Ouest pour la prise en charge du SB.

Ce réseau inclus les CHU de Brest, Rennes, Angers, Tours, Poitiers, Bordeaux et Nantes.

Nous avons actuellement inclus 209 patients atteints d'un SB dont 141 propositus. Notre fichier comprend 151 hommes pour 58 femmes.

Le diagnostic de SB a été porté au cours d'un électrocardiogramme systématique dans 66 cas, dans 68 cas il s'agissait d'enquête familiale, les patients avaient présenté un arrêt cardiaque ou une syncope dans 48 cas enfin le diagnostic était porté dans 27 cas au cours d'un électrocardiogramme fait pour des symptômes sans rapport avec le SB (Figure 67).

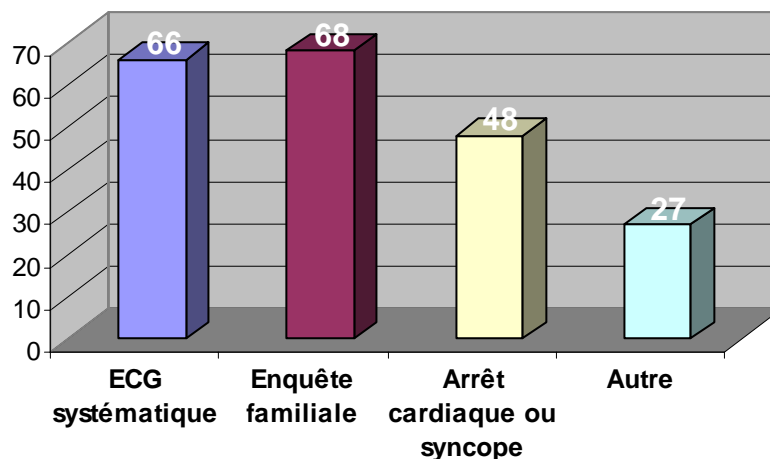


Figure 67 : Mode de diagnostic des patients atteints du SB inclus dans le réseau Ouest.

Le diagnostic de SB avait pu être porté dans 108 cas avant la réalisation du test utilisant les bloqueurs sodiques, dans 33 cas des anomalies électrocardiographiques n'étaient pas suffisantes pour affirmer le SB avant le test mais le diagnostic pouvait être suspecté. Enfin dans 68 cas l'électrocardiogramme de base était normal.

La recherche d'une mutation dans le gène SCN5A a été réalisée chez 70 propositus et a

permis d'identifier une mutation chez 22 (31 %) d'entre eux. La recherche d'une mutation est actuellement cours chez tous les autres propositus.

Chez les patients porteurs d'une mutation dans le gène *SCN5A* la durée du PR est significativement plus longue que chez les patients non-mutés (198 ± 33 contre 170 ± 20 ms $p < 0.001$). La durée du QRS est significativement allongée (117 ± 20 contre 105 ± 14 p= 0,01). L'augmentation de la durée du PR a été identique dans les deux groupes (39 ± 17 contre 35 ± 36 ms, ns) mais la durée du QRS augmente significativement plus chez les patients mutés (37 ± 30 contre 16 ± 15 ms $p < 0.001$) (Figure 68).

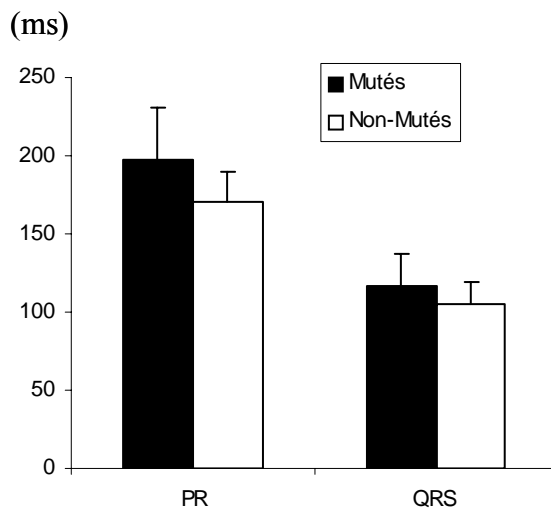


Figure 68 : Paramètres électrocardiographique des patients atteints d'un SB dans le réseau Ouest.

L'amplitude du sus-décalage n'était pas différente entre les deux groupes sur l'ECG de base ($2,7 \pm 1,8$ contre $2,4 \pm 1,8$ mm ; ns). L'augmentation de l'amplitude du sus-décalage du segment ST était également identique entre les deux groupes ($3 \pm 2,3$ contre $2,5 \pm 1,8$ mm ; ns).

Parmi l'ensemble des patients mutés (48 patients) et non-mutés (60 patients), 27 patients mutés et 44 patients non-mutés ont bénéficié d'une exploration électrophysiologique. Cette exploration a déclenché des troubles du rythme chez cinq patients mutés et chez 17 patients non-mutés. Le fait d'être porteur d'une mutation ne modifie pas le risque d'avoir une exploration électrophysiologique positive.

Un suivi les patients est actuellement disponible pour 104 patients parmi lesquels huit ont

eu des troubles du rythme. La durée moyenne de suivi a été de 33 ± 42 mois. Tous les patients qui ont eu des troubles du rythme pendant le suivi avaient un ECG de base qui montrait un SB. Ces patients avaient été inclus dans quatre cas pour syncope ou arrêt cardiaque, dans un cas au cours d'une enquête familiale, dans un cas pour la découverte du SB sur un électrocardiogramme systématique et dans deux cas pour une autre raison.

Sur ces huit patients qui avaient bénéficié d'une exploration électrophysiologique trois ont eu une récurrence de symptômes au cours du suivi. L'exploration était positive dans deux cas et négative dans un cas. Sept d'entre eux avaient bénéficié de l'implantation d'un défibrillateur automatique.

II.D. DISCUSSION.

II.D.1. L'implication du gène SCN5A dans les troubles de la conduction, le syndrome de Brugada et le syndrome du QT long congénital.

Afin de faciliter la compréhension de la physiopathologie supposée des troubles de la conduction et du SB, nous allons commencer par un faire un bref rappel de la structure ainsi que du fonctionnement supposé du canal sodique.

II.D.1.a. Structure du canal sodique.

Le gène *SCN5A* code pour la sous-unité α du canal sodique (260KD) dont elle forme le pore. Il existe également une sous-unité β (36KD) qui module l'activité de la sous-unité α . La sous-unité α est constitué par 4 domaines (I, II, III, IV), chaque domaine comporte six régions transmembranaires (S1-S6). La région S4 détecte les variations de voltage et modifie sa conformation permettant le passage des ions Na^+ .

Lorsque l'on représente le canal dans l'espace, la région S4 se trouverait au centre entourée par les régions S1-S3 et S5-S6. Le pore du canal est formé par les régions S5-S6. La porte d'inactivation se trouve sur la boucle qui lie les domaines III et IV.

II.D.1.b. Fonctionnement du canal sodique.

Le canal sodique est une protéine transmembranaire qui présente deux portes : une porte d'activation et une porte d'inactivation. Lorsque la cellule est dépolarisée, la porte d'activation s'ouvre et laisse passer les ions Na^+ à travers le canal. Immédiatement après la porte d'inactivation se ferme arrêtant ainsi le flux des ions Na^+ .

Quatre états peuvent ainsi être individualisés :

Une phase de repos où la porte d'activation est fermée et la porte d'inactivation ouverte. Le courant ne passe pas.

Une phase d'activation où la porte d'activation et la porte d'inactivation sont ouvertes. Le

courant passe.

Une phase d'inactivation où la porte d'activation est encore ouverte mais où la porte d'inactivation est déjà fermée. Le courant ne passe pas.

Une phase de réactivation où la porte d'activation se referme et secondairement la porte d'inactivation s'ouvre {Roden, 1997 #1324}.

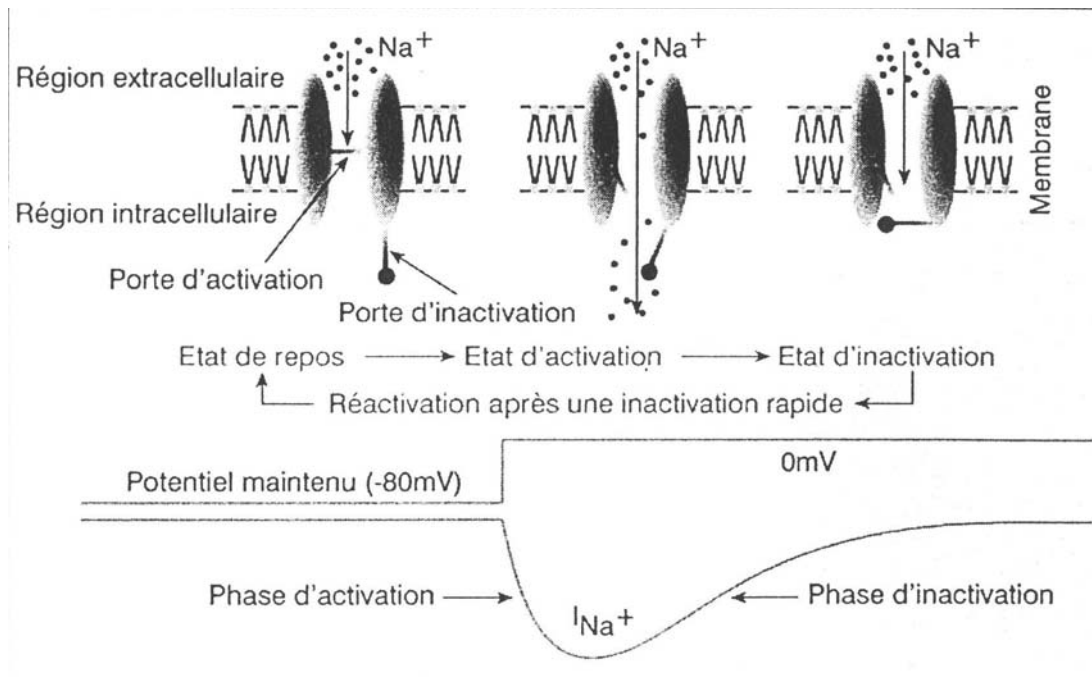


Figure 69 : Mécanisme hypothétique du fonctionnement du canal sodique dépendant du voltage.

L'inactivation rapide dépend essentiellement du segment protéique situé entre les domaines III et IV qui vient fermer le canal. L'inactivation rapide débute très peu de temps après l'activation et peut même dans certains cas commencer en même temps que l'activation et donc ne pas permettre le passage de courant. L'inactivation rapide récupère en quelques millisecondes et elle est ensuite relayée par l'inactivation lente.

L'inactivation lente est plus stable dans le temps et dépend de trois composantes (rapide moyenne et lente). C'est la composante moyenne qui a le rôle physiologique le plus important. Elle serait due à la zone de liaison entre les segments 5 et 6 du canal {Balser, 2004 #3452}.

II.D.1.c. Implication du gène *SCN5A* dans les pathologies cardiaques.

II.D.1.c.1. Rôle du gène *SCN5A* dans le syndrome du QT long LQT3.

L'implication des mutations dans le gène *SCN5A* a été initialement identifiée à partir de familles atteintes d'un syndrome du QT long de type 3. L'ensemble des mutations identifiées entraînent un "gain de fonction". Ces mutations perturbent l'inactivation rapide du canal sodique cardiaque et sont responsables d'une ouverture persistante de ce canal qui génère un petit courant sodique persistant pendant la phase de plateau du potentiel d'action cardiaque qui retarde la repolarisation des myocytes. Cette augmentation du courant entrant prolonge l'intervalle QT sur l'ECG de surface et prédispose les patients à des tachycardies ventriculaires polymorphes de types torsades de pointes (Roden D. M. et al. 1995; Wang Q. et al. 1995). Les mutations responsables du syndrome du QT long de type 3 sont groupées près des domaines qui influencent l'inactivation rapide du canal.

II.D.1.c.2. Rôle du gène *SCN5A* dans le syndrome de Brugada.

Les mutations identifiées dans le SB entraînent une diminution de la fonction du canal sodique cardiaque par plusieurs mécanismes. Certaines mutations, dont les non-sens, conduisent à une absence de courant sodique plus ou moins associée à un défaut de migration de la protéine à la membrane. D'autres conduisent à une modification de l'inactivation qui est prolongée en raison d'un début plus précoce ou d'une récupération retardée, il en résulte une diminution du courant sodique. Paradoxalement, les mutations faux-sens entraînent une récupération post-inactivation plus rapide. Certaines mutations génèrent des canaux non fonctionnels soit parce que le canal lui-même est non-fonctionnel soit parce qu'il n'est pas amené jusqu'à la membrane (Akai J. et al. 2000; Baroudi G. et al. 2002; Baroudi G. et al. 2000; Baroudi G. et al. 2001; Bezzina C. et al. 1999; Deschenes I. et al. 2000; Grant A. O. 2001; Hong K. et al. 2004; Kyndt F. et al. 2001; Mok N. S. et al. 2003; Potet F. et al. 2003; Priori S. G. et al. 2002b; Rook M. B. et al. 1999; Schulze-Bahr E. et al. 2003; Smits J. P. et al. 2002; Ueda K. et al. 2004; Valdivia C. R. et

al. 2002; Valdivia C. R. et al. 2004; Wang D. W. et al. 2002).

II.D.1.c.3. Rôle du gène *SCN5A* dans les troubles de la conduction dégénératifs.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons identifié une nouvelle mutation du canal *SCN5A* responsable de troubles de conduction isolés progressifs. Depuis d'autres mutations responsables de troubles de la conduction ont été identifiées. Il s'agissait cependant de formes non-progressives de la maladie qui touchaient des patients jeunes, le plus souvent dès l'enfance (Benson D. W. 2003; Tan H. L. et al. 2001; Viswanathan P. C. et al. 2001; Wang D. W. et al. 2002).

Les études électrophysiologiques des canaux mutés ont mis en évidence deux mécanismes principaux: une perte totale de fonction ou des anomalies de l'inactivation des canaux mutés. Les mutations identifiées dans le gène *SCN5A* chez les familles que nous avons étudiées sont des mutations non fonctionnelles. Une diminution du nombre de canaux sodiques fonctionnels entraînerait une diminution de la vitesse de propagation de l'influx cardiaque et pourrait expliquer ces troubles de conduction (Probst V. et al. 2003b; Schott J. J. et al. 1999). D'autres mutations responsables de troubles de conduction isolés seraient responsables d'anomalies de l'inactivation intermédiaire des canaux mutés (Viswanathan P. C. et al. 2003; Wang D. W. et al. 2002).

Des formes homozygotes de mutations du gène *SCN5A* ont également été décrites chez des patients atteints de troubles de conduction sévères.

Un enfant âgé de cinq ans avait un allongement très important de l'intervalle QT et des troubles de conduction tels qu'un BAV 2/1, un bloc de branche droit et/ou un hémibloc antérieur gauche. Ces anomalies étaient dues une mutation homozygote (V1777M) du canal sodique *SCN5A* (Lupoglazoff J. M. et al. 2001; Lupoglazoff J. M. et al. 2002). L'expression de la mutation dans des cellules tsA201, en présence de la sous-unité $\beta 1$, a mis en évidence un courant sodique entrant persistant et un déplacement de la courbe d'inactivation vers des valeurs de potentiel plus négatives, traduisant une diminution du nombre de canaux sodiques recrutables. Ces résultats sont identiques à ceux trouvés pour d'autres mutations associées au phénotype du syndrome du QT long de type 3. L'allongement important de la durée de repolarisation et de la

période réfractaire au niveau ventriculaire et au niveau du système His-Purkinje, serait à l'origine de l'allongement de l'intervalle QT et des troubles de conduction auriculo-ventriculaire (Lupoglazoff J. M. et al. 2001; Lupoglazoff J. M. et al. 2002).

Des mutations hétérozygotes composites (W156X et R225W) ont été identifiées chez un enfant atteint de troubles de conduction sévères (Bezzina C. R. et al. 2003). L'expression de ces mutations dans des ovocytes de xénope a montré que la mutation stop (W156X) ne donnait pas de canaux fonctionnels et que la mutation R225W était responsable d'une diminution importante de l'amplitude maximale du courant et d'une diminution de la pente de la courbe d'activation traduisant une diminution du nombre de canaux sodiques recrutables pendant la phase de dépolarisation rapide du potentiel d'action cardiaque. Les parents hétérozygotes pour chacune de ces mutations, avaient des électrocardiogrammes apparemment normaux.

Changement de nucléotide	Changement d'AA	Type de mutation	Région	Phénotype	Référence
G468A	W156X	nonsense	DI/S1-S2	CCD	Bezzina et al. 2003
C672T	R225W	Missense	DI/S4	CCD	Bezzina et al. 2003
G892A	G298S	Missense	DI/ S5-S6	CCD	Wang et al 2002
C1535T	T512I	Missense	DI-DII	CCD	Viswanathan et al. 2003
G1541T	G514C	Missense	DI-DII	CCD	Tan et al 2001
T>C	IVS22+2	Splice Mutation	DIII/S4-S5	CCD	Schott et al.1999
A4372T	G1406R	Missense	DIII/S5-S6	CCD+ Brugada	Kyndt et al. 2002
	D1595N	Missense		CCD	Wang et al 2002
	S1710L	Missense	DIV/S5-S6	CCD+ Brugada	Shirai et al. 2002
delG5280*	S1710+75X	Frameshift	DIV/S5-S6	CCD	Schott et al 1999
G5329A	V1777M	Missense	C-term	RW+ AV block	Lupoglazof et al. 2001

Tableau 11 : Liste des mutations SCN5A publiées dans les troubles de la conduction.

CCD : Cardiac conduction defect; RW: Romano Ward.

II.D.1.c.4. Hétérogénéité phénotypique induite par les

mutations de *SCN5A*.

Nous avons décrit une grande famille chez laquelle la même mutation du gène *SCN5A* pouvait être responsable de troubles de la conduction ou d'un SB (Kyndt F. et al. 2001). Depuis, nous avons identifié d'autres familles partageant les mêmes caractéristiques et l'étude que nous avons présentée dans ce travail sur la pénétrance du phénotype syndrome de Brugada chez les patients porteurs d'une mutation du gène *SCN5A* montre que si la pénétrance du SB est faible en revanche la pénétrance des troubles de la conduction est élevée atteignant plus de 80% des patients de l'étude.

De même que certaines mutations dans le gène *SCN5A* peuvent être l'origine, dans la même famille de trouble de conduction ou d'un SB, d'autres mutations peuvent être l'origine soit d'un syndrome du QT long de type 3 soit d'un SB (Bezzina C. et al. 1999). En effet, la même mutation d'insertion d'un acide aminé (1795insD) dans la partie carboxy-terminale du canal pouvait, en fonction des membres de la famille entraîner un syndrome du QT long de type 3 ou un SB. Cette mutation provoquerait des effets fonctionnels opposés sur les deux composantes de cinétique d'inactivation du canal sodique. De même que les autres mutations associées au syndrome du QT long de type 3, cette mutation perturberait l'inactivation rapide du canal et générerait un courant sodique entrant persistant pendant la phase de plateau du potentiel d'action en particulier, pour des fréquences cardiaques lentes. Au contraire, pour des fréquences cardiaques rapides, cette mutation augmenterait la composante d'inactivation plus lente du canal, dite intermédiaire et ralentirait de façon significative la réactivation des canaux sodiques entraînant par conséquent, une perte de fonction.

Si cette explication physiopathologique est séduisante, il faut tout de même noter que dans la famille étudiée par Bezzina C. et coll. (1999), trois individus non porteurs de la mutation avaient un électrocardiogramme compatible avec un SB. Par ailleurs, les troubles de la conduction étaient également fréquents dans cette famille et la durée du PR (201 ms) et du QRS (117 ms) était significativement allongée par rapport aux sujets non-mutés issus de la même famille.

Deux autres mutations du même codon (Y1795C et Y1795H) responsables d'un syndrome du QT long pour la première et d'un SB pour la deuxième, ainsi que des mutations responsables du SB (T1620M) présenteraient les mêmes anomalies de l'inactivation

intermédiaire des canaux mutés, suggérant que ce processus d'inactivation intermédiaire serait impliqué dans la physiopathologie de ces syndromes et que les variations phénotypiques pourraient dépendre du système nerveux autonome (Rivolta I. et al. 2001). Par ailleurs, un travail de Priori et coll a montré que l'injection de bloqueur du canal sodique entraînait un sus-décalage du segment ST chez la moitié des patients atteints d'un syndrome du QT long de type 3 (Priori S. G. et al. 2000b).

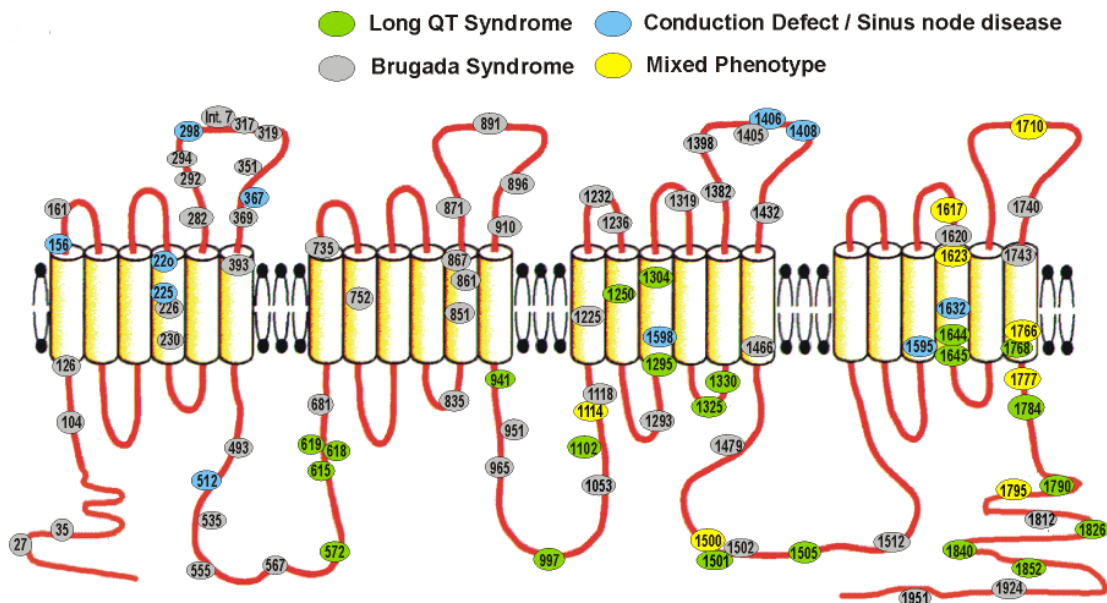


Figure 70 : Représentation schématique des mutations du gène SCN5A publiées. D'après Cardmoc.

II.D.1.c.5. Facteurs potentiels impliqués dans les variations phénotypiques associées aux mutations du gène SCN5A.

I.A.1.a.i.a.9. Facteurs environnementaux responsables de variations phénotypiques.

Dans la famille P, selon la branche de la famille, la mutation provoquait un SB ou des troubles de conduction cardiaque isolés. Dans cette famille, tous les patients atteints d'un SB sont

des hommes alors que six patients sur sept atteints de troubles de conduction cardiaque isolés sont des femmes. A la différence de la prépondérance féminine observée dans le syndrome du QT long congénital, le SB touche préférentiellement les hommes (Alings M. and Wilde A. 1999; Priori S. G. et al. 2000a).

La maladie est plus sévère chez les hommes que chez les femmes puisque dans la série de Brugada, 25% des hommes sont symptomatiques alors que seulement 12% des femmes le sont (Brugada J. et al. 1999). Ces résultats sont superposables à ceux obtenus dans la série publiée par Priori et coll (Priori S. G. et al. 2002b).

Récemment, deux cas de SB typiques ayant disparu après réalisation d'une castration ont renforcé l'hypothèse que les hormones sexuelles males jouent un rôle important dans l'expression de ce syndrome (Matsuo K. et al. 2003).

Sur le plan expérimental, il existe également des arguments en faveur du rôle des hormones sexuelles dans le SB.

La densité plus importante des canaux impliqués dans le courant Ito dans la paroi du ventricule droit chez l'homme pourrait expliquer cette prépondérance masculine (Di Diego J. M. et al. 2002). Le rôle des hormones œstrogènes pourrait être une autre raison de cette hétérogénéité. Elles pourraient intervenir en tant que facteurs modulateurs de l'expression des gènes codant pour des protéines constitutives de canaux ioniques (Song M. et al. 2001).

Le mode de transmission apparemment simple des différents phénotypes au sein des différentes branches de la famille P suggère que des facteurs génétiques, tels que des gènes modulateurs, pourraient influencer l'expression phénotypique chez les sujets porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*.

I.A.1.a.i.a.10. Facteurs génétiques responsables de variations phénotypiques.

Cette variabilité phénotypique pourrait être liée à la présence d'un allèle délétère ou au contraire protecteur du même gène situé en position cis ou trans de la mutation morbide du gène *SCN5A*. Viswanathan P.C. et coll. 2001 avaient suggéré qu'un polymorphisme fréquent (H558R) du gène *SCN5A* présent dans environ 25 % de la population, modulait les fonctions du canal muté T512I et, en atténuant sa perte de fonction serait responsable des variations phénotypiques. Des

études électrophysiologiques ont montré que le canal portant le polymorphisme H558R se comportait comme le canal normal. Par contre, lorsque ce polymorphisme était exprimé sur le même allèle que la mutation T512I, il atténuait la perte de fonction du canal muté. Les patients porteurs de la mutation T512I seule présenteraient un phénotype Brugada alors que les patients porteurs de la mutation et du polymorphisme H558R en position cis présenteraient un trouble de conduction isolé. Le polymorphisme H558R se comporterait donc comme un allèle protecteur de la mutation T512I et il est possible que d'autres polymorphismes aient des effets semblables sur d'autres mutations (Viswanathan P. C. et al. 2003). Ces hypothèses devront être confirmées à plus grande échelle.

Ces variabilités phénotypiques pourraient être liées à la présence d'un gène modificateur situé à proximité du gène *SCN5A*. Un second locus de SB a été localisé à proximité du gène *SCN5A*, en 3p22-25 (Weiss R. et al. 2002). Il est possible que des polymorphismes ou mutations de ce gène se comportent comme des allèles de prédisposition au SB chez des sujets présentant des troubles de conduction isolés associés à une mutation du gène *SCN5A*.

Enfin elles pourraient être liées à un gène situé sur un autre chromosome ou à distance du gène *SCN5A*. Le locus de SB que nous avons identifié en 21q22 pourrait se comporter comme un gène de prédisposition et intervenir sur le phénotype de la même façon que dans le cas précédent.

II.D.1.c.6. Hétérogénéité génétique du syndrome de Brugada et des troubles de la conduction dégénératifs.

Si les mutations dans le gène *SCN5A* jouent un rôle central dans le SB et les troubles de conduction dégénératifs, ces mutations ne sont présentes que chez une part mineure des patients atteints de ces syndromes. Au cours de ce travail, nous avons montré que les troubles de la conduction de dégénératifs étaient liés à au moins quatre gènes différents et que le SB est lié à au moins trois gènes différents.

Pour le SB, nous avons montré qu'il est possible de prédire la présence d'une mutation dans le gène *SCN5A* en fonction des intervalles de conduction des patients. Ce type d'analyse des relations génotype phénotype sera certainement important lorsque tous les gènes responsables du SB seront identifiés afin de pouvoir identifier plus rapidement la mutation causale par une

recherche ciblée guidée par l'aspect électrocardiographique.

S'il est possible d'identifier une forme familiale au SB dans plus de 50 % des cas, ce qui démontre clairement que ce syndrome est d'origine génétique, la place des formes génétiques dans les troubles de la conduction dégénératifs est plus difficile à préciser. En effet, cette pathologie est plus fréquente et touche des sujets plus âgés ce qui rend l'identification des formes familiales plus difficile. Cependant, en recherchant systématiquement la présence de troubles de la conduction chez les apparentés proches d'un sujet atteint, il est possible de retrouver fréquemment des formes familiales à cette maladie (Greenspahn B. R. et al. 1976). L'évaluation du rôle exact des formes génétiques dans cette pathologie ne pourra être réalisée que lorsque tous les gènes responsables seront identifiés.

L'hétérogénéité génétique des pathologies cardio-vasculaires a déjà été démontrée pour d'autres pathologies telles que le syndrome du QT long ou les cardiomyopathies hypertrophiques ou dilatées (Crispell K. A. 2003; Elliott P. et al. 2004; Probst V. et al. 2003a). Il n'est donc pas surprenant que l'on retrouve la même hétérogénéité pour le SB et pour les troubles de la conduction dégénératifs.

II.E. PERSPECTIVES

II.E.1. Définition de nouvelles normes pour les durées des différents paramètres électrocardiographiques en fonction de l'âge.

L'étude de ces différentes familles nous a permis de remarquer que chez les patients les plus jeunes, il était fréquent que bien que les valeurs de l'électrocardiogramme soit dans les limites de la normale, celles-ci soient tout de même plus longues que chez les patients du même âge non porteurs de mutation. Nous pourrions probablement dans l'avenir, lorsque nous aurons un « pool » de sujets génétiquement atteints et sains suffisant, redéfinir les valeurs normales de ces différents paramètres en fonction de l'âge. Après avoir redéfini ces limites, nous pourrions diagnostiquer les troubles de la conduction beaucoup plus précocement et ainsi il deviendra possible d'assurer un meilleur suivi de ces patients. En fonction des cas et de l'évolution des connaissances, nous pourrions soit prendre la décision de l'implantation d'un pacemaker avant même la survenue de malaise ou de mort subite ou retarder la survenue de ces troubles de

conduction par l'utilisation précoce de molécules permettant de retarder la survenue de la fibrose.

II.E.2. Evaluation des facteurs modulateurs influençant l'évolution des troubles de la conduction dégénératifs et du syndrome de Brugada.

Parmi les patients ayant le profil électrocardiographique typique du SB, certains font des tachycardies ou des fibrillations ventriculaires, alors que d'autres présentant la même mutation du gène *SCN5A* et le même profil électrocardiographique restent asymptomatiques.

La notion d'une mort subite familiale qui était initialement considérée comme un facteur pronostique majeur ne l'est plus. Cela montre que le risque de mort subite associée au SB est indépendant de la mutation causale, que celle-ci soit située sur le gène *SCN5A* ou non.

Il existe donc des facteurs modulateurs qui interviennent de façon majeure à la fois pour déterminer le phénotype des patients mais également leur pronostic rythmique.

Chez les patients que nous avons identifiés comme porteurs d'une mutation dans le gène *SCN5A* et atteints de troubles de la conduction dégénératifs il existe également une variabilité phénotypique importante. Certains sont atteints précocement de troubles de la conduction sévères alors que d'autres développent une pathologie beaucoup moins grave.

Actuellement, nous ne connaissons pas les facteurs qui vont influencer l'évolution de la maladie. Ces facteurs sont certainement multiples et font intervenir des causes environnementales et génétiques.

Nous pensons que l'identification de ces facteurs sera un des grands challenges des années à venir.

Une des méthodes pour identifier ces facteurs peut-être la constitution de grandes bases de données à la fois cliniques, biologiques, généalogique et génétiques. L'identification dans ces bases de données d'un grand nombre de patients porteurs de la même mutation devrait permettre, à condition d'avoir des informations phénotypiques très précises, d'identifier les facteurs génétiques modulateurs de l'évolution de la maladie après avoir éliminé les phénomènes environnementaux.

L'identification de ces facteurs modulateurs dépendra certainement de la capacité

qu'auront les différentes équipes impliquées à identifier de très grandes familles atteintes de la même pathologie et pour lesquelles le gène responsable de la maladie sera connu.

L'identification de telles familles ne peut pas être réalisée par une approche de type enquête familiale classique. Cette approche se heurte à la mémoire limitée à quelques générations des membres de la famille et surtout à l'impossibilité de connaître la généalogie descendante des ancêtres identifiés ce qui empêche l'identification des membres éloignés de la famille et susceptibles d'être atteints de la maladie.

Afin de pallier cette difficulté, nous développons actuellement une approche de type épidémiologie génétique. Pour cela nous constituons de grands fichiers regroupant les patients atteints de la pathologie étudiée. Dans un deuxième temps, nous déterminons le lieu de naissance des patients inclus dans l'étude grâce à leur numéro de sécurité sociale. Une recherche de généalogie ascendante sera systématiquement réalisée chez l'ensemble des patients implantés d'un pacemaker pour BAV dégénératif et issus des communes dans un rayon de 15 Km autour des communes d'où sont originaires les familles que nous avons déjà identifiées. Pour les familles chez lesquelles une mutation du gène *SCN5A* est déjà identifiée, nous pourrions dans un premier temps rechercher la présence de cette mutation avant de réaliser une recherche de généalogie ascendante. Pour cette approche, il est nécessaire que la population soit peu mobile, ce qui est le cas habituellement dans notre région. Le but de cette enquête généalogique sera d'identifier l'ancêtre commun à l'ensemble des patients issus de cette région afin de constituer un large pédigré nous permettant dans un second temps d'évaluer le rôle des facteurs modulateurs sur la pathologie étudiée. Cette approche devrait également nous permettre d'augmenter la taille des familles déjà identifiées et ainsi de constituer des pédigrés de taille suffisante pour réaliser des analyses de liaison sur ces familles.

Nous avons également utilisé cette approche pour le SB. Nous sommes ainsi parvenus à relier quatre familles non liées au gène *SCN5A* et issues de la même région au nord-est de Nantes deux à deux. Nous n'avons pas encore identifié l'ancêtre commun à ces quatre familles mais il est fortement probable que celui-ci existe. Nous pensons ainsi pouvoir additionner les lod scores de ces différentes familles pour obtenir un large pédigré permettant d'identifier le gène responsable de la maladie (Figure 71).

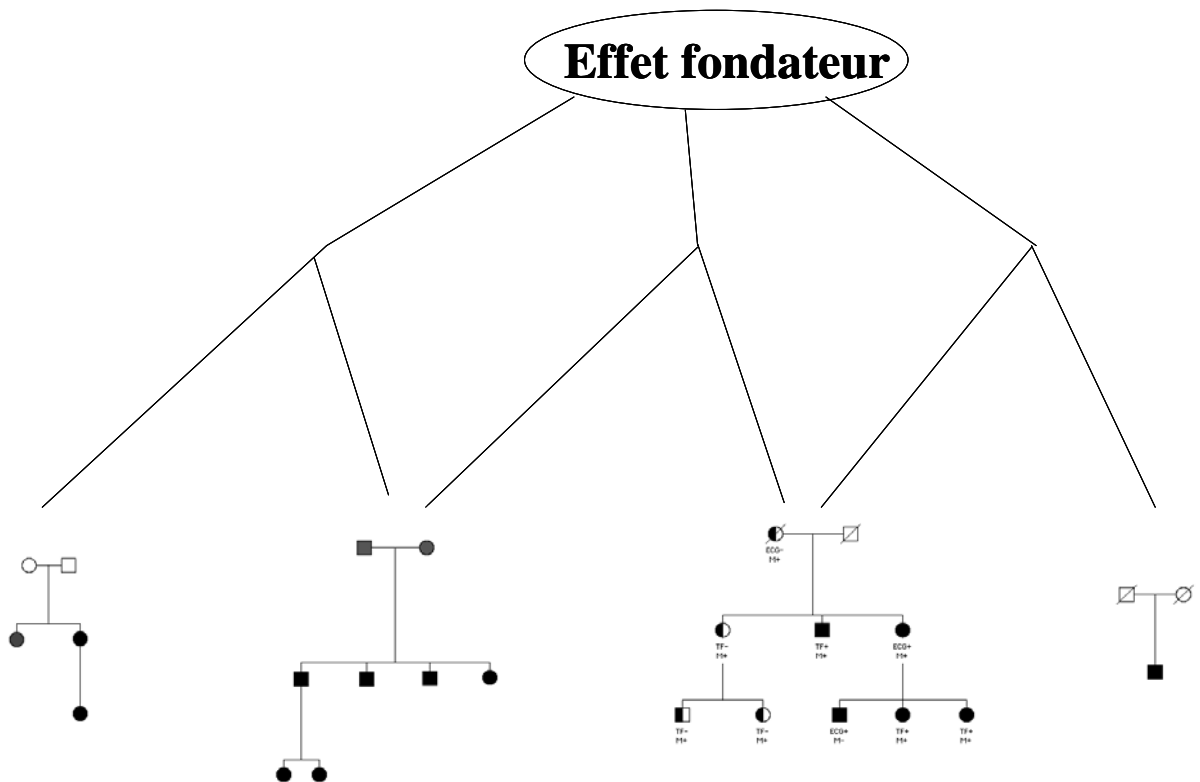


Figure 71 : Approche géographique du SB permettant de relier les différentes familles présentées deux à deux entre elles. Un effet fondateur, bien que non encore identifié est fortement suspecté.

II.E.3. Modèle animal de troubles de la conduction dégénératifs.

Parallèlement à ces approches de génétique humaine, la modulation de ces maladies par des gènes modificateurs pourrait être recherchée grâce à un modèle animal. Un modèle de souris invalidée pour le gène *SCN5A* et atteint de troubles de conduction cardiaque, a été développé par l'équipe d'Andrew Grace (Université de Cambridge, Angleterre). Ce modèle est actuellement étudié dans notre laboratoire. Les premiers résultats montrent que ces souris KO hétérozygotes pour le gène *SCN5A* ont un allongement de la durée de conduction à l'étage auriculaire et ventriculaire identique aux anomalies retrouvées dans la famille C atteinte de troubles de la conduction liés à une mutation du gène *SCN5A*. Ces anomalies de la conduction s'aggravent avec

l'âge. Enfin, certaines souris ont une atteinte mineure alors que d'autres sont plus sévèrement atteintes (Charpentier F. et al. 2004). Ce modèle pourrait donc être intéressant pour l'étude des mécanismes modulateurs des troubles de la conduction ainsi que pour tester l'impact de différentes thérapeutiques sur l'évolution des anomalies de la conduction. L'hypertension artérielle est certainement un des facteurs aggravant des troubles de la conduction dégénératifs. Le rôle de ce facteur peut certainement être étudié sur le modèle de souris invalidées pour le gène *SCN5A*. De même, il serait intéressant d'évaluer l'intérêt de traitement luttant contre la fibrose tel que la spironolactone ou les inhibiteurs de l'enzyme de conversion.

II.E.4. Evaluation du rôle des facteurs environnementaux sur l'évolution du syndrome de Brugada et des troubles de la conduction dégénératifs.

S'il est intéressant d'évaluer le rôle des facteurs génétiques sur l'évolution du SB et des troubles de la conduction dégénératifs, il est très probable que les facteurs environnementaux jouent également un rôle majeur.

L'évaluation de la globalité de ces facteurs semble difficile mais le rôle de certains d'entre eux peut être étudié.

Une large prédominance masculine a été retrouvée sur tous les fichiers de patients atteints SB. De même, le risque rythmique lié à ce syndrome semble plus élevé chez les hommes. Il est donc possible que les hormones sexuelles mâles influencent le phénotype induit par les mutations responsables du SB. Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons commencé un projet visant, à partir de notre fichier de patients atteints d'un SB, à évaluer le phénotype électrocardiographique et le risque rythmique des patients, en fonction du taux des hormones sexuelles. Si le risque rythmique est corrélé au taux des hormones sexuelles, ce dosage pourrait devenir un indice pronostique dans cette pathologie et pourrait servir à stratifier le risque rythmique de ces patients.

DEUXIEME PARTIE :

**APPROCHE GÉNÉTIQUE DES VALVULOPATHIES À
DÉGÉNÉRESCENCE MYXOÏDE ET DU RÉTRÉCISSEMENT
AORTIQUE CALCIFIÉ.**

I. LES VALVULOPATHIES À DÉGÉNÉRESCENCE MYXOÏDE.

I.A. INTRODUCTION.

Les dystrophies valvulaires par dégénérescence myxoïde sont des pathologies cardiaques fréquentes. Elles constituent un groupe très hétérogène dont la forme la plus répandue est le prolapsus valvulaire mitral idiopathique, également appelé maladie de Barlow (Barlow J. B. et al. 1979). La dégénérescence myxoïde peut également concerner la valve aortique de façon isolée ou en association avec l'atteinte mitrale.

Le prolapsus valvulaire mitral est l'une des anomalies valvulaires les plus fréquentes, apparaissant chez 2 à 7% de la population (Darsee J. R. et al. 1979; Levy D. et al. 1987; Procacci P. M. et al. 1976). Les manifestations cliniques sont très variables et si la majorité des patients présente des formes bénignes d'anomalies valvulaires, sans ou avec peu de répercussions cliniques, certains ont des formes sévères avec une fuite importante nécessitant un geste chirurgical (Wooley C.F. et coll. 1991). D'autre part, ces dystrophies valvulaires peuvent être à l'origine de complications graves telles que les endocardites, les accidents thromboemboliques, les troubles du rythme cardiaque voire la mort subite (Devereux R.B. 1976, Nishimura R.A. et coll. 1985, Duren D.R. et coll. 1988, Boudarias J.P. 1991, Zuppiroli A. et coll. 1995).

En l'absence de connaissances physiopathologiques précises, la classification proposée est basée sur la topographie de la dégénérescence myxoïde et de l'étiologie supposée de la valvulopathie.

I.A.1. Classification de la dégénérescence myxoïde.

I.A.1.a. Prolapsus valvulaire mitral myxomateux ou maladie de Barlow.

Les premières études épidémiologiques rapportent une prévalence comprise entre 4 et 8 % dans la population générale (Darsee J. R. et al. 1979; Levy D. and Savage D. 1987; Procacci P. M. et al. 1976). Cependant, la prévalence du prolapsus mitral était surévaluée dans ces études en

raison de nombreux faux positifs attribuables à l'utilisation de l'échographie TM et à une mauvaise définition échocardiographique initiale de la maladie (Levine R. A. et al. 1987). Les études plus récentes retrouvent une fréquence plus basse autour de 2% (Freed L. A. et al. 1999).

Des critères échographiques plus stricts ont été définis en tenant compte de la morphologie tridimensionnelle de la valve mitrale (Devereux R. B. et al. 1987; Levine R. A. et al. 1988; Levine R. A. et al. 1987; Perloff J. K. et al. 1989; Sanfilippo A. J. et al. 1988). En échocardiographie bidimensionnelle dans l'incidence longitudinale grand axe, le bombement des feuillets mitraux doit être supérieur à 2 mm au-dessus de l'anneau mitral en systole, associé à un épaissement anormal d'au moins 5 mm des feuillets valvulaires pendant la diastole. Lorsque seul le premier critère est présent, on parle de prolapsus non classique, non dégénératif. En effet, la dégénérescence myxoïde valvulaire se traduit macroscopiquement par des valves épaissies et redondantes.

Sur la base de ces critères diagnostiques stricts, on retrouve un prolapsus classique de la valve mitrale avec épaissement valvulaire chez 1.3 % des 3491 individus d'une cohorte soumise à un examen échocardiographique dans le cadre de l'enquête de Framingham. Pour 1.1 % de cette même cohorte, il existait un prolapsus non classique sans épaissement valvulaire (Freed L. A. et al. 1999).

Les auteurs ont ainsi opposé le prolapsus mitral avec dégénérescence myxoïde et le prolapsus mitral qui en est exempt (on parle alors de dégénérescence fibro-élastique). La première forme expose plus fréquemment aux complications, notamment à l'insuffisance mitrale progressive (Devereux R. B. et al. 1986). Il s'agit donc de deux entités distinctes qu'il ne faut pas confondre.

I.A.1.b. Dystrophies valvulaires aortiques isolées et dystrophies multivalvulaires.

La dégénérescence myxoïde a été bien décrite dans le prolapsus mitral, mais elle existe également dans les fuites aortiques isolées (Allen W. M. et al. 1985; Lakier J. B. et al. 1985; Tonnemacher D. et al. 1987).

L'insuffisance aortique dystrophique représente la première cause d'insuffisance aortique dans les pays industrialisés (Acar J. et al. 1991). Cette forme d'insuffisance aortique s'oppose à la maladie annulo-ectasianta qui associe un anévrisme de l'aorte ascendante initiale et pour laquelle le mécanisme de la fuite est lié à une dilatation de l'anneau. Dans l'insuffisance aortique dystrophique la régurgitation est liée le plus souvent à un prolapsus d'une ou de plusieurs sigmoïdes aortiques qui peuvent être épaissies. Ces anomalies peuvent être associées à une dilatation de l'anneau mais sans véritable anévrisme de l'aorte ascendante.

La dégénérescence myxoïde peut également concerner plusieurs valves (Mardelli T. J. et al. 1980; Suzuki K. et al. 1991). L'association de l'atteinte valvulaire mitrale et tricuspide a notamment été soulignée (Kasper W. et al. 1991; Pomerance A. 1969).

I.A.1.c. Dystrophies valvulaires syndromiques.

I.A.1.c.1. Le syndrome de Marfan.

Le syndrome de Marfan peut être responsable de changements des valvules identiques à ceux observées dans le prolapsus valvulaire mitral, ainsi qu'une dilatation de l'anneau valvulaire mitral. Certaines formes frustes de syndrome de Marfan peuvent entraîner une dilatation de la crosse aortique, liée à une nécrose médiale cystique de la média aortique et une valve « floppy » peut coexister. Parmi les patients ayant des valves floppy, certaines déformations squelettiques qui font partie du syndrome de Marfan peuvent être trouvées. Pour certains auteurs, il existe un continuum phénotypique des anomalies héréditaires du tissu conjonctif depuis le prolapsus valvulaire mitral myxoïde isolé jusqu'au syndrome de Marfan complet (Glesby M. J. et al. 1989; Read R. C. et al. 1965; Rippe J. et al. 1980). En effet, de nombreux patients ne pouvant être facilement classés dans un syndrome bien défini, Glesby et Pyeritz proposent l'acronyme « MASS » pour désigner le phénotype de ces patients et souligner ainsi les atteintes plus ou moins associées de la valve mitrale (Mitral valve), de l'aorte (Aorta), du squelette (Skeleton), et de la peau (Skin) (Glesby M. J. and Pyeritz R. E. 1989).

I.A.1.c.2. Le syndrome d'Ehlers-Danlos.

Un prolapsus de la valve mitrale avec une valve "floppy" et une dilation de la crosse aortique et du sinus de Valsava sont des anomalies fréquentes chez les patients atteints de certaines formes du syndrome d'Ehlers-Danlos, telles que le syndrome d'Ehlers-Danlos de type IV (Cabeen W. R., Jr. et al. 1977; Leier C. V. et al. 1980).

Des anomalies congénitales, telle qu'une valve aortique bicuspide ont également été décrites (Beighton P. 1969).

I.A.1.c.3. L'ostéogénèse imparfaite.

Chez les patients atteints d'ostéogénèse imparfaite, des anomalies cardiovasculaires similaires à celles du syndrome de Marfan peuvent apparaître, telles qu'une insuffisance valvulaire aortique, des lésions valvulaires mitrales et un anévrisme aortique (Criscitiello M. G. et al. 1965; Heckman B. A. et al. 1968; Stein D. et al. 1977; Wong R. S. et al. 1995).

I.A.1.c.4. Le pseudoxanthoma elasticum.

Le pseudoxanthoma elasticum est une maladie héréditaire du tissu conjonctif, due à des calcifications anormales des fibres élastiques, affectant essentiellement la peau, les yeux, le tractus gastro-intestinal et le système cardiovasculaire (Beighton P. 1969; Christiano A. M. et al. 1994; Korn S. et al. 1987; Lebwohl M. 1993; Lebwohl M. et al. 1993; Lebwohl M. et al. 1994; Yap E. Y. et al. 1992). Il s'agit d'une maladie cliniquement variable et hétérogène. Le prolapsus de la valve mitral serait l'une des manifestations cardiovasculaires les plus fréquentes et pourrait parfois exister de façon isolée (Coffman J. D. et al. 1959; Rubegni P. et al. 2000).

I.A.1.c.5. Les mucopolysaccharidoses.

Il s'agit d'un groupe de maladies héréditaires pour lesquelles un déficit en enzymes lysosomiales entraîne une accumulation intracellulaire de mucopolysaccharides (glycosaminoglycanes) dans plusieurs organes. Ces patients peuvent développer une insuffisance aortique ou mitrale, une sténose mitrale et une ischémie du myocarde (Johnson G. L. et al. 1981).

Dans les xanthomatoses, les valves aortiques peuvent être infiltrées par des dépôts lipidiques. Une calcification peut être à l'origine d'une sténose aortique chez des personnes jeunes.

I.A.1.c.6. Les cardiomyopathies dilatées.

Les cardiomyopathies dilatées (CMD) sont caractérisées par une dilation des cavités ventriculaires associée à une altération de la fonction contractile du myocarde pouvant conduire à une insuffisance cardiaque et à la mort subite due à des arythmies ventriculaires. Les formes familiales de cardiomyopathies dilatées résulteraient d'altérations de gènes codant des protéines de structure, cytosquelettiques ou sarcomériques, telles que l'actine, la dystrophine, la desmine et la métavinculine, entraînant des anomalies dans la transmission de la force contractile (Dalakas M. C. et al. 2000; Li D. et al. 2001; Li D. et al. 1999; Maeda M. et al. 1997; Olson T. M. et al. 1998; Ortiz-Lopez R. et al. 1997). Ces défauts seraient à l'origine de lésions cellulaires conduisant à l'installation progressive d'une fibrose interstitielle et d'une dilation des ventricules. Une forme de cardiomyopathie dilatée avec prolapsus valvulaire a également été rapportée (Bowles K. R. et al. 1996).

I.A.1.c.7. Autres syndromes.

Par ailleurs, l'association d'une dégénérescence myxoïde de la valve mitrale avec de nombreuses autres maladies (cardiovasculaires et non cardiovasculaires) a également été rapportée dans la littérature : déformations de la cage thoracique, dystrophie myotonique, myopathie de Duchenne et Becker, un faible poids et une tension artérielle peu élevée (Bon Tempo C. P. et al. 1975; Devereux R. B. et al. 1982a; Salomon J. et al. 1975; Winters S. J. et al.

1976).

I.A.1.d. Les valvulopathies d'origine immunitaire.

Des maladies valvulaires rhumatoïdes chroniques peuvent se développer à la suite d'une réponse immunitaire anormale consécutive à une infection par streptocoque hémolytique du groupe A. Cette réponse dépendrait d'une susceptibilité individuelle, génétiquement déterminée, associée à l'antigène d'histocompatibilité HLA B5. En réponse à l'infection par streptocoque, ces patients développent une fièvre rhumatoïde et produisent des quantités anormalement élevées d'anticorps, tels que des anticorps antistreptocoque, antistreptolysine, anti-DNase et anti-hyaluronidase. Les cibles antigéniques potentielles comprennent les glycoprotéines des valves cardiaques. Les lésions histologiques cardiaques se traduisent par une phase proliférative (granulomateuse) cardiaque du corps d'Aschoff, qui peut se produire dans l'endocarde et le myocarde. Des infections répétées peuvent entraîner une maladie valvulaire sévère, touchant le plus souvent les valves mitrales et/ ou aortiques (Feldman T. 1996).

Dans le lupus érythémateux systémique, des anticorps antiphospholipides peuvent entraîner des lésions thrombotiques des valves, par l'intermédiaire d'une inhibition de l'antithrombine III et d'une diminution d'activité du système de la protéine C. Il peut aboutir à une insuffisance valvulaire par thrombose des valves, raccourcissement ou perforation des feuillets valvulaires, rupture de cordages ou nécrose du muscle papillaire. La sténose proviendrait d'une fusion commissurale ou d'une thrombose massive des feuillets valvulaires, probablement due à une coagulopathie intravasculaire disséminée (Fluture A. et al. 2003; Leszczynski P. et al. 2003).

Dans l'arthrite rhumatoïde, le granulome rhumatoïde peut se développer dans la substance des valves cardiaques, en particulier des valves mitrales et aortiques

La spondylarthrite ankylosante peut également entraîner des lésions valvulaires touchant essentiellement les valves aortiques.

I.A.1.e. Fréquence et répartition selon l'âge et le sexe.

Le prolapsus valvulaire mitral idiopathique serait la maladie valvulaire cardiaque la plus fréquente dans les pays industrialisés (Devereux R. B. et al. 1989). Les premières études épidémiologiques avaient rapporté une prévalence dans la population générale variant de 5 à 15%

et allant même jusqu'à 35% dans certaines études (Darsee J. R. et al. 1979; Levy D. and Savage D. 1987; Procacci P. M. et al. 1976; Savage D. D. et al. 1983; Warth D. C. et al. 1985) mais ces études ont exagéré la prévalence du prolapsus valvulaire mitral en raison de nombreux faux positifs attribuables aux critères diagnostiques de l'échocardiographie (Levine R. A. et al. 1988; Nishimura R. A. et al. 1985). Freed L.A. et coll. (1999) ont trouvé une prévalence beaucoup plus faible, de 2,4% dans la population générale (Freed L. A. et al. 1999). Il existerait une prépondérance féminine, les femmes représentant les 2/3 des individus atteints. Le prolapsus valvulaire mitral serait moins fréquent chez l'enfant que chez l'adulte. Il s'agit d'une maladie d'origine génétique à transmission le plus souvent autosomique dominante avec une pénétrance incomplète et une expression faible chez les hommes et les sujets jeunes, qui explique la prépondérance féminine et le fait que cette maladie soit rarement observée avant l'âge adulte (30 ans)(Devereux R. B. et al. 1982a). Le prolapsus valvulaire mitral serait souvent associé à un faible poids corporel et une pression artérielle basse (Devereux R. B. et al. 1982b).

I.A.2. Lésions histologiques.

Sur le plan macroscopique, la dégénérescence myxoïde des valves se traduit par une exubérance tissulaire qui peut être diffuse ou localisée. Au niveau de la valve mitrale, les feuillets sont épaissis et présentent un aspect distendu, festonné, gaufré. Il existe souvent une élongation des cordages et un élargissement de l'anneau. Au niveau de la valve aortique, les sigmoïdes peuvent être épaissies (Figure 72).

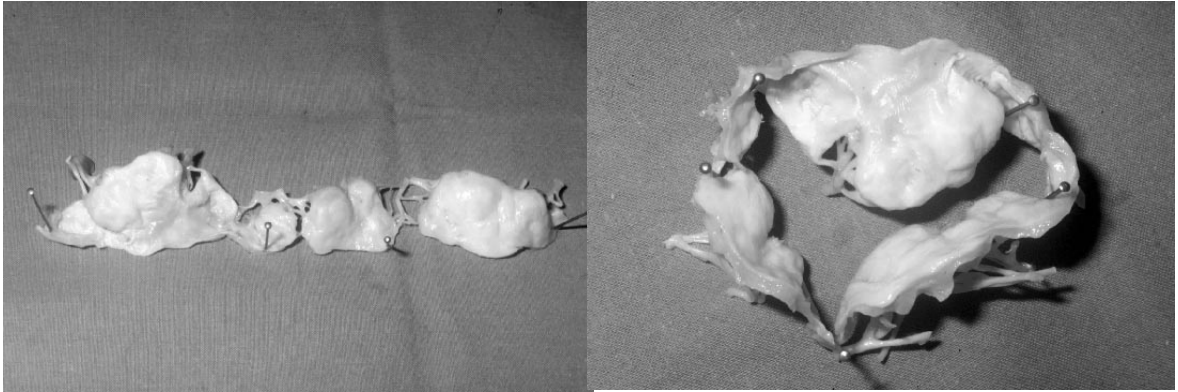


Figure 72 : Valve mitrale dystrophique : épaissement des feuillets valvulaires antérieur et postérieur, avec un aspect redondant, festonné ; élargissement de l'anneau mitral.

Histologiquement, deux caractères prédominent : l'absence de processus inflammatoire et la dégénérescence de la valve avec des altérations non spécifiques du collagène et de l'élastine ainsi qu'une accumulation de protéoglycanes (Frale W. J. 1969; Kern W. H. et al. 1972; King B. D. et al. 1982; Tamura K. et al. 1995; Virmani R. et al. 1987). La dégénérescence de la valve est dite myxoïde en raison de l'imbibition du tissu conjonctif valvulaire par ces protéoglycanes qui contiennent des mucopolysaccharides colorés par le bleu Alcian (Figure 73 et Figure 74).

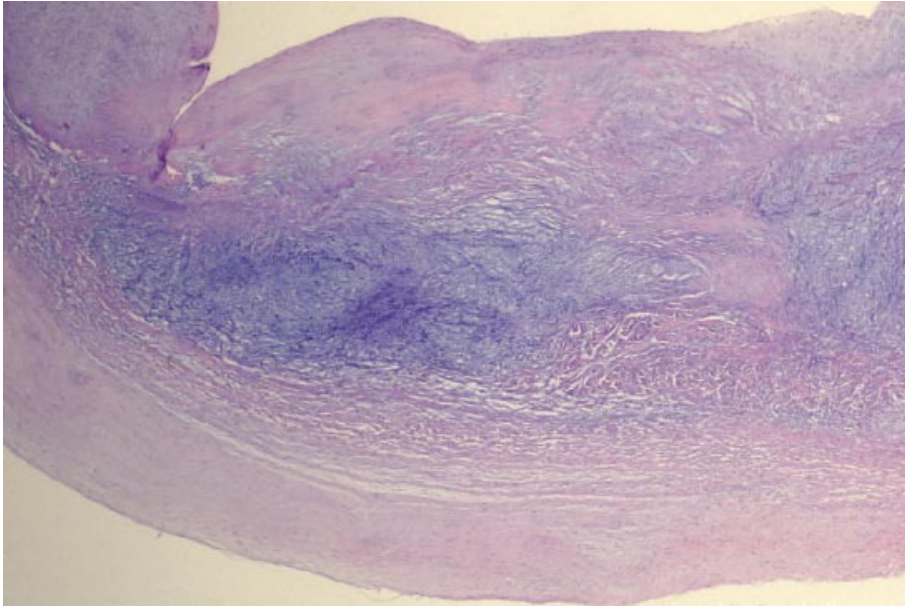


Figure 73 : Coupe histologique d'une valve mitrale dystrophique.

Coloration au bleu Alcian (mise en évidence d'une accumulation de protéoglycanes).

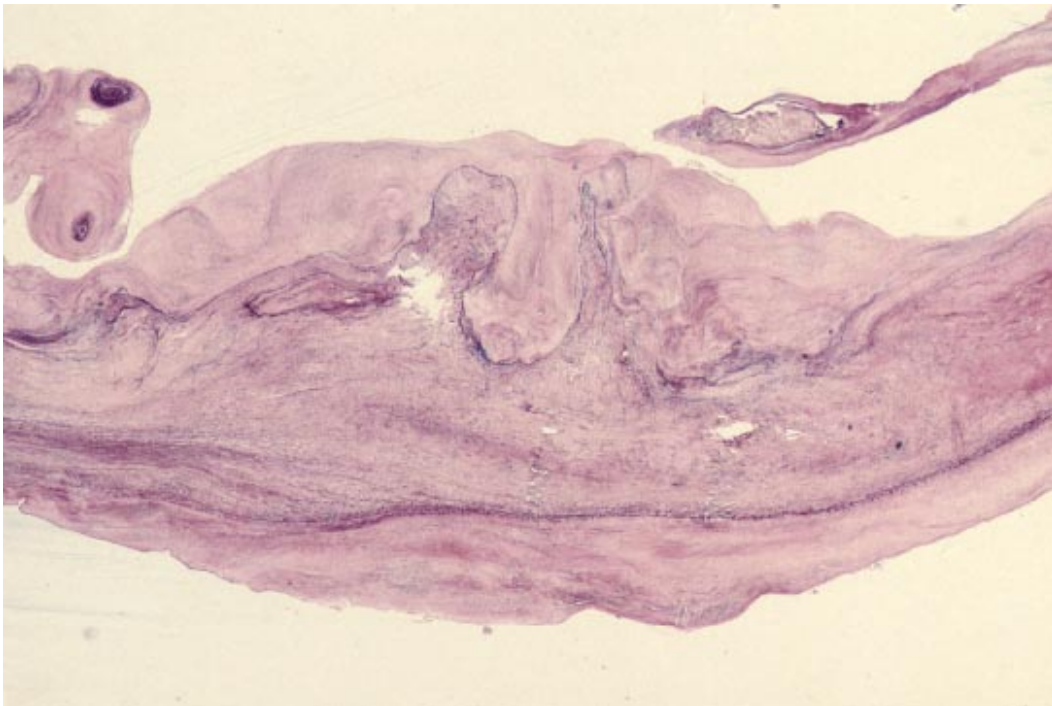


Figure 74 : Coupe histologique d'une valve mitrale dystrophique.

Coloration de Weigert montrant la désorganisation de la trame élastique.

Si l'anomalie de la valve est prédominante, Morales et al. (1992) ont montré que l'atteinte est plus diffuse touchant les autres structures cardiaques avec une accumulation extra-valvulaire de protéoglycanes dans le tissu conducteur cardiaque (Morales A. R. et al. 1992).

I.A.3. Aspects cliniques du prolapsus valvulaire mitral.

Les signes cliniques, électrocardiographiques et échocardiographiques sont très variables d'un individu à l'autre.

I.A.3.a. Symptomatologie.

La plupart des malades ne présentent aucun symptôme (Procacci P. M. et al. 1976). Chez les patients symptomatiques, les douleurs thoraciques, la dyspnée, l'asthénie, les vertiges, les palpitations sont les symptômes les plus fréquents. La douleur thoracique, qui est le symptôme le plus fréquent, est attribuée à une traction excessive sur le muscle papillaire. Elle est en générale aiguë, précordiale gauche, fugace ou persistant plusieurs heures. Les palpitations, les vertiges et les syncopes pourraient être secondaires aux arythmies supra-ventriculaires ou ventriculaires fréquentes dans cette maladie. Une hypotension orthostatique est également évoquée.

I.A.3.b. Aspects auscultatoires.

Le prolapsus de la valve mitrale s'accompagne habituellement à l'auscultation d'un click mésosystolique et/ou d'un souffle télé-systolique ou d'un souffle holosystolique mais il existe aussi des cas de prolapsus valvulaires mitraux silencieux (Barlow J. B. and Pocock W. A. 1979; Perloff J. K. et al. 1986) . Le diagnostic doit être confirmé par échocardiographie (Levine R. A. et al. 1988; Nishimura R. A. et al. 1985).

I.A.3.c. Aspects électrocardiographiques.

Des anomalies électrocardiographiques et des arythmies sont fréquentes dans le prolapsus

valvulaire mitral (Barlow J. B. 1968; Barlow J. B. et al. 1968). Les anomalies électrocardiographiques typiques consistent en des ondes T aplaties ou inversées dans les dérivations inférieures, fréquemment associées à un discret sous-décalage du segment ST dans les même dérivations. Ces modifications peuvent aussi s'observer dans les dérivations précordiales gauches et sont souvent fugaces.

Différents types d'arythmies ont été observés: les extrasystoles ventriculaires constitueraient le trouble du rythme le plus fréquent, des arythmies supraventriculaires (tachycardies, flutter et fibrillations auriculaires), des bradycardies sinusales et des arythmies ventriculaires sont également fréquentes. Les troubles de conduction sont rares. Ces modifications électrocardiographiques seraient secondaires à l'ischémie du muscle papillaire, à la fibrose résultante et aux lésions de frottement de l'endocarde. Les arythmies pourraient aussi être dues à la tension anormale des valves qui contiennent des fibres musculaires susceptibles de se dépolariser pendant la diastole.

I.A.3.d. Aspects échocardiographiques.

En échocardiographie bidimensionnelle, dans l'incidence longitudinale grand axe, les valves mitrales apparaissent déplacées en arrière et vers le haut durant la systole. Le critère diagnostique consiste en un mouvement systolique des feuillets valvulaires de plus de 2 mm au-delà de l'orifice auriculo-ventriculaire, avec déplacement du point de coaptation valvulaire au-dessus de l'anneau mitral, associé à un épaissement anormal des valves de plus de 4 mm pendant la diastole (Devereux R. B. et al. 1987; Levine R. A. et al. 1988). Le déplacement et l'épaisseur des feuillets valvulaires sont très variables.

I.A.3.e. Pronostic et complications.

Le prolapsus valvulaire mitral présente une évolution en général bénigne mais peut parfois présenter des complications telles qu'une aggravation de l'insuffisance mitrale, la rupture des cordages tendineux, une endocardite bactérienne, des accidents neurologiques vasculaires ischémiques transitoires, des arythmies graves ou la mort subite (Barlow J. B. and Pocock W. A.

1979; Davies M. J. et al. 1978; Devereux R. B. et al. 1976; Nishimura R. A. et al. 1985; Zuppiroli A. et al. 1995).

L'évolution semble être différente en fonction du sexe puisque les formes les plus sévères seraient observées chez les hommes (Devereux R. B. et al. 1982a).

I.A.4. Aspect génétique du prolapsus valvulaire mitral.

La plupart des cas de prolapsus valvulaire mitral sont sporadiques mais il existe cependant de nombreuses descriptions de formes familiales de la maladie. Le plus souvent la transmission serait autosomique dominante avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable (Bareiss P. et al. 1976a; Bareiss P. et al. 1976b; Froment R. et al. 1972; Hunt D. et al. 1969; Rizzon P. et al. 1973; Shell W. E. et al. 1969; Stannard M. et al. 1967; Weiss A. N. et al. 1975).

À partir de 45 petites familles comprenant 179 apparentés de premier degré de patients atteints de prolapsus valvulaire mitral, Devereux et coll avait pu montrer que le prolapsus se transmettait sur au moins 2 générations dans 23 de ces familles. Trente pour cent des apparentés des deux sexes étaient atteints de la maladie ce qui confirmait une transmission autosomique dominante avec un pénétrance incomplète de la maladie (Devereux R. B. et al. 1982a).

L'expression de la maladie est variable en fonction de l'âge et du sexe. La pénétrance est faible dans l'enfance (8%). Elle est plus faible chez les hommes (19%) que chez les femmes (41%). Cette différence de pénétrance est probablement responsable de la fréquence plus élevée de la maladie chez les femmes (Darsee J. R. et al. 1979; Markiewicz W. et al. 1976; Pocock W. A. et al. 1971; Procacci P. M. et al. 1976; Sbarbaro J. A. et al. 1979).

Le premier locus de prolapsus valvulaire mitral a été identifié en 1999 par l'équipe de X Jeunemaitre (Disse S. et al. 1999). En réalisant de manière systématique une échocardiographie aux apparentés de 17 patients opérés de prolapsus valvulaire mitral, ils ont pu identifier quatre familles dans lesquelles le prolapsus valvulaire mitral était transmis sur le mode autosomique dominant. Pour deux de ces familles, l'analyse de liaison génétique a permis de localiser un locus en 16p11-13 avec un intervalle de liaison minimal de 5cM ou maximal de 34cM en fonction du statut phénotypique de certains individus. La troisième famille pourrait être liée au même locus tandis que la quatrième ne l'est pas. Cela montre que ces formes familiales de prolapsus

valvulaire mitral sont génétiquement hétérogènes. Un deuxième locus situé sur le chromosome 11p15.4 a été récemment identifié (Freed L. A. et al. 2003).

Par ailleurs, des associations entre le risque de prolapsus valvulaire mitral et des polymorphismes dans le gène codant les exons 15 et 27 de la fibrilline ont été retrouvées. Des polymorphismes dans le gène codant l'enzyme de conversion de l'angiotensine ont également été mis en évidence (Chou H. T. et al. 2003a; Chou H. T. et al. 2003b).

I.B. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

I.B.1. Méthodes de détermination du phénotype.

I.B.1.a. Examen clinique et échocardiographique.

L'étude a été réalisée selon les recommandations françaises pour la recherche génétique. Un consentement écrit a été obtenu pour chaque membre de la famille ayant accepté de participer à l'étude. L'examen clinique comprenait un interrogatoire concernant les antécédents médicaux, un examen physique, en s'intéressant en particulier au système cardiovasculaire et aux pathologies du tissu conjonctif, un électrocardiogramme douze dérivations, une échocardiographie bi-dimensionnelle avec analyse Doppler. Des prélèvements de sang ont été réalisés pour les études génétiques et le dosage du facteur VIII antihémophilique. Un examen ophtalmologique a été pratiqué chez deux patients atteints de cette famille, il était normal.

Le diagnostic phénotypique des membres de la famille était basé sur l'examen échocardiographique. Une échocardiographie trans-thoracique en mode M et en mode bidimensionnelle a été réalisée selon les critères de la société américaine d'échocardiographie avec un appareil Sonos 2000™ (Hewlett-Packard Inc, Andover, MA) et une sonde de 3,5 MHz ou un appareil Sequoia C256™ (Acuson Inc. Mountain View, Californie) équipé d'une sonde multifréquence (3,5 à 2 MHz) (Henry W. L. et al. 1980). Toutes les échocardiographies ont été enregistrées sur cassette vidéo et ont été examinées en aveugle par deux cliniciens expérimentés.

Le diamètre de l'anneau mitral et l'épaisseur des feuillets ont été mesurés dans l'incidence parasternale grand axe en mode bidimensionnel sur une image arrêtée en diastole qui permet de séparer nettement les feuillets valvulaires des cordages (Weissman N. J. et al. 1994). Les valves ont été considérées comme dystrophiques lorsque leur épaisseur était supérieure à 4mm. Le diamètre de l'anneau mitral a été calculé en mesurant la longueur de la ligne joignant les points d'ancrage des feuillets valvulaire antérieur et postérieur à la fin de la diastole, juste avant le début du complexe QRS, et à la fin de la systole, avant l'ouverture de la valve. Le prolapsus de la valve mitrale existait lorsque les enregistrements dans l'incidence parasternale grand axe en mode bidimensionnel montraient un déplacement des feuillets mitraux dans l'oreillette gauche, par rapport à la ligne joignant les points d'ancrage des deux feuillets valvulaires à l'anneau mitral pendant la systole (Devereux R. B. et al. 1987). La fuite mitrale a été quantifiée par Doppler couleur dans trois plans de l'espace (Miyatake K. et al. 1986). La sévérité de la fuite mitrale a été estimée en calculant le RJA (Regurgitating jet area) maximum, exprimé en pourcentage du LAA (Left atrial area) (RJA/LAA). La fuite mitrale était considérée comme mineure lorsque le rapport RJA/LAA était inférieur à 20%, modérée lorsqu'il était compris entre 20 et 40% et sévère lorsqu'il était supérieur à 40% (Helmcke F. et al. 1987; Yoshida K. et al. 1988).

La mesure du diamètre de la chambre de chasse ventriculaire gauche (LVOTD pour Left Ventricular Outflow Tract Diameter) a été réalisée à partir d'échocardiographies dans l'incidence parasternale grand axe en mode bidimensionnel au niveau du point d'insertion des feuillets aortiques. Les dimensions de la crosse aortique ont été calculées à partir d'échocardiographies en mode M. La fuite aortique était définie par un flux diastolique anormal prenant naissance des sigmoïdes aortiques et dirigé vers la chambre de chasse ventriculaire gauche. La sévérité de la fuite aortique a été estimée en calculant le AJD (regurgitated jet diameter), exprimé en pourcentage du LVOTD (AJD/LVOTD) (Dolan M. S. et al. 1995). La fuite aortique était considérée comme mineure lorsque le rapport AJD/LVOTD était inférieur à 25%, modérée lorsqu'il était compris entre 25 et 40% et sévère lorsqu'il était supérieur à 40%.

Les valves tricuspides ont également été observées dans l'incidence apicale quatre cavités et les valves pulmonaires dans l'incidence parasternale gauche petit-axe.

Les sujets examinés ont été classés en trois catégories : sujets atteints, sujets sains et sujets au statut phénotypique indéterminé.

(1) Sujets atteints s'il existait un épaississement valvulaire mitral supérieur à 4 mm associé à un prolapsus supérieur à 2 mm avec ou non une fuite mitrale et une dilatation de l'anneau; ou bien s'il existait une fuite aortique avant 50 ans.

(2) Sujets sains si l'épaisseur valvulaire mitrale était inférieure à 2 mm sans prolapsus associé, ni fuite mitrale, ni dilatation évidente de l'anneau mitral et ni fuite aortique quel que soit l'âge.

(3) Sujets au statut phénotypique indéterminé dans les autres cas.

Pour un sujet décédé, le statut phénotypique a été déterminé par l'analyse du compte-rendu échographique préopératoire (remplacement valvulaire aortique) et par les constatations de l'examen anatomopathologique postopératoire.

I.B.1.b. Analyses statistiques.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test *t* de Student et le test de Mann-Whitney. Une valeur *p* inférieure à 0,05 était considérée comme significative. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes \pm SD (Standard Deviation).

I.B.1.c. Analyses biologiques.

L'activité du facteur VIII antihémophilique (F.VIII) a été dosée pour chaque patient participant à l'étude. Les sujets étaient considérés comme atteints d'hémophilie A mineure ou frustrée lorsque l'activité du F.VIII était comprise entre 5% et 40%.

I.B.1.d. Identification de nouvelles branches familiales à la famille atteinte de valvulopathie myxoïde pour réduire l'intervalle de liaison.

Afin de tenter de diminuer la taille de la zone de liaison que nous avons pu identifier sur

la famille initiale, nous avons recherché de nouvelles branches familiales par une approche basée sur la généalogie. Pour cela, nous avons utilisé notre registre des patients opérés de dystrophie valvulaire mitrale et/ou aortique au CHU de Nantes. Ce registre a été constitué à partir des compte-rendus anatomopathologiques post-opératoires colligés de 1983 à 2000. Environ 900 patients, sont inclus dans ce fichier.

Il existe par ailleurs un registre des patients hémophiles constitué par le centre régional de traitement de l'hémophilie du CHU de Nantes. Environ 60 patients de ce fichier appartenant à 40 familles différentes ont une hémophilie A mineure avec un dosage de l'activité du facteur VIII comprise entre 5 et 40 %.

Les cas index ont été choisis à partir de ces deux fichiers en restreignant notre sélection aux patients originaires de la même région que la famille atteinte de valvulopathie myxoïde liée au chromosome X. (lieu de naissance compris dans une zone prédéfinie d'environ 10 km² autour de Montaigu). Le lieu de naissance a été obtenu par l'intermédiaire des renseignements administratifs contenus dans le dossier médical du patient.

I.B.1.e. Enquête généalogique ascendante.

Une enquête généalogique ascendante a été réalisée à partir des cas index précédemment sélectionnés, à la recherche d'un ancêtre commun avec la famille initiale en collaboration avec le Professeur André Chaventré, spécialiste de la génétique des populations à l'Université de Bordeaux II.

Une enquête familiale aussi exhaustive que possible était réalisée chez les apparentés des patients identifiés à la recherche d'autres cas familiaux de la maladie.

I.C. RÉSULTATS.

I.C.1. Analyse clinique et génétique d'une famille atteinte d'une valvulopathie myxoïde liée au chromosome X.

I.C.1.a. Analyse clinique.

Le cas index, un garçon de 16 ans (patient V-11) avait une dyspnée de classe II selon la classification du NYHA (New York Heart Association). Il était de taille et de morphologie normales et l'examen physique n'a mis en évidence aucune anomalie du tissu conjonctif ou du squelette. L'auscultation cardiaque a révélé un souffle d'insuffisance aortique et l'échocardiographie a confirmé une fuite aortique sévère. Les dimensions de la crosse aortique étaient normales et a été confirmé par imagerie de résonance magnétique nucléaire de l'aorte thoracique. Le ventricule gauche était dilaté (diamètre de 34 mm/m² en fin de diastole) avec une fonction systolique normale. Une hémophilie A mineure a été diagnostiquée au moment du remplacement de la valve aortique. L'examen histologique de la valve excisée présentait les caractéristiques typiques de dégénérescence valvulaire myxoïde avec un épaissement important des bords libres de la valve. Un examen en microscopie électronique de la valve, après coloration par le bleu Alcian, l'hémalum-éosine-safran et la coloration de Weigert montrait une accumulation importante de protéoglycannes et une fragmentation des fibres de collagène. La crosse aortique était entièrement normale.

La même hémophilie modérée a été dépistée chez son cousin (patient V-9) à l'occasion d'une valvuloplastie pour fuite mitrale sévère résultant d'une dystrophie de la valve mitrale. Ce deuxième cas a permis d'identifier une très grande famille atteinte de dystrophie valvulaire myxoïde d'origine familiale. Parmi les 318 membres de cette famille, 302 étaient vivants et 89 ont accepté de participer à l'étude, parmi lesquels 43 femmes (âgées en moyenne de 36± 17 ans) et 46 hommes (âgés en moyenne de 22± 15 ans) (Figure 75). Une anomalie valvulaire a été retrouvée chez 22 sujets (9 hommes et 13 femmes).

Aucun des membres de cette famille ne présentait de signes cliniques de maladies syndromiques telles que les syndromes de Marfan et d'Elhers-Danlos.

La transmission de la maladie est liée au chromosome X dans cette famille et il existe une

coségrégation entre la valvulopathie et l'hémophilie A mineure.

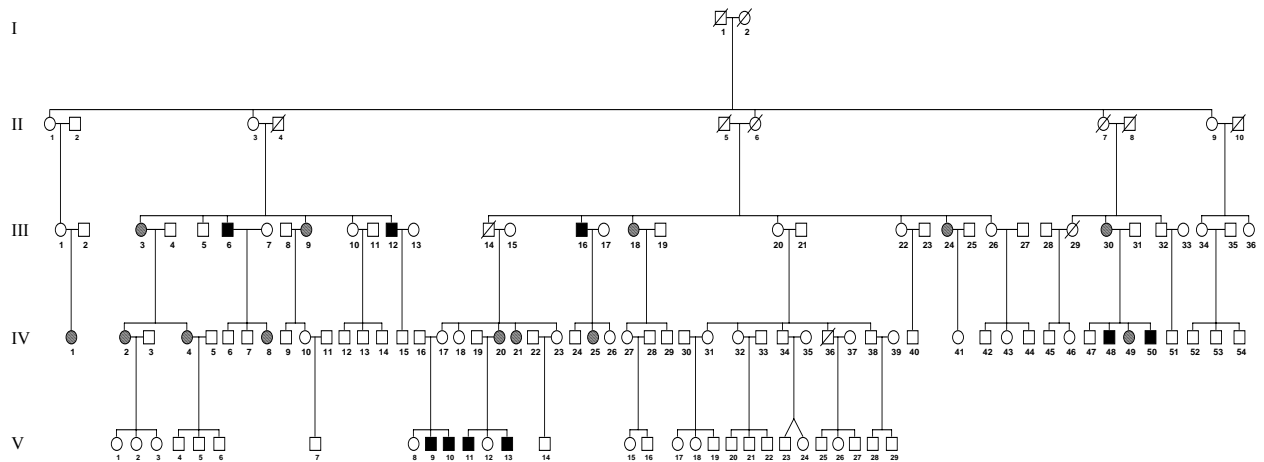


Figure 75 : Arbre généalogique de la famille V atteinte d'une valvulopathie myxoïde. Les sujets atteints sont représentés en noir. Les femmes transmettrices obligatoires sont représentées en hachuré. La transmission de la maladie est liée au chromosome X.

S'agissant d'une maladie liée au chromosome X les hommes et les femmes ont été analysés séparément.

I.C.1.b. Caractéristiques cliniques des hommes.

I.C.1.b.1. Anomalies de la valve mitrale.

Parmi les 46 hommes ayant participé à l'étude, 9 patients présentaient une anomalie évidente des valves aortique et/ou mitrale et ont été classés atteints. Quatre patients ont bénéficié d'une intervention de chirurgie valvulaire. Un patient a eu une valvuloplastie mitrale à 18 ans (patient V-9) et trois patients III-6, III-16 et V-11 ont nécessité un remplacement valvulaire aortique.

Tous les hommes atteints avaient une dystrophie valvulaire mitrale. La fuite était modérée chez 4 patients (IV-48, V-10, V-11, V-13) et sévère chez cinq autres (III-6, III-12, III-16, IV-49).

	Hommes atteints (N=9)	Hommes sains (n=37)	Valeur p
Age (années)	31± 17	20± 14	NS
Surface corporelle (m ²)	1,70±0,25	1,43± 0,51	NS
Epaisseur du feuillet mitral antérieur (mm)	4,7 ± 0,7	2,0 ± 0,4	< 0,0001
Epaisseur du feuillet mitral postérieur (mm)	3,8 ± 0,6	1,8 ± 0,4	< 0,0001
longueur du feuillet mitral antérieur (mm)	28,1 ± 2,4	22,1 ± 4,4	0,0004
longueur du feuillet mitral postérieur (mm)	13,6 ± 1,7	10,1 ± 1,8	0,0002
Diamètre de l'anneau mitral diastolique (mm)	31,3 ± 3,0	23,8 ± 5,1	0,0002
Diamètre de l'anneau mitral systolique (mm)	35,2 ± 3,3	27,5 ± 5,3	0,0004
Diamètre de la crosse aortique (mm)	30,6 ± 2,2	27,1 ± 1,1	NS
Diamètre diastolique du ventricule gauche (mm)	53,7 ± 6,8	43,5 ± 7,8	0,0014
Diamètre de l'oreillette gauche (mm)	36,7 ± 10,0	29,8 ± 6,0	NS
Fraction d'éjection (%)	69 ± 8	68 ± 7	NS

Tableau 12: Caractéristiques échocardiographiques des hommes atteints et sains de la famille

V. L'épaisseur et la longueur de la valve mitrale antérieure et postérieure et le diamètre de l'anneau étaient significativement plus importants chez les hommes atteints.

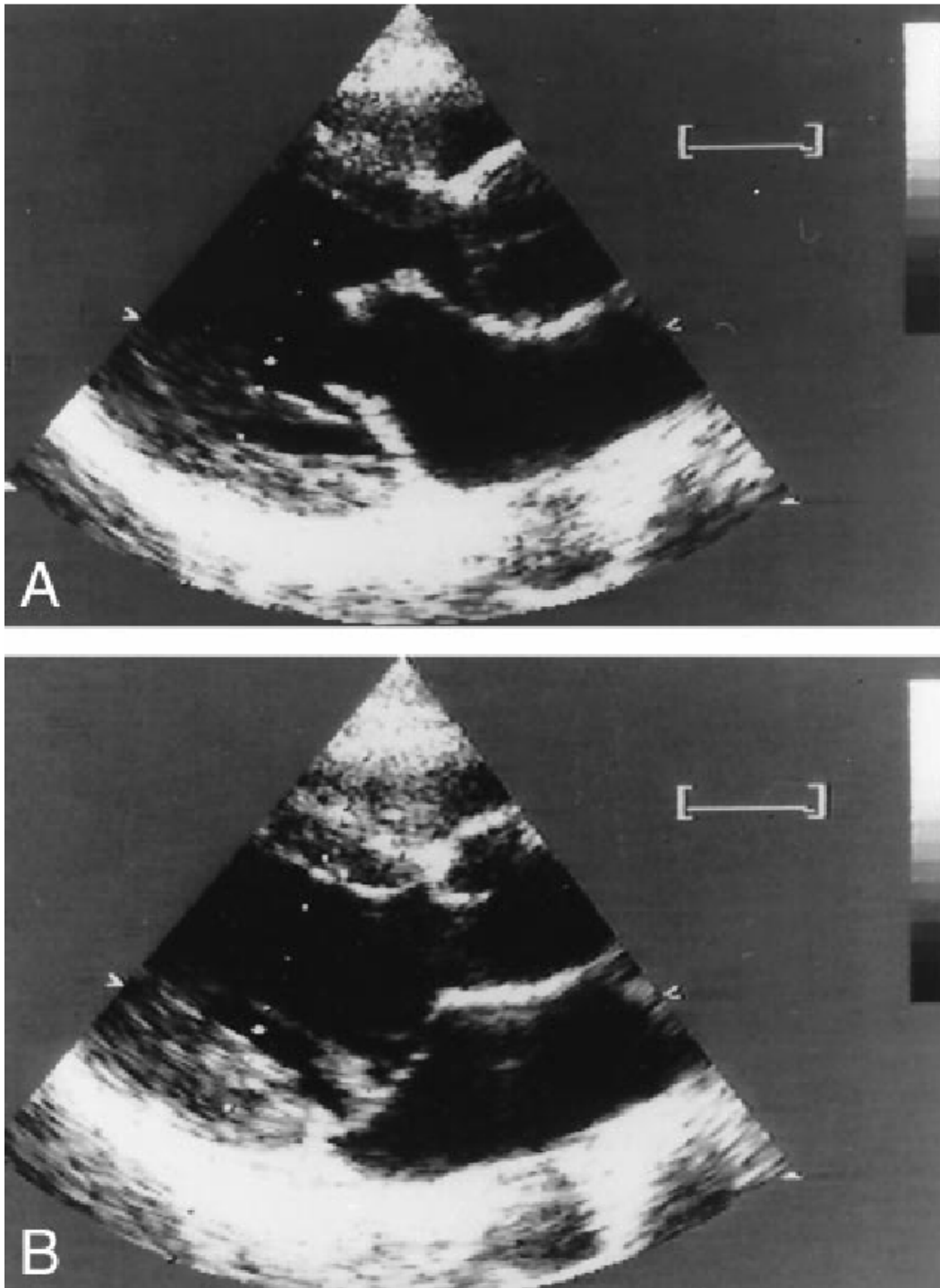


Figure 76 : Exemple d'une échographie d'un individu atteint montrant un épaissement des deux feuillets de la valve mitrale en diastole (A) et un prolapsus bivalvulaire en diastole (B).

I.C.1.b.2. Anomalies de la valve aortique.

Comme la valve aortique est difficile à examiner par échocardiographie trans-thoracique, nous avons quantifié la fuite aortique, qui était associée à une dystrophie de la valve mitrale chez six patients atteints. Chez trois de ces patients (III-6, III-16 et IV-11), la sévérité de la fuite aortique a entraîné un remplacement de la valve, respectivement à l'âge de 42, 24 et 16 ans. L'examen histologique des valves aortiques montrait des anomalies similaires à ceux décrits pour le cas index. Chez les trois autres hommes atteints (III-12, IV-50 et V-10), la fuite aortique a été jugée minimale ou modérée, avec un rapport AJD/LVOTD de 0,1, 0,24 et 0,26 respectivement. Les diamètres de la crosse aortique et de la chambre de chasse ventriculaire gauche n'étaient pas significativement différents entre les sujets atteints et les sujets sains. Les trois autres hommes atteints ne présentaient pas d'anomalie de la valve aortique.

Les hommes atteints avaient des diamètres diastoliques du ventricule gauche plus larges, alors que les diamètres de l'oreillette gauche ne différaient pas significativement. Les fractions d'éjection étaient les mêmes dans les deux groupes.

Le statut phénotypique des hommes pouvait facilement être caractérisé car les patients atteints avaient une dystrophie valvulaire évidente, les différenciant clairement des sujets de phénotype normal.

I.C.1.b.3. Anomalies hématologiques.

L'activité du F.VIII chez le cas index et son cousin était basse (0,31% et 0,29% respectivement), c'est pourquoi la coségrégation d'une hémophilie A et de la dystrophie valvulaire a été suspectée. La possibilité d'une maladie de Willebrand a été éliminée, et une hémophilie A mineure a été dépistée chez tous les hommes atteints de dystrophie valvulaire alors que tous les hommes sains avaient une activité F.VIII normale ($0,32\% \pm 0,05\%$ versus $0,91\% \pm 0,29\%$, $p < 0,0001$) (Figure 77).

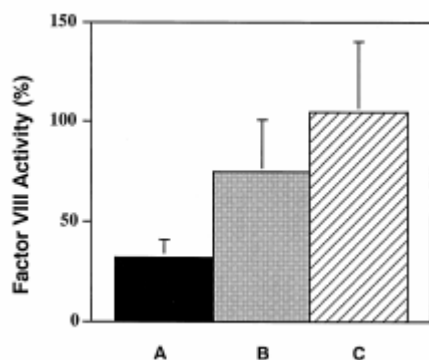


Figure 77 : Activité du facteur VIII chez les hommes atteints de la valvulopathie (A) ; les femmes hétérozygotes (B) et les sujets sains (C).

I.C.1.c. Etude génétique.

Le mode de transmission récessif lié au chromosome X et la coségrégation avec l'hémophilie A mineure a permis d'identifier rapidement la zone de liaison génétique.

Seuls les phénotypes des hommes ont été utilisés pour calculer le lod score, car le nombre d'hommes atteints était suffisant pour obtenir un score significatif. La pénétrance chez les femmes transmettrices obligatoires, à la différence des hommes, était incomplète. L'analyse de liaison génétique a trouvé un lod score maximal de 5,91 à 0% de recombinaison pour les marqueurs INT-13 (marqueur intragénique du FVIII) et DXS1108.

Marqueurs	Lod score à $\theta=$						
	0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
DXS998	-4,37	-0,17	-1	-1,42	-1,5	-1,17	-0,62
DXS8091	-4,38	2,95	3,36	3,27	2,71	1,94	1
DXS8011	-1,27	-0,02	0,54	0,68	0,66	0,52	0,3
DXS8061	3,84	3,78	3,54	3,22	2,53	1,76	0,89
INT13	5,91	5,81	5,41	4,89	3,81	2,64	1,34
DXS1108	5,91	5,81	5,41	4,9	3,82	2,65	1,35

Tableau 13 : Résultat du lod score au locus XMVD chez les hommes. L'analyse de liaison a permis de trouver un lod score maximal à $\theta=0$ de recombinaison pour les marqueurs DXS1108 et INT-13.

L'analyse des marqueurs flanquant a permis de définir une zone de liaison de 8cM entre les marqueurs DXS8011 et Xqter) (Figure 78).

Un polymorphisme très rare situé dans l'intron 13 du gène du facteur VIII, correspondant

à un demi-allèle et ségrégeant avec l'hémophilie A a été identifié dans cette famille.

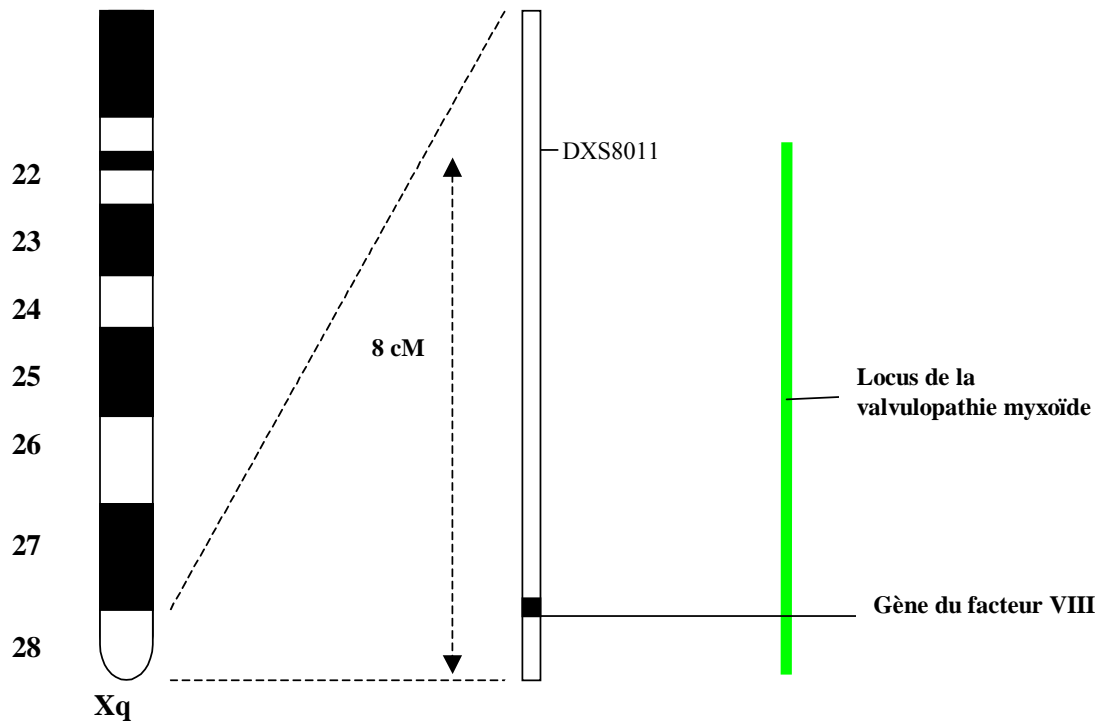


Figure 78 : Représentation schématique de la partie télomérique du bras long du chromosome X. Le gène de la valvulopathie myxoïde est situé entre le marqueur DXS8011 et Xqter dans un intervalle de 8 cM qui comprend le gène de l'hémophilie A.

La dystrophie valvulaire étant constamment associée à l'hémophilie A mineure il était donc très probable que les deux maladies coségrègent dans cette famille. La recherche de mutation dans le gène de codant le facteur VIII n'a pas retrouvé de mutation. Le déficit en facteur VIII est quantitatif et il est possible qu'il existe une mutation dans une séquence promotrice ou régulatrice de ce gène.

A partir des résultats de cette analyse génétique, les patients qui présentaient des anomalies valvulaires ou qui avaient hérité de l'haplotype complet ont été considérés atteints. Les femmes hétérozygotes pour cet haplotype ont été considérées comme transmettrices.

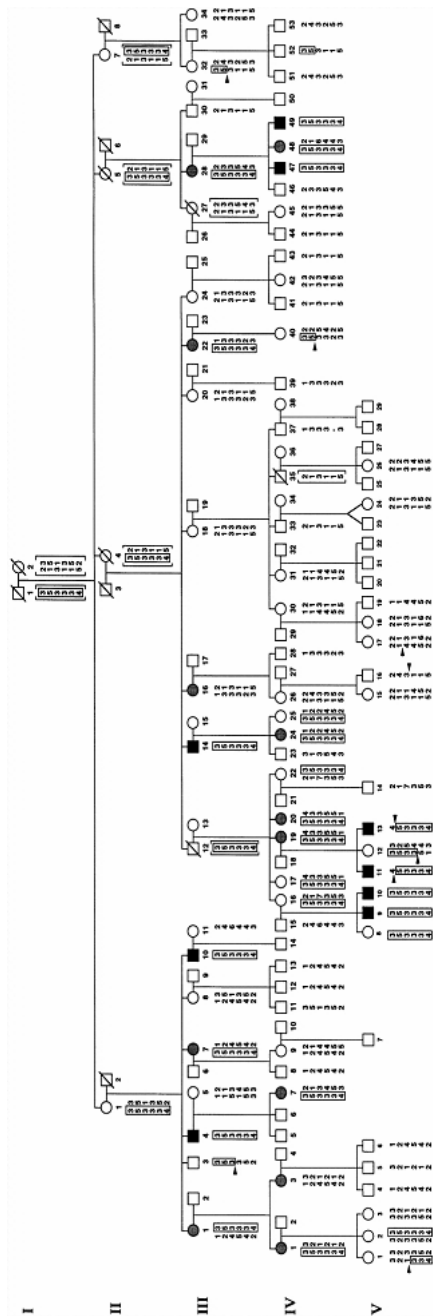


Figure 79 : Analyse de liaison génétique dans la famille V. Les individus atteints de valvulopathies sont représentés en noir. Les marqueurs testés sont du haut vers le bas (DXS998, DXS8091, DXS8011, DXS8061, INT13 et DXS1108). Les allèles déduits sont entre parenthèse. L'haplotype morbide a été encadré et les évènements de recombinaison ont été indiqués par une flèche.

I.C.1.c.1. Caractéristiques cliniques des femmes.

L'analyse de liaison génétique a permis de réaliser une analyse clinique approfondie de la dystrophie valvulaire, permettant l'identification des femmes transmettrices à partir de leurs haplotypes et l'analyse de l'expression du gène morbide chez les hétérozygotes. Parmi les 43 femmes de la famille, 17 femmes ayant hérité l'haplotype morbide complet, étaient hétérozygotes pour le gène associé à la maladie. Quatre autres femmes (III-34, IV-41, V-1 et V-12) ont hérité d'une partie de l'haplotype, avec des évènements de recombinaison dans la région candidate et leur statut est donc inconnu. L'analyse des caractéristiques cliniques entre les femmes hétérozygotes ayant héritées de l'haplotype complet et les femmes saines ne montre aucune différence significative entre les deux groupes (Tableau 14).

	Femmes hétérozygotes (N=17)	Femmes saines (n=24)	Valeur p
Age (années)	38± 18	37± 17	NS
Surface corporelle (m ²)	1,59±0,13	1,61± 0,31	NS
Epaisseur du feuillet mitral antérieur (mm)	2,5 ± 0,5	2,3 ± 0,5	NS
Epaisseur du feuillet mitral postérieur (mm)	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3	NS
longueur du feuillet mitral antérieur (mm)	24,0 ± 2,9	22,7 ± 2,9	NS
longueur du feuillet mitral postérieur (mm)	13,6 ± 1,7	10,1 ± 1,8	NS
Diamètre de l'anneau mitral diastolique (mm)	11,2 ± 1,5	10,6 ± 1,6	NS
Diamètre de l'anneau mitral systolique (mm)	25,5 ± 3,4	26,2 ± 3,2	NS
Diamètre de la crosse aortique (mm)	29,8 ± 3,5	28,8 ± 4,1	NS
Diamètre diastolique du ventricule gauche (mm)	47,7 ± 2,7	44,7 ± 2,7	NS
Diamètre de l'oreillette gauche (mm)	31,1 ± 4,4	29,7 ± 3,8	NS
Fraction d'éjection (%)	72 ± 6	68 ± 6	NS

Tableau 14 : Comparaison des caractéristiques cliniques entre les femmes hétérozygotes ayant héritées de l'haplotype complet et les femmes saines. Aucune différence significative n'est retrouvée entre les deux groupes.

Chez les femmes pour lesquelles le statut génétique était indéterminé en raison d'événement de recombinaison, les échocardiographies étaient normales. La patiente III-32 a été considérée saine car son fils qui avait hérité du même haplotype était sain.

I.C.2. Identification de nouvelles branches familiales pour la famille V.

I.C.2.a. Branche atteinte de dystrophie valvulaire et d'hémophilie A.

En couplant l'analyse du fichier des patients opérés au CHU de Nantes d'une dystrophie valvulaire avec le registre régional des patients hémophiles, nous avons pu identifier un individu cumulant les deux anomalies et originaire de la même région que la famille initiale V.

Il s'agissait d'un patient opéré d'une fuite aortique en 1984, décédé en 1992 des complications liées à l'infection par HIV contractée à l'occasion des transfusions préventives de facteur VIII en péri-opératoire. L'enquête familiale a néanmoins été possible car la mère de ce patient, âgée de 93 ans, était également suivie en consultation dans le service de cardiologie pour une fuite mitrale dystrophique modérée.

L'enquête généalogique ascendante a conforté notre hypothèse de départ en prouvant un apparentement éloigné entre cette famille G. et la famille initiale V. L'ancêtre commun est né XVIIIe siècle dans la même région de Vendée. Il s'agit donc du sujet fondateur ou de l'un de ses descendants (Figure 80).

Parmi les membres de cette famille, quatre hommes étaient atteints de dystrophie valvulaire mitrale associée à une fuite aortique de sévérité variable (patient VI-15, VI-18, VII-7, VII-8). Seul le patient index avait bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique (patient VI-15). Trois des quatre sujets atteints de cette famille avait une hémophilie A mineure. Un individu n'avait pas d'hémophilie (patient VII-8).

Cinq femmes avaient une dystrophie modérée ou minime de la valve mitrale associée à une fuite aortique chez trois d'entre elles (patientes V-11, VI-12, VII-9, VII-11 et VII-12).

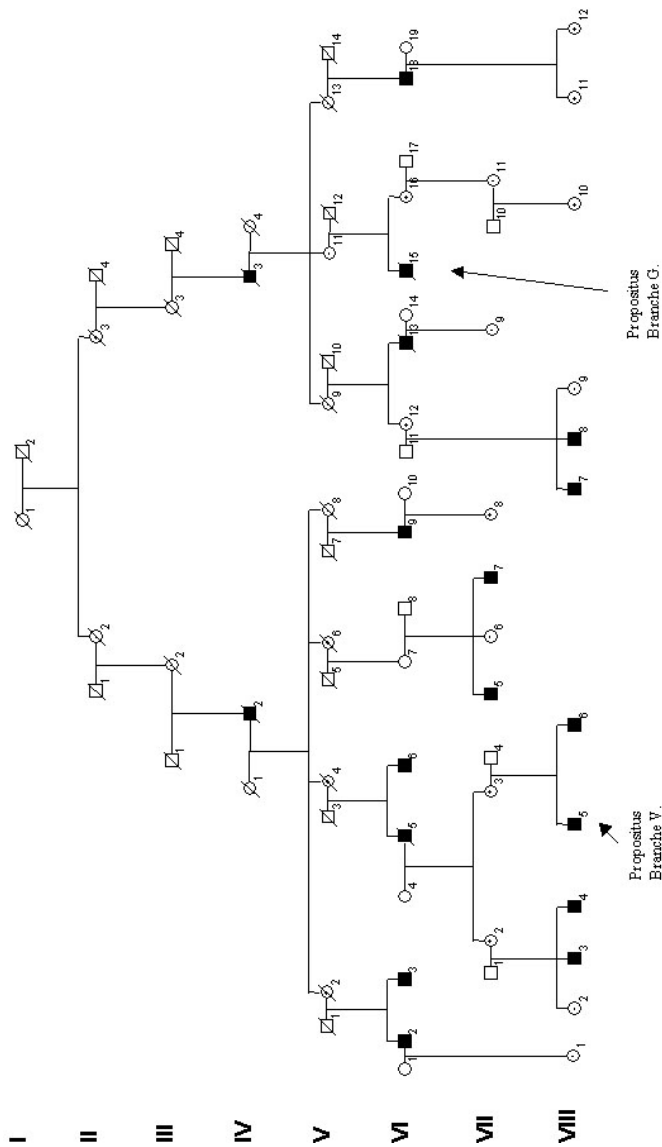


Figure 80 : Arbre généalogique des familles V et G montrant l'ancêtre commun né vers 1780.

Pour des raisons de place seuls les individus atteints sont représentés. L'individu VII-8 n'avait pas d'hémophilie mais était atteint d'une valvulopathie ce qui a permis de réduire la zone de liaison.

Une recombinaison génétique entre le marqueur DXS1073 et le gène de l'hémophilie a été mise en évidence chez le sujet VII-8 porteur de la maladie valvulaire mais sans anomalie de la coagulation.

La portion télomérique du chromosome X ne contient donc pas le gène de la valvulopathie et l'intervalle de liaison peut donc être réduit à un intervalle à 6cM en excluant la

partie la plus télomérique du chromosome X contenant le gène du facteur VIII (Figure 81).

Cette recombinaison montre que nous ne sommes pas en présence d'un syndrome mais bien d'une double pathologie génétique (l'hémophilie A et la valvulopathie myxoïde) coségrégeant chez de nombreux sujets de la même famille.

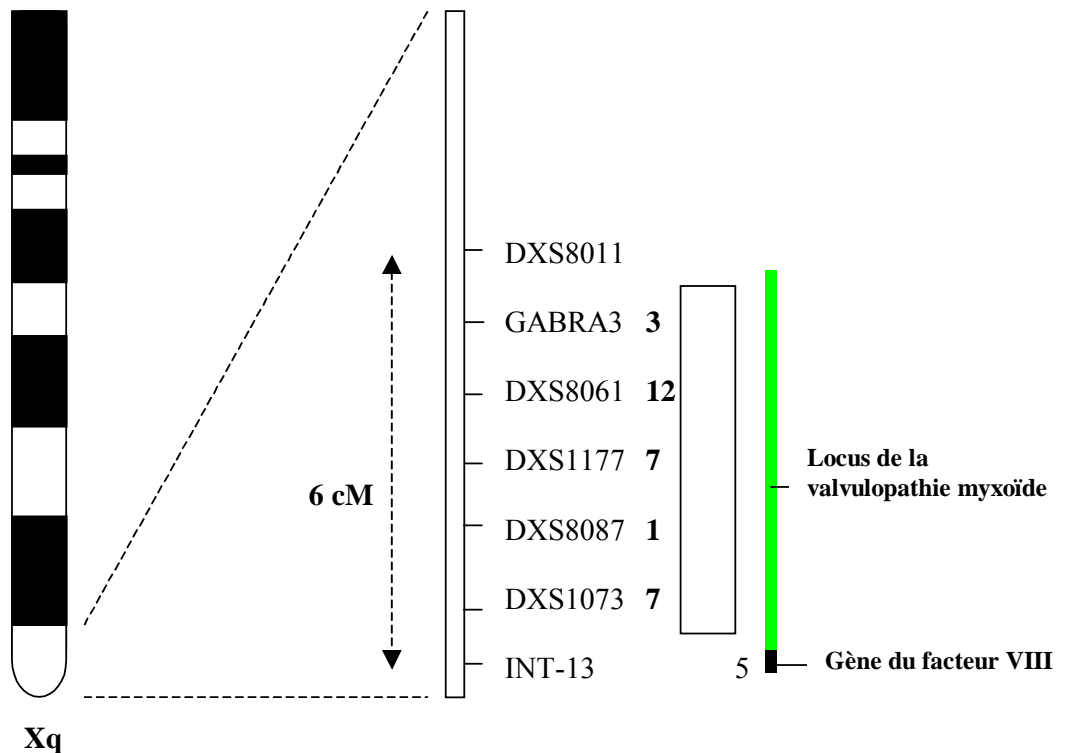


Figure 81 : Réduction de l'intervalle de liaison de la dystrophie valvulaire par la mise en évidence d'un événement de recombinaison excluant le marqueur INT-13 chez un individu atteint (porteur de l'anomalie valvulaire) de la nouvelle branche G.

L'haplotype morbide hérité du sujet fondateur est encadré.

I.C.2.b. Branche D et R, atteintes d'hémophilie A mineure isolée.

A partir du fichier des patients atteints d'hémophilie A mineure nous avons identifié deux

sujets issus de la même région que la famille initiale et ayant hérité le polymorphisme intronique du gène du FVIII, qui semblerait spécifique de cette famille. Une enquête familiale a permis de trouver d'autres individus atteints parmi les membres des familles de ces deux individus qui ont été appelées les familles D et R (Figure 82). L'enquête généalogique n'a pas permis de relier ces deux familles à la famille V initiale ni de relier ces deux familles entre elles, mais la probabilité pour que ces deux familles soient apparentées à la famille initiale est très forte. Des examens échocardiographiques n'ont identifié aucune anomalie valvulaire chez aucun de ces individus.

La comparaison des haplotypes montre que les individus atteints de cette famille ont hérité, en plus du polymorphisme caractéristique du gène du FVIII, une partie de l'haplotype morbide de la famille initiale atteinte de valvulopathie et d'hémophilie, suggérant la perte de la région de chromosome contenant le gène de la valvulopathie au cours des méioses successives depuis le sujet potentiellement fondateur né au 17^e siècle. Ce résultat permettrait donc de réduire la zone de liaison de la dystrophie valvulaire dans un intervalle de 4 cM entre les marqueurs DXS8011 et DXS8087 (Figure 83)

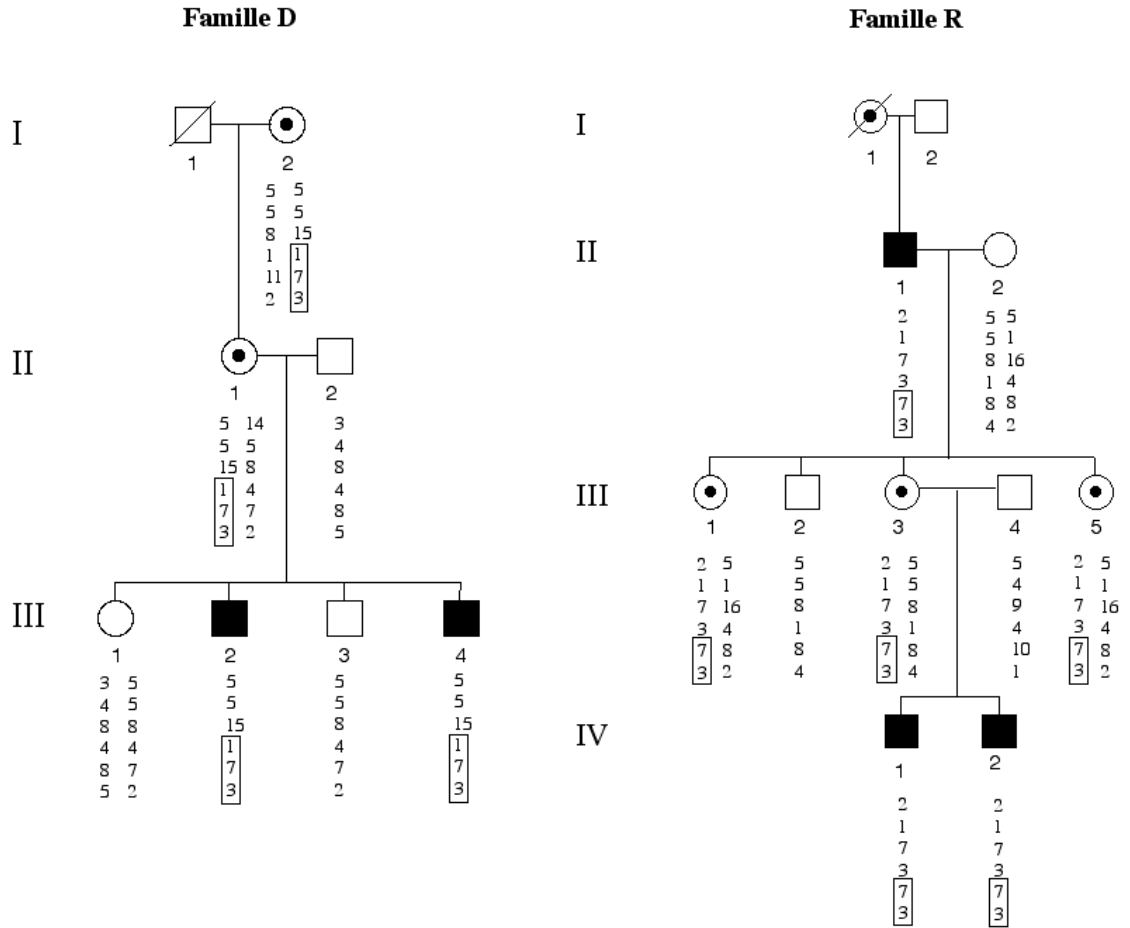


Figure 82: Représentation des familles D et R atteintes d'hémophilie A mineure isolée. Les hommes atteints sont représentés en noir, les femmes transmettrices sont représentées par un point noir au centre du symbole. Les marqueurs testés sont dans l'ordre (du haut vers le bas) : GABRA3, DXS8061, DXS1177, DXS8087, DXS1073, INT13. Les haplotypes encadrés représentent la partie d'haplotype commune avec la famille V atteinte de valvulopathie et d'hémophilie.

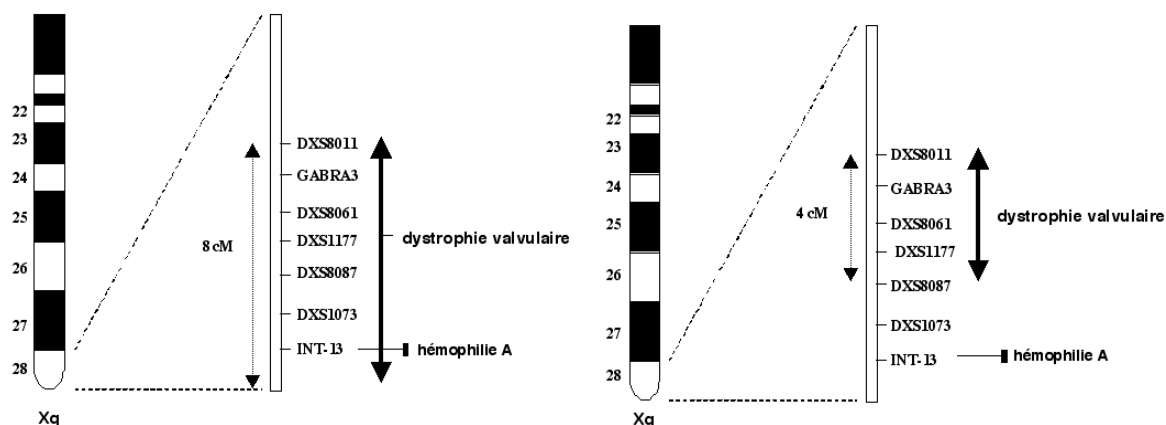


Figure 83: Représentation schématique de la partie télomérique du bras long du chromosome X avec les marqueurs utilisés pour les analyses de liaison génétique. La découverte des recombinaisons dans la branche G atteinte de valvulopathie et d'hémophilie et dans les petites familles D et R atteintes d'hémophilie A isolée ont permis de montrer que l'hémophilie et la valvulopathie étaient associées à des mutations dans deux gènes différents et permettrait de réduire l'intervalle de liaison initiale de 8 à 4 cM.

I.C.3. Recherche de mutation dans les gènes candidats de la région.

Quatre gènes qui pouvaient être des candidats potentiels ont été séquencés, à partir d'amorces décrites dans la littérature ou que nous avons choisies à partir des séquences génomiques disponibles.

L'un de ces gènes (*BGN*) code la biglycane, une petite protéoglycane matricielle de 369 acides aminés, exprimée dans le tissu conjonctif de nombreux tissus et capable d'interagir avec d'autres composants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes. Par le biais de ces interactions, elle joue des rôles structuraux et fonctionnels au sein de la matrice (Schonherr E. et al. 1995). Ce gène comporte 8 exons répartis sur une distance génomique de 6 Kb entre les marqueurs DXS1177 et DXS8087. Un modèle de souris invalidée pour ce gène présente un retard

de croissance et une diminution de la masse osseuse mais ne présenterait pas de phénotype cardiovasculaire (Xu T. et al. 1998). Néanmoins, en raison de l'importance des protéoglycanes de la matrice extracellulaire dans le tissu conjonctif des valves, ce gène a été séquencé chez l'un des individus atteints. Nous n'avons identifié aucune mutation dans les régions codantes.

Le gène *GPR50* (G protein-coupled receptor 50), localisé entre les marqueurs DXS8011 et GABRA3, code un récepteur membranaire de 617 acides aminés, possédant un domaine syndécane. Les protéines membranaires à domaine syndécane, sont capables d'interagir à la fois avec des composants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes, les tenascines et les facteurs de croissance et avec des composants du cytosquelette. La composition en glycosaminoglycanes des syndécanes varie entre les tissus et jouerait un rôle dans la reconnaissance des ligands. Ces récepteurs de surface cellulaire permettraient la transduction de signaux entre la matrice extracellulaire et l'intérieur de la cellule, pour contrôler l'expression des gènes dont ceux qui codent pour les composants de la matrice extracellulaire (Adams J. C. et al. 1993).

La fonction de la protéine GPR50 est inconnue mais elle pourrait être impliquée dans la physiopathologie de ces maladies valvulaires. Le séquençage des deux exons codants de cette protéine n'a pas permis de trouver de mutation chez les sujets atteints de la famille.

Le gène *ZNF185*, localisé entre les marqueurs DXS8061 et DXS1177, code un facteur de transcription à domaine LIM de 452 acides aminés. Il serait exprimé de façon sélective dans les tissus conjonctifs en différenciation, notamment au niveau du cœur (Heiss N. S. et al. 1997). Ce facteur aurait pu jouer un rôle dans le développement embryonnaire des valves cardiaques mais les 20 exons de ce gène ont été séquencés et aucune mutation n'a été trouvée dans les régions codantes.

Nous avons également séquencé le gène codant pour la filamine A. Ce gène pouvait être considéré comme un bon candidat car des mutations avaient été identifiées chez des patients atteints de dysplasie frontométaphysaire chez lesquels la fréquence des anomalies cardiaque est élevée. Des prolapsus valvulaires mitraux sont fréquemment retrouvés chez ces patients (Hadjimiltiades S. et al. 1986; Kakita A. et al. 2002; Moro F. et al. 2002).

Le séquençage de la région codante de la filamine A a permis d'identifier une mutation

faux sens C→A c1910 dans l'exon 13 qui est prédit pour entraîner le remplacement d'une proline par une glutamine au niveau de l'acide aminé 637 (P637Q) (Figure 84).

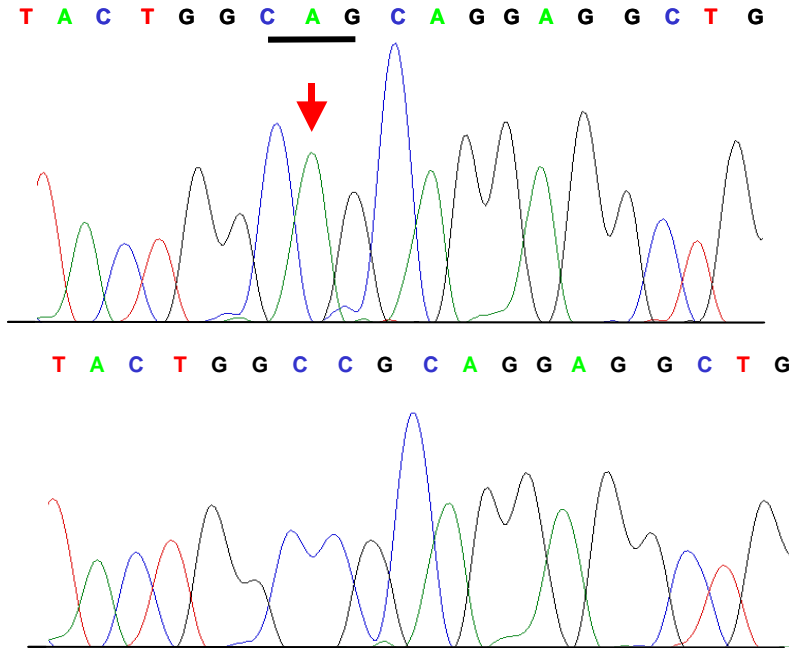


Figure 84 : Séquence de l'exon 13 de la filamine A montrant une mutation C→A c1910 entraînant le remplacement d'une proline par une glutamine au niveau de l'acide aminé 637 (P637Q).

Cette mutation était retrouvée chez tous les patients atteints de la famille et n'était pas présente chez les patients non-atteints de la famille ni chez 300 contrôles sains.

Nous avons depuis recherché des mutations dans ce gène dans plusieurs petites familles. L'une avait été identifiée en Angleterre (Figure 85), l'autre à Hong Kong (Figure 86). Une mutation G→A en position 862 dans l'exon 5 entraînant le remplacement d'une Glycine par une Arginine (G288R) a été retrouvée chez un des individus atteints de la famille anglaise (Figure 85) et une délétion de 1944 paires de base correspondant à une séquence codante de 546 paires de base entre les exons 15 et 19 a été identifiée dans la famille de Hong Kong (Figure 86).

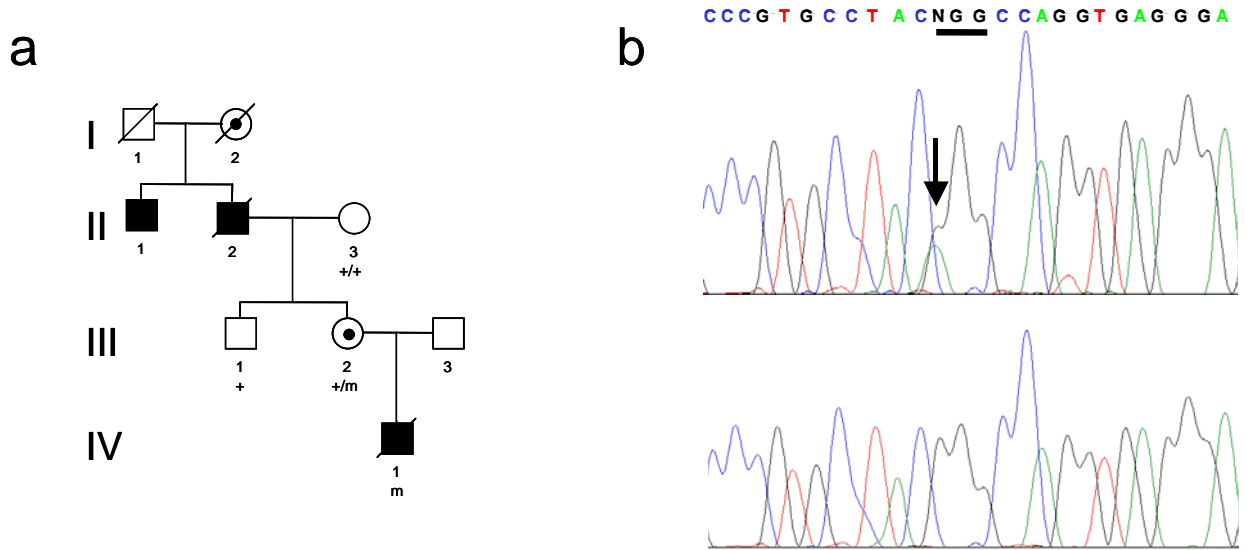


Figure 85 : a : Arbre généalogique de la famille anglaise atteinte de valvulopathie myxoïde.

b : Le séquençage de la filamine A a permis d'identifier une mutation $G \rightarrow A$ c862 responsable d'un remplacement d'une Glycine par une Arginine (G288R) chez les individus atteints.

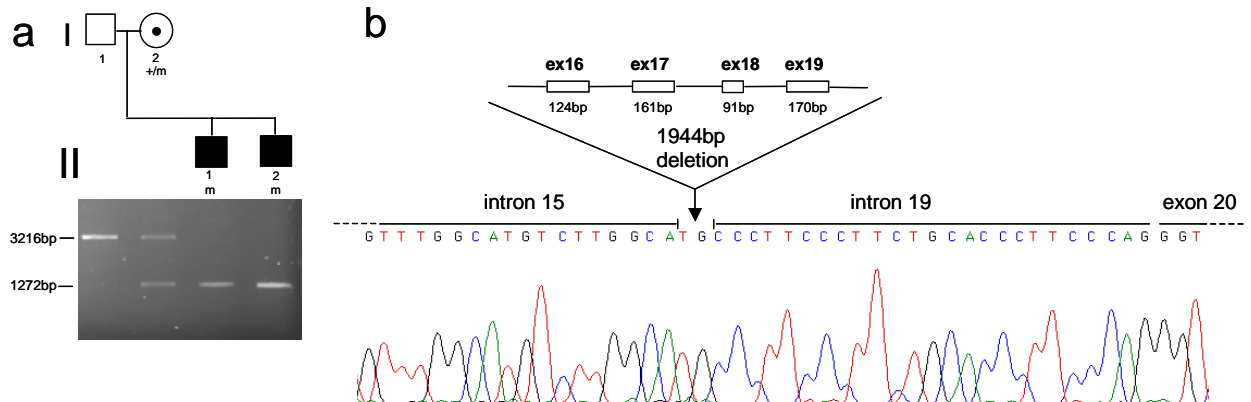


Figure 86 : a : Famille de Hong Kong atteinte de valvulopathie myxoïde.

b : Délétion de 1944 paires de base correspondant à une séquence codante de 546 paires de base entre les exons 15 et 19.

I.C.4. Formes autosomiques dominantes de prolapsus valvulaire mitral.

Nous avons identifié une famille atteinte de prolapsus valvulaire mitral isolé transmis de façon autosomique dominant. Parmi les 44 membres vivants de cette famille, 32 ont accepté de participer à l'étude (Figure 87). Le propositus (III-3) ainsi que son cousin (III-13) avaient un prolapsus valvulaire mitral myxoïde avec une fuite mitrale sévère, pour lesquels ils avaient bénéficié d'un remplacement valvulaire mitral à l'âge de 68 ans (patient III-3) et 60 ans (patient III-13).

Les quatre autres sujets atteints de cette famille avaient également une dystrophie valvulaire mitrale avec un épaissement valvulaire supérieur à 5 mm, un prolapsus des feuillets valvulaires supérieur à 2 mm et une fuite mitrale de gravité mineure à modérée. Aucune autre anomalie cardiaque ou extra-cardiaque n'a été retrouvée dans cette famille.

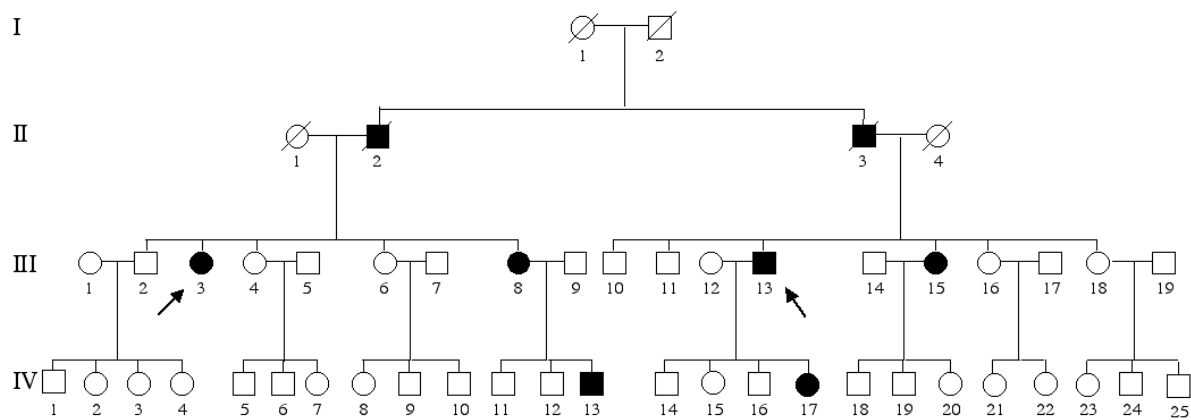


Figure 87: Représentation schématique de la famille L. Les individus atteints de prolapsus valvulaire mitral sont représentés en noir. Les deux propositus qui ont été à l'origine de la découverte de cette famille sont indiqués par une flèche.

Après avoir exclu une liaison génétique avec le locus de prolapsus valvulaire mitral sur le chromosome 16 et 11 (Disse S. et al. 1999; Freed L. A. et al. 2003), nous avons entrepris une analyse de liaison sur l'ensemble du génome avec les marqueurs microsatellites du Genethon

(ABI PRISM™ Linkage Papping Set-MD10 version 2, PE Biosystem). Aucun marqueur n'a pu être associé à la maladie et il est apparu probable qu'une hétérogénéité génétique au sein de cette famille soit la cause de l'absence de liaison génétique. Il semble donc qu'au sein de cette famille deux anomalies génétiques différentes, soient responsables du prolapsus valvulaire mitral. Il est également possible que des membres de ces familles soient atteints de valvulopathies myxoides sans être porteurs du gène morbide (phénocopies) ce qui rend l'analyse de liaison infructueuse.

Afin de tenter d'augmenter la taille de ces deux noyaux familiaux, pour les rendre informatifs, nous avons réalisé des enquêtes généalogiques à partir des sujets atteints de ces familles et des patients issus de notre fichier hospitalier des patients opérés de valvulopathie myxoïde. Nous avons pu identifier un ancêtre commun entre ces deux noyaux familiaux et quelques cas sporadiques atteints de prolapsus valvulaire mitral mais la taille des familles obtenues actuellement est insuffisante pour réaliser une analyse de liaison génétique.

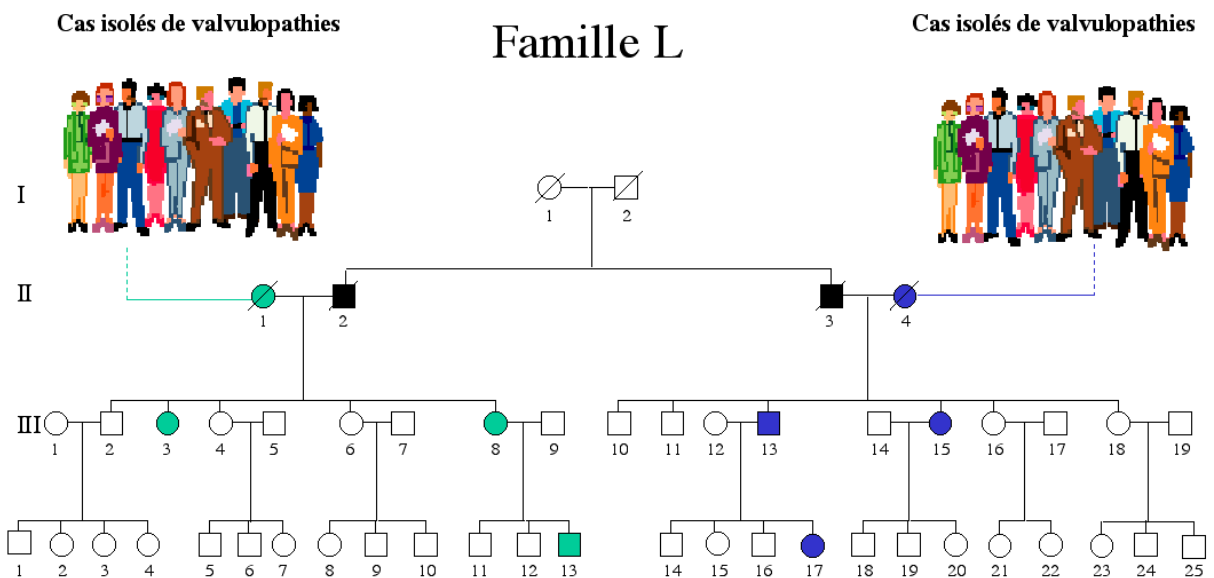


Figure 88: Représentation schématique de l'hétérogénéité génétique au sein de la famille L. Aucun marqueur n'a pu être associé à la maladie dans cette famille et il semble que deux types d'anomalies génétiques différentes (représentées en bleu et en vert) soient responsables d'une même forme de prolapsus valvulaire mitral. Des enquêtes généalogiques ont permis de rattacher chaque branche de la famille à plusieurs cas sporadiques faisant partie du fichier des

patients opérés au CHU de Nantes de dystrophie valvulaire.

Néanmoins en comparant les allèles des sujets atteints dans chacune de ces familles avec ceux des cas sporadiques potentiellement apparentés, il a été possible de trouver un marqueur commun entre l'une des branches familiales et des cas sporadiques potentiellement apparentés. Ce marqueur est situé à proximité du gène de la fibuline-1 (*FBLN1*), localisé en 22q13.3 (Korenberg J. R. et al. 1995).

Les fibulines sont des glycoprotéines de la matrice extracellulaire qui se trouvent dans les lames basales de nombreux tissus et dans les zones présentant au cours du développement une transition d'un tissu épithélial vers un tissu mésenchymateux.

Les fibulines sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (le nidogène, la fibronectine, les laminines, le collagène IV) et fixe aussi aux intégrines, établissant ainsi un lien avec le cytosquelette de la cellule (Balbona K. et coll. 1992, Pan T.C. et coll. 1993, Adam S. et coll. 1997, Miosge N. et coll. 1998). Elle ont été identifiées au sein des fibres élastiques et seraient associées aux fibres élastiques du tissu conjonctif contenant l'élastine mais non dans les microfibrilles contenant la fibrilline (Roark E.F. et coll. 1995). Ces possibilités de fixation multiples permettraient aux fibulines de s'intégrer aux lames basales et aux structures complexes extracellulaires et elles pourraient jouer le rôle de connecteur entre les différentes protéines de la matrice extracellulaire (Sasaki T. et coll. 1995).

Etant donné le rôle potentiel de ces protéines dans la physiopathologie des atteintes valvulaires, ce gène semblait être un bon candidat. Nous en avons réalisé le séquençage mais aucune mutation n'a été trouvée dans les régions codantes. Cependant, plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans des introns. Ces polymorphismes ségréguent chez les sujets atteints et sont absents chez les sujets sains de cette famille. On ne peut exclure qu'ils puissent être responsables de la maladie. En effet certaines mutations introniques peuvent être à l'origine de transcrits d'épissage anormaux. Cela a été retrouvé dans le gène de la fibrilline-2 dans une forme d'arachnodactylie contracturante ou dans le gène COL1A1 dans l'ostéogenèse imparfaite (Bonadio J. et al. 1990; Miosge N. et al. 1995).

I.D. DISCUSSION.

Ce travail a permis pour la première fois d'identifier un gène responsable de valvulopathie myxoïde. L'identification de trois mutations différentes dans le gène codant la filamine A dans trois familles atteintes de valvulopathies myxoïdes à transmission liée au chromosome X permet d'aborder la physiopathologie de cette maladie.

Le monomère de filamine comprend une partie N terminale qui se lie à l'actine et une série de 24 répétitions de domaines qui vont se lier à de nombreuses protéines membranaires et du cytoplasme (Figure 89). *In vivo*, la filamine est présente sous forme de dimères, la dimérisation dépendant des domaines C terminaux (Stossel T. P. et al. 2001; van der Flier A. et al. 2001).

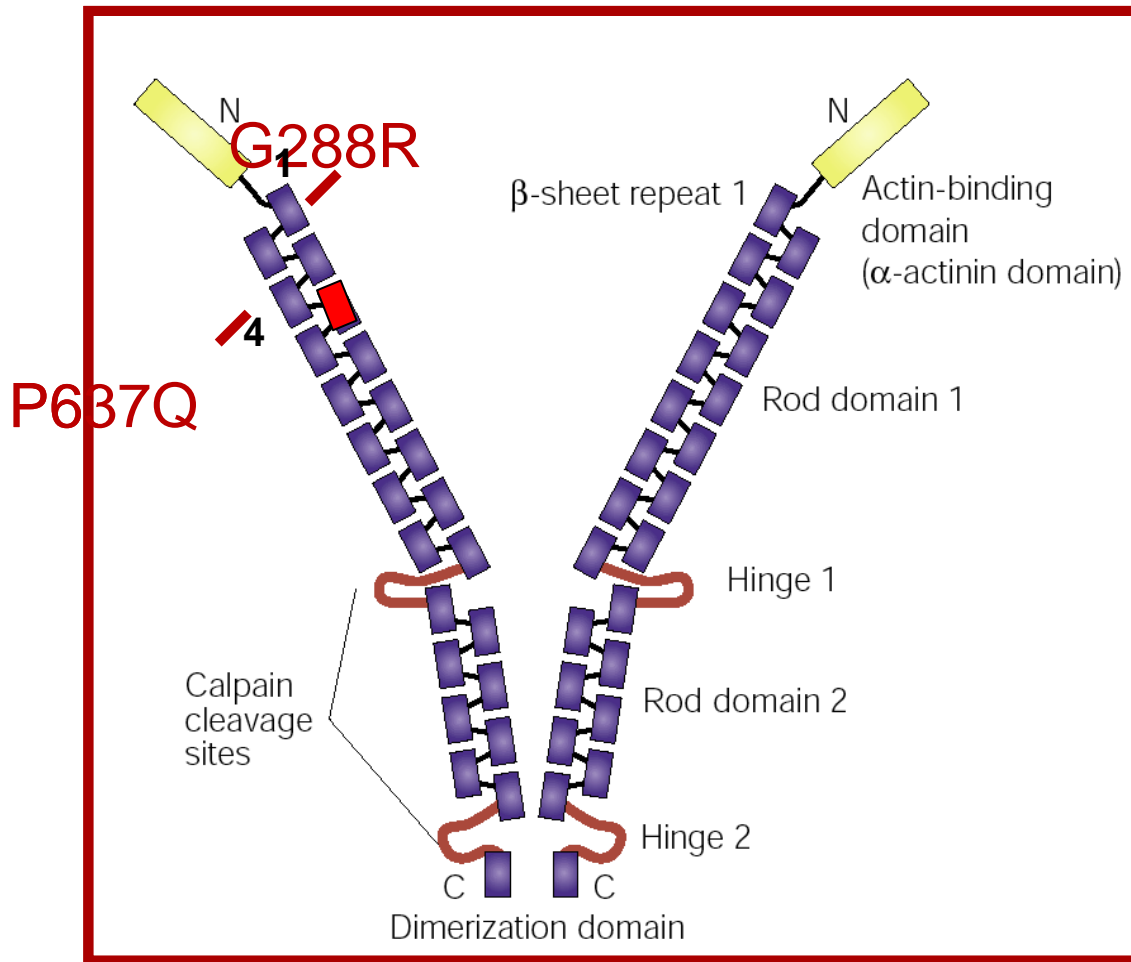


Figure 89 : Représentation schématique de la filamine A avec la position des différentes mutations identifiées.

Les mutations G288R et P637Q sont situées dans le premier et le 4^{ème} domaine de répétition tandis que la protéine tronquée due à la délétion de la famille de Hong Kong correspond à une perte des domaines de répétition entre les domaines 5 et 7. Les deux mutations faux sens identifiées sont situées dans des zones très conservées qui interviennent sur la conformation tri dimensionnelle de la protéine (Barry C. P. et al. 1993; Gorlin J. B. et al. 1990; van der Flier A. and Sonnenberg A. 2001).

La filamine module l'organisation du cytosquelette d'actine en réseaux parallèles ou orthogonaux. Elle joue un rôle dans l'interaction entre les réseaux d'actine et les récepteurs transmembranaires pour moduler les signaux de transduction de cellule à cellule, entre les cellules et la matrice et également la transduction du signal intra-cytoplasmique (van der Flier A.

and Sonnenberg A. 2001).

Chez les mammifères, trois gènes codant pour la filamine sont identifiés (FLNA, FLNB et FLNC). Les FLNA et FLNB sont exprimées de manière ubiquitaire alors que FLNC n'est exprimée que dans le muscle (Gorlin J. B. et al. 1990; Takafuta T. et al. 1998).

Des mutations dans la filamine A avaient déjà été identifiées dans 5 pathologies différentes. Le syndrome otopalatodigitale de type I et II (OMIM 311300 et 304120), le syndrome de Melnick-Needles (OMIM 309350), l'hétérotopie nodulaire périventriculaire (OMIM 300049) et la dysplasie frontométaphysaire (OMIM 305620) (Fox J. W. et al. 1998; Robertson S. P. et al. 2003).

Les raisons pour lesquelles les mutations que nous avons retrouvées dans ces différentes familles entraînent uniquement un phénotype cardiaque restent inconnues.

Il est encore actuellement difficile de connaître la physiopathologie exacte de la valvulopathie dans ces familles. Cependant, la filamine A joue un rôle majeur dans la transmission du signal en particulier entre la matrice extracellulaire et le noyau. Il est possible que la transduction de signaux entre la matrice extracellulaire et l'intérieur de la cellule soit déformée par les mutations de la filamine. Le contrôle de l'expression des gènes en particulier ceux qui codent pour les composants de la matrice extracellulaire ne se ferait plus correctement. Comme les valves sont soumises en permanence à un stress hémodynamique important, la réponse anormale à ce stress pourrait dépendre d'une mauvaise transmission du signal responsable l'accumulation de protéoglycanes observée sur les coupes histologiques. Cela pourrait expliquer l'apparition progressive de la maladie.

Nous allons maintenant tenter de comprendre les mécanismes qui sont responsables de la valvulopathie myxoïde chez les patients porteurs de la mutation de la filamine A. Nous avons pu récupérer une valve d'un patient atteint. Les analyses anatomopathologiques sur cette valve devraient nous permettre de connaître la répartition intracellulaire de la filamine chez ce patient.

Nous ne sommes pas encore parvenus à identifier le locus responsable de la forme autosomique dominante dans nos familles mais nous avons pu montrer que la maladie n'était pas liée aux locus préalablement identifiés. Nous souhaitons, afin de pouvoir développer ces familles réaliser un dépistage de la maladie dans les familles des cas index identifiés à partir de notre fichier et qui peuvent être reliés aux noyaux familiaux que nous avons identifiés. Ce travail de dépistage est long et demande beaucoup d'énergie mais nous avons montré qu'il pouvait

permettre, au moins dans des cas privilégiés comme dans la famille dans laquelle ségrégeait la valvulopathie et l'hémophilie mineure de parvenir à l'identification du gène morbide.

II. LE RÉTRÉCISSEMENT AORTIQUE CALCIFIÉ.

II.A. INTRODUCTION.

Jusqu'au début des années 60, date à laquelle les premières chirurgies de remplacement valvulaire aortique ont été réalisées, les patients atteints d'un rétrécissement aortique qui devenaient symptomatiques avaient une espérance de vie très limitée et qui n'était pas modifiée par les traitements médicaux. Depuis, les techniques chirurgicales se sont affinées et permettent maintenant d'espérer avoir une espérance de vie, chez les patients opérés, identique à celle de la population générale à condition que cette chirurgie ne soit pas réalisée trop tard (Lindblom D. et al. 1990).

Si des progrès de prise en charge chirurgicale des patients atteints de rétrécissement aortique symptomatique ont été immenses, en revanche, les progrès dans la compréhension de cette pathologie sont restés modestes. Pour cette raison, il n'existe encore actuellement aucun traitement permettant de ralentir l'évolution du rétrécissement aortique et le clinicien reste dans la position frustrante de devoir regarder progresser le rétrécissement aortique de ses patients sans moyens d'intervenir. Une approche de génétique inverse permet sans rien connaître de la physiopathologie d'une maladie de pouvoir identifier les gènes qui en sont responsables. Bien que jusqu'à présent il n'y ait aucune description de formes familiales de rétrécissement aortique calcifié dégénératif, nous avons développé un projet visant à identifier par une approche d'épidémiologie génétique des formes familiales de cette maladie afin ensuite de pouvoir identifier les gènes impliqués.

II.A.1. Étiologie du rétrécissement aortique.

Plusieurs étiologies de rétrécissement aortique ont été décrites. Dans les pays développés, la forme la plus fréquente de la maladie chez l'adulte est le rétrécissement aortique calcifié

dégénératif également appelé maladie de Monckeberg (Passik C. S. et al. 1987). Cette dégénération valvulaire peut survenir sur des valves tricuspides ou plus fréquemment sur des valves bicuspidés.

II.A.1.a. Rétrécissement aortique dégénératif sur valve bi ou tricuspide.

Environ 1 % de la population naît avec des valves bicuspidés (Roberts W. C. 1970). A la naissance, les valves s'ouvrent correctement, mais progressivement, il apparaît une dégénération de ces valves qui entraînent une sténose significative chez environ un tiers des patients. La bicuspidie est plus fréquente chez les hommes, ce qui explique la prédominance masculine du rétrécissement aortique. Le rétrécissement aortique sur valves bicuspidés devient généralement symptomatique et doit être opéré entre la 50e et la 60e année (Figure 90) (Campbell M. 1968).

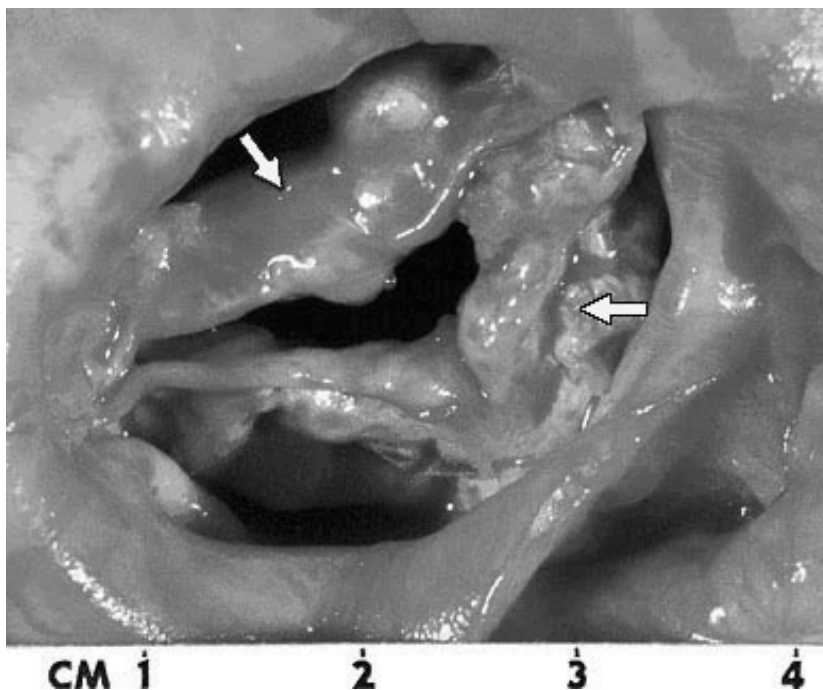


Figure 90 : Valve aortique bicuspide et calcifiée.

Le rétrécissement aortique dégénératif sur valve tricuspide est probablement moins fréquent touchant, environ 1 % de la population (Figure 91). Chez ces patients le rétrécissement aortique survient plus tardivement et nécessite généralement une chirurgie au cours de la

septième ou de la huitième décennie (Campbell M. 1968). Les raisons pour lesquelles des patients ayant antérieurement des valves normales développent un rétrécissement aortique restent actuellement mystérieuses. Sur le plan anatomopathologique, les lésions précoces retrouvées sur ces valves sont caractérisées par un épaissement de la partie endocardique du versant aortique du feuillet valvulaire. Cet épaissement est dû à l'accumulation d'infiltration lipidique et de calcifications. Il y a une prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules riches en lipides qui ressemblent à celles retrouvées au niveau des plaques d'athérosclérose (Otto C. M. et al. 1994a). Une association a été identifiée entre les facteurs de risque classiques de maladie coronarienne et le risque de développement de rétrécissement aortique. Cela suggère que l'épaississement des valves aortiques pourrait être une manifestation de l'athérosclérose (Branch K. R. et al. 2002; Carabello B. A. 1999; Otto C. M. et al. 1999; Otto C. M. et al. 2001). Ces facteurs de risque sont l'hypercholestérolémie, le tabagisme, le sexe masculin et l'âge. Chez les patients atteints d'une forme familiale d'hypercholestérolémie, il a été montré que le temps d'exposition à l'hypercholestérolémie était corrélé avec le développement d'un rétrécissement aortique (Rallidis L. et al. 1998).



Figure 91 : Valve aortique tricuspidie et calcifiée.

Le même type d'anomalies histologiques a été identifié chez les patients atteints de rétrécissement aortique sur valve bicuspidie et il est possible que les mécanismes à l'origine du rétrécissement aortique soient identiques.

II.A.1.b. Rhumatisme articulaire aigu.

Dans les pays développés, le rhumatisme articulaire aigu est devenu une cause mineure de rétrécissement aortique. Ce mécanisme représente actuellement moins de 20 % de l'ensemble des rétrécissements aortiques (Passik C. S. et al. 1987). Lorsque le rhumatisme articulaire aigu est la cause du rétrécissement aortique, la valve mitrale est presque toujours également atteinte. Par conséquent, ce mécanisme ne peut pas être retenu lorsque la valve mitrale est normale même en présence d'un antécédent de rhumatisme articulaire aigu (Roberts W. C. 1970).

À l'inverse du rétrécissement aortique dégénératif, le rétrécissement aortique d'origine rhumatismale devient généralement symptomatique plus tôt, au cours de la troisième ou de la quatrième décennie, et nécessite une chirurgie plus précoce au cours de la vie.

II.A.1.c. Le rétrécissement aortique congénital.

L'obstruction du rétrécissement aortique congénital peut siéger au niveau sous valvulaire, valvulaire ou supra-valvulaire.

Le rétrécissement aortique congénital sous-valvulaire peut-être dû à un anneau membrane ou à un tunnel fibro-musculaire. Chez certains patients ces anomalies sont associées à un rétrécissement de l'aorte ascendante. Il s'agit alors d'une atrésie aortique.

Le rétrécissement aortique congénital valvulaire est généralement dû à une fusion des valvules aortiques que la valve soit tricuspide, bicuspide ou uni cuspidé.

Le rétrécissement aortique congénital supra-valvulaire est dû à un rétrécissement siégeant en aval de la valve aortique. Le syndrome de Williams est représenté par l'association d'un rétrécissement aortique supra-valvulaire avec un faciès « elfin » et une hypercalcémie. Il peut être associé avec un rétrécissement artériel pulmonaire périphérique qui généralement s'améliore avec le temps tandis que le rétrécissement aortique s'aggrave progressivement (Kim Y. M. et al. 1999).

Le rétrécissement aortique congénital diffère sur plusieurs points du rétrécissement aortique de l'adulte. Dans le rétrécissement aortique congénital, on retrouve généralement une importante hypertrophie ventriculaire gauche associée à une fonction ventriculaire gauche supra-normale (Donner R. et al. 1983). Le risque de mort subite est plus élevé que chez l'adulte et ceci

même en l'absence de symptômes (Keane J. F. et al. 1993). En conséquence, dans les formes pédiatriques, il est recommandé de proposer un geste sur la valve en cas de gradient > 50 mm Hg même en l'absence de symptôme.

II.A.2. Présentation clinique du rétrécissement aortique.

II.A.2.a. Histoire naturelle du rétrécissement aortique.

L'histoire naturelle du rétrécissement aortique détermine le mode de prise en charge de la maladie. Les patients qui ont un rétrécissement aortique asymptomatique ont une survie pratiquement normale pour une longue période de temps (Pellikka P. A. et al. 1990; Ross J., Jr. et al. 1968).

Pendant cette période, la valve va développer progressivement une fibrose et des calcifications mais le patient reste asymptomatique. Après l'apparition des premiers symptômes qui peuvent être à type d'angine de poitrine, de syncope ou d'insuffisance cardiaque, la survie devient courte. Chez environ 35 % des patients, le premier symptôme est l'angine de poitrine. En absence de chirurgie de remplacement valvulaire 50 % de ces patients seront décédés à 5 ans (Lombard J. T. et al. 1987). Chez 15 % des patients le premier symptôme est une syncope, en absence de chirurgie 50 % de ces patients seront décédés à 3 ans. Enfin, le premier symptôme est une insuffisance cardiaque dans 50 % des cas et chez ces patients la survie moyenne en absence de chirurgie est de moins de deux ans (Figure 92).

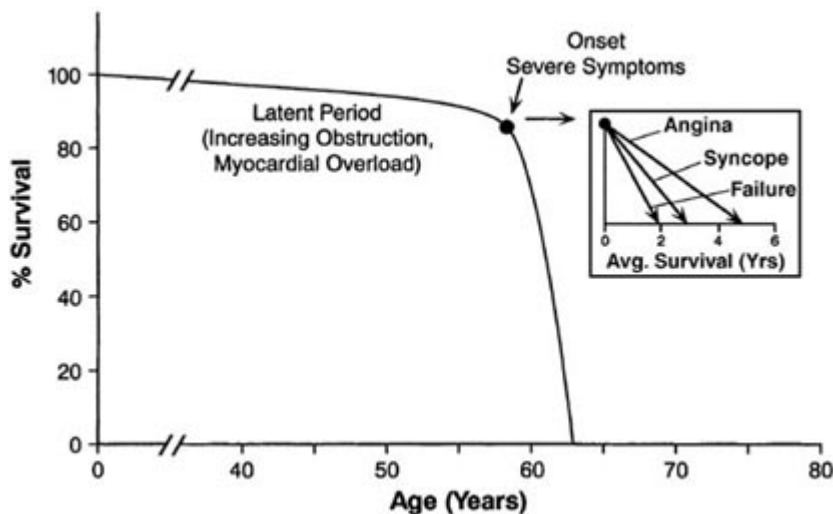


Figure 92 : Histoire naturelle du rétrécissement aortique. From Ross J Jr, Braunwald E.

Aortic stenosis. Circulation 1968;38(Suppl 5):V-61

Le risque de mort subite chez les patients asymptomatiques est faible (< 2 %). Pour cette raison, le risque chirurgical dans de nombreux centres est supérieur et par conséquent il n'y a actuellement pas d'indication au remplacement valvulaire aortique avant la survenue de symptômes (Pellicka P. A. et al. 1990).

La progression du rétrécissement aortique est plus rapide et l'évolution clinique plus mauvaise chez les patients qui ont un rétrécissement aortique modérément ou sévèrement calcifié et chez ceux qui ont une augmentation rapide du gradient transvalvulaire (Otto C. M. et al. 1997). De même, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'insuffisance rénale ou l'augmentation de la calcémie sont associés à une progression plus rapide du rétrécissement aortique (Palta S. et al. 2000).

II.A.3. Physiopathologie du rétrécissement aortique.

Avec l'augmentation progressive de la sténose et du gradient transvalvulaire, il apparaît une augmentation de la pression à l'intérieur du ventricule gauche. Cette augmentation de pression ainsi que l'augmentation du stress pariétal sont à l'origine du développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche. Cette augmentation de pression semble influencer sélectivement l'activité des M.M.P. (matrix metalloprotease) myocardique (Nagatomo Y. et al. 2000).

L'augmentation de la masse musculaire permet aux ventricules de générer une augmentation de pression en maintenant un stress pariétal normal. Par conséquent, on peut considérer que cette hypertrophie compense l'augmentation de pression. Cependant, lorsque l'augmentation de pression s'aggrave avec l'évolution du rétrécissement aortique, l'hypertrophie progresse et devient pathologique avec ses propres complications (ischémie sous-endocardique et risque d'arythmie).

II.A.3.a. Angor.

L'angor apparaît lorsque l'apport en oxygène est dépassé par la demande. Cette situation peut apparaître soit parce que l'apport est insuffisant soit parce que la demande devient trop importante. Dans le rétrécissement aortique les deux facteurs jouent un rôle. Avec le développement d'une hypertrophie ventriculaire gauche concentrique, la réserve coronaire diminue (Marcus M. L. et al. 1982). Cette diminution de la réserve coronaire est due à une compression des fibres musculaires les plus endocardiques liées à l'augmentation de la pression télédiastolique du ventricule gauche ainsi qu'à une augmentation insuffisante des capillaires coronariens par rapport à l'hypertrophie ventriculaire gauche (Dunn R. B. et al. 1983).

L'ischémie apparaît car, d'une part la réserve coronaire est diminuée et par conséquent l'apport ne peut plus être suffisant lorsque la demande augmente et d'autre part, la demande est augmentée car elle est le produit de la fréquence cardiaque de la contraction myocardique et du stress pariétal.

Bien que l'hypertrophie ventriculaire gauche permette initialement de normaliser le stress pariétal, chez de nombreux patients cette hypertrophie devient trop importante, ce qui favorise l'ischémie myocardique (Dunn R. B. and Griggs D. M., Jr. 1983).

II.A.3.b. Syncope.

Les causes des syncopes chez les patients qui ont un rétrécissement aortique restent discutées et sont probablement multiples. Les syncopes surviennent le plus souvent au cours d'un exercice. De manière simple, elles surviennent lors d'une chute de la pression artérielle et du débit de perfusion cérébrale.

Un des mécanismes possibles est la réduction de l'orifice aortique qui ne permet pas le passage d'un débit sanguin suffisant au cours de l'exercice. Comme les résistances périphériques totales diminuent au cours de l'exercice, la diminution du débit cardiaque conjuguée à la diminution des résistances périphériques entraîne une chute de la pression artérielle qui peut être responsable d'une syncope (Richards A. M. et al. 1984; Schwartz L. S. et al. 1969).

L'augmentation de la pression intraventriculaire gauche au cours de l'exercice peut également être la cause d'une réponse vagale avec chute de la pression artérielle pouvant être

responsable de syncopes. Enfin, les syncopes peuvent également être favorisées par des tachycardies supraventriculaires ou ventriculaires qui favorisent l'hypotension artérielle.

II.A.3.c. Insuffisance cardiaque congestive.

Une altération de la fonction systolique et diastolique du ventricule gauche est retrouvée fréquemment dans le rétrécissement aortique. L'hypertrophie ventriculaire gauche concentrique qui se développe au cours de rétrécissement aortique est responsable de l'apparition d'une dysfonction diastolique. L'épaississement du ventricule gauche entraîne une altération de la relaxation et nécessite une augmentation de la pression diastolique pour son remplissage. Initialement, les parois ventriculaires gauches sont épaissies mais la compliance du ventricule gauche reste normal. Progressivement au cours de l'évolution du rétrécissement aortique, des fibres de collagène se déposent dans le mur myocardique et sont responsables d'une altération de la compliance ventriculaire gauche qui altère le remplissage (Hess O. M. et al. 1984; Nakano K. et al. 1989; Tsutsui H. et al. 1993).

Une altération de la contraction ventriculaire gauche est également fréquemment retrouvée. Elle est probablement due à l'ischémie sous-endocardique, à une densification des microtubules et une altération de la fixation du calcium.

II.A.4. Progression du rétrécissement aortique.

L'augmentation du gradient transvalvulaire est très modérée tant que la surface aortique reste supérieure à 1,5 cm². En revanche, en dessous de cette surface toute diminution de la surface aortique s'accompagnera d'une augmentation rapide des gradients.

Habituellement, l'augmentation des gradients est de 7 à 10 mmHg par an ce qui correspond à une diminution de la surface de 0,1 cm² par an. Cependant, ces valeurs peuvent varier de façon importante d'un patient à l'autre (Brener S. J. et al. 1995). De nombreux facteurs peuvent influencer l'évolution du rétrécissement aortique. Leurs rôles respectifs restent actuellement discutés (Malergue M. C. et al. 1997; Palta S. et al. 2000; Peter M. et al. 1993; Roger V. L. et al. 1990).

II.A.5. Hypothèses physiopathologiques.

Plusieurs hypothèses physiopathologiques s'affrontent sur l'origine et le développement du rétrécissement aortique :

Cette pathologie a longtemps été considérée comme un processus passif. La dégénérescence valvulaire serait liée au flux hémodynamique sanguin perturbé et par conséquent au stress mécanique rendant les cellules endothéliales plus sensibles aux dépôts lipidiques et aux infiltrations des monocytes. La calcification serait secondaire à un dépôt de lipides et de minéraux autour de cellules apoptotiques et de débris cellulaires (Lee Y. S. et al. 1998). Cette hypothèse est étayée par la fréquence plus élevée du rétrécissement aortique chez les patients atteints de bicuspidie aortique chez lesquels le flux transvalvulaire est perturbé.

A l'inverse, d'autres considèrent que le rétrécissement aortique est un processus actif lié à une accumulation de macrophages et de lymphocytes T activés suggérant une inflammation chronique (Mazzone A. et al. 2004; Olsson M. et al. 1994; Otto C. M. et al. 1994a). Les lésions ne seraient pas secondaires à l'âge mais à un processus similaire à l'athérosclérose. Cette hypothèse est renforcée par l'augmentation du risque de rétrécissement aortique en présence des facteurs de risque classique de l'athérosclérose (augmentation du LDL cholestérol, tabagisme, âge, hypertension et diabète) (Stewart B. F. et al. 1997). D'autres facteurs comme l'augmentation des taux de calcium et de créatinine sérique interviennent également (Rajamannan N. M. et al. 2003a). Il est suggéré que les statines qui diminuent le taux de cholestérol ralentiraient l'évolution du RAC (Novaro G. M. et al. 2001). Les calcifications seraient causées par l'infiltration des monocytes et des LDL dans les tissus, provoquant un changement de phénotype des fibroblastes en ostéoblastes (Rajamannan N. M. et al. 2003b).

II.A.6. Diagnostic du rétrécissement aortique.

Le plus souvent le diagnostic du rétrécissement aortique est suspecté par l'identification d'un souffle systolique au foyer aortique qui irradie vers les carotides au cours de l'examen du patient.

Le diagnostic sera confirmé par l'échographie cardiaque.

En échographie bidimensionnelle, la valve aortique paraît épaissie et calcifiée avec une diminution de ses mouvements. La distinction entre une valve bicuspide et tricuspide est le plus souvent possible lorsque les calcifications ne sont pas trop importantes. L'hypertrophie ventriculaire gauche et la fonction ventriculaire gauche peuvent également être mesurées.

Le calcul de la surface aortique sera réalisé par l'évaluation du gradient moyen transvalvulaire. L'évaluation de la surface aortique par cette technique est bien corrélée à l'évaluation qui était réalisée antérieurement par cathétérisme.

La formule de Gorlin au cours d'un cathétérisme et l'équation de continuité pendant une échographie cardiaque permet de l'évaluation de la surface aortique. Ces deux méthodes de calcul de la surface aortique dérivent de la formule de Torricelli (Gorlin R. et al. 1951).

$$S=F/V$$

S= Surface de l'orifice ; F= Flux ; V= Vitesse

Par la méthode doppler, la vitesse est mesurée directement en mesurant l'aire sous la courbe au niveau de la chambre de chasse du ventricule gauche et au niveau de la valve aortique. Le diamètre au niveau de la chambre de chasse est mesuré en échographie bidimensionnelle ce qui permet de calculer la surface au niveau de la chambre de chasse. En établissant le rapport entre l'aire sous la courbe du flux au niveau de la valve aortique et de la chambre de chasse, on peut calculer la surface de la valve aortique (Hatle L. 1981; Hegrenaes L. et al. 1985; Skjaerpe T. et al. 1985).

Par cathétérisme cardiaque, le débit cardiaque est mesuré en utilisant la méthode de Fick par thermodilution. Le gradient de pression est mesuré puis converti en vitesse.

$$V=\sqrt{gh}$$

V= vitesse; g= gravité ; h= gradient moyen.

La surface aortique est calculée par la formule de Gorlin

$$\text{Surface aortique} = Q/K\sqrt{h}$$

Q= débit cardiaque ; h= gradient moyen

II.A.7. Prise en charge thérapeutique du rétrécissement aortique.

Actuellement, aucune thérapeutique médicale n'a montré son efficacité dans la prise en charge du rétrécissement aortique. Chez les patients pour lesquels un remplacement valvulaire aortique est contre-indiqué, un traitement par digitaliques ou diurétiques peut permettre une amélioration transitoire des symptômes.

Les valvulotomies percutanées au ballon qui semblaient initialement prometteuses, ne permettent en fait qu'une amélioration très transitoire des symptômes. En effet, la plupart du temps, la valvulotomie permet d'améliorer significativement la surface aortique, cependant la sténose se reforme rapidement (Otto C. M. et al. 1994b).

Les valvulotomies au ballon sont réservées aux patients atteints d'un rétrécissement aortique sévèrement symptomatique pour lesquels la chirurgie est contre-indiquée en raison d'un risque opératoire trop élevé. La mise en place d'un tube valvé de façon percutanée est actuellement à l'étude.

Le remplacement valvulaire aortique est la technique de référence dans la prise en charge rétrécissement aortique. Ce geste est indiqué pour tous les patients qui sont symptomatiques. Le choix portera sur le type de valves implantées. Les valves mécaniques ont l'avantage d'avoir une importante durée de vie mais nécessitent une anticoagulation au long cours. À l'inverse, les bioprothèses ont un risque plus élevé de dégénérescence mais ne nécessitent pas d'anticoagulation. Chez les patients les plus jeunes, la technique de Ross peut être utilisée. Elle consiste à remplacer la valve aortique par la valve pulmonaire, la valve pulmonaire étant remplacée par une homogreffe. Cette méthode chirurgicale est plus complexe mais elle permet d'éviter une anticoagulation au long cours avec un risque de dégénérescence de la valve faible (Jamieson W. R. et al. 1995; Ross D. N. 1995; Yun K. L. et al. 1995).

Globalement, le risque de mortalité opératoire est inférieur à 5 %. Ce risque est plus élevé chez les patients les plus âgés, en présence d'une altération de la fonction ventriculaire gauche, chez les patients qui ont des lésions coronariennes importantes associées ou d'autres

valvulopathies.

La survie actuarielle est d'environ 80 à 85 % à cinq ans.

Le risque à long terme est essentiellement représenté par une dégénérescence de la valve en position aortique et le risque hémorragique lié au traitement anticoagulant. Les complications peuvent être une détérioration structurale de la valve, une altération de l'hémodynamique, une thrombose de valve, une endocardite, des embolies périphériques ou cérébrales à point de départ valvulaire.

Si l'indication du remplacement valvulaire aortique est simple chez les patients qui sont symptomatiques, le choix thérapeutique est plus complexe chez les patients qui ont un rétrécissement aortique peu serré qui sont asymptomatiques mais qui doivent bénéficier d'une chirurgie cardiaque pour une autre raison. Ce problème se pose fréquemment chez les patients qui doivent bénéficier de pontages coronariens. La stratégie thérapeutique est souvent difficile à établir car, actuellement, il est impossible d'identifier les patients pour lesquels le rétrécissement aortique va progresser rapidement et qui donc nécessiteront une chirurgie de remplacement valvulaire dans les mois ou les années qui suivent la réalisation du pontage. Cette question est importante car le risque opératoire de cette chirurgie redox est nettement plus élevé. Actuellement, on considère que les patients qui ont un gradient moyen transvalvulaire supérieur à 40 mmHg doivent bénéficier d'un remplacement valvulaire aortique alors que pour ceux dont le gradient est inférieur à 10 mmHg, la valve aortique doit être laissée en place (Tam J. W. et al. 1998).

II.A.8. Formes familiales de rétrécissement aortique.

Très peu de cas de formes familiales de rétrécissement aortique sont décrits.

Il s'agit essentiellement de bicuspidie aortique. Une étude datant de 1978 montrait que la recherche systématique de bicuspidie chez les apparentés proches de patients opérés d'un rétrécissement aortique sur bicuspidie permettait de retrouver une bicuspidie chez 14.6% des apparentés (Emanuel R. et al. 1978). Glick et col. avait identifié 17 patients atteints de rétrécissement aortique par bicuspidie appartenant à 6 familles différentes (Glick B. N. et al. 1994). Dans trois de ces familles, la maladie pouvait être retrouvée chez un des parents et au

moins un enfant. Dans trois autres familles, au moins deux enfants de la même fratrie avaient une bicuspidie. Clementi et al ont reporté une famille dans laquelle 4 membres sur deux générations avaient une bicuspidie (deux frères, une sœur et son fils) (Clementi M. et al. 1996).

Les descriptions de formes familiales de rétrécissement aortique sur valves tricuspides sont également très rares. Tentolouris et col. A décrit une famille dans laquelle deux sœurs âgées de 53 et de 51 ans avaient une maladie aortique calcifiée associée à des calcifications de l'aorte et des anomalies immunologiques associant une augmentation du taux des gamma globulines ainsi qu'une gamma pathie à chaîne lambda. Une des filles de ces femmes avait bénéficié à l'âge de 38 ans d'un remplacement valvulaire aortique pour rétrécissement aortique calcifié serré (Tentolouris C. et al. 1993). D'autres cas possiblement familiaux de rétrécissement aortique associé à des calcifications de l'aorte ont été décrits (Goldbaum T. S. et al. 1986; McLoughlin M. J. et al. 1974; Rose A. G. et al. 1976). Sur le plan anatomopathologique, les anomalies sont caractérisées par une nécrose extensive de la média associée à des calcifications sans qu'un facteur inflammatoire ne soit retrouvé (Theman T. E. et al. 1979).

Une forme particulière de calcification valvulaire touchant la valve mitrale et la valve aortique a été décrit sur une famille allemande sur cinq générations. Ces anomalies cardiaques étaient associées avec une perte des cils et des sourcils ainsi qu'avec des cheveux gris apparaissant dès l'adolescence (Weisman H. F. et al. 1989).

Récemment, il a été démontré que des polymorphismes dans le récepteur la vitamine D, de l'Apo E et de l'interleukine 10 pouvaient être associés avec un risque plus élevé de survenue de rétrécissement aortique (Novaro G. M. et al. 2003; Ortlepp J. R. et al. 2001; Ortlepp J. R. et al. 2004).

II.B. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

II.B.1. Approche d'épidémiologie génétique.

Nous ne disposions pas initialement de familles atteintes de rétrécissement aortique. Afin d'identifier de telles familles, nous avons développé une approche d'épidémiologie génétique. Cette approche est basée sur l'hypothèse que comme la population de notre région est très sédentaire si un ancêtre était atteint d'une forme génétique de la maladie il a dû la transmettre à

ses descendants qui sont restés dans les mêmes communes. Par conséquent, les communes dans lesquelles des formes familiales de la maladie sont présentes doivent avoir une fréquence anormalement élevée de la maladie.

Nous avons utilisé notre fichier hospitalier des patients opérés d'un remplacement valvulaire aortique au CHU de Nantes. Ce fichier comprenait 2527 patients qui avaient été opérés entre 1992 et 2002. Le lieu de naissance de tous ces patients a été déterminé grâce au numéro de sécurité sociale qui contient le code INSEE permettant de localiser la commune de naissance. La fréquence des patients opérés a été calculée dans chaque commune en rapportant le nombre de patients opérés à la population de la commune estimée lors des recensements de 1926, 1931 et 1936. Ces années de recensement correspondent aux années de naissance des patients de l'étude.

Afin d'éviter de surestimer la fréquence de la maladie dans des communes de très petites tailles, seules les communes dans lesquelles au moins deux cas de patients opérés étaient survenus ont été retenues.

L'hétérogénéité de la répartition a été évaluée par un Chi-squared test. La carte de la répartition géographique des cas de rétrécissements aortiques opérés a été réalisée grâce au logiciel Mapinfo software (MapInfo corporation troyTM, New York).

Dans une première approche généalogique, nous avons étudié les communes dans lesquelles la fréquence du rétrécissement aortique opéré était le plus élevé et dans lesquelles plusieurs patients avaient le même nom de famille. Si trois cas de rétrécissement aortique étaient retrouvés dans la même famille une enquête familiale extensive était réalisée et nous réalisons une recherche de généalogie ascendante pour tous les patients opérés issus de la commune afin de tenter d'identifier un ancêtre commun au plus grand nombre de patients.

II.B.2. Évaluation clinique du rétrécissement aortique.

L'étude était réalisée en accord avec les recommandations françaises pour la recherche génétique est approuvée par le comité d'éthique du CHU de Nantes.

Un consentement écrit a été obtenu pour tous les patients qui participaient à l'étude et une information orale et écrite leur a été remise.

Les investigations cliniques comportaient un interrogatoire des patients permettant de déterminer leurs facteurs de risque cardio-vasculaire ainsi que leurs principaux antécédents. Ils

bénéficiaient d'un examen clinique complet avec mesure de la pression artérielle. Un électrocardiogramme était réalisé (Mac Vu Marquette Inc, Milwaukee, Wisconsin) de même qu'une échocardiographie (Hewlett-Packard Sonos 5500TM, Hewlett-Packard Inc., Andover, Mass.) avec une sonde de 3,5MHz.

Les mesures étaient réalisées selon les critères de la société américaine d'échocardiographie (Schiller N. B. et al. 1989). Tous les examens étaient enregistrés afin de pouvoir être analysés a posteriori.

La surface aortique était calculée par l'équation de continuité. Le gradient moyen transvalvulaire était obtenu grâce à un enregistrement du flux trans-aortique en doppler continu tandis que le flux dans la chambre de chasse était mesuré en doppler pulsé (Skjaerpe T. et al. 1985).

Les patients étaient considérés comme atteints d'un rétrécissement aortique serré s'ils avaient bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique pour rétrécissement aortique ou si l'échographie cardiaque montrait un rétrécissement aortique calcifié avec une surface valvulaire inférieure à 1,2 cm². Les patients qui avaient été opérés avaient bénéficié d'un examen anatomopathologique de la valve qui permettait de déterminer que la valve était bien tricuspide.

Les patients qui avaient un rétrécissement aortique dans la surface valvulaire étaient supérieurs à 1,2 cm², les patients qui avaient une sclérose valvulaire aortique sans gradient significatif ou les patients qui avaient une insuffisance aortique significative mais sans sténose étaient considérés comme indéterminés lors des analyses familiales. Les patients qui avaient des anomalies valvulaires en faveur d'un rhumatisme articulaire aigu (calcifications de la valve mitrale) ou qui avait une bicuspidie aortique était également considérés comme indéterminés.

II.B.3. Screening de la population issue de la commune de la famille A.

Afin d'identifier de nouvelles branches familiales reliées à la famille A., nous avons recherché à partir de notre base de données des patients opérés d'un rétrécissement aortique, les patients atteints d'un rétrécissement aortique et originaires de la commune dont provenait la famille A. Nous avons également examiné les individus âgés de plus de 60 ans et originaires de la

commune de la famille A.. Lors de la réalisation du screening de la population de la commune de la famille A. les habitants étaient interrogés sur leurs principaux antécédents ainsi que leurs facteurs de risque puis ils étaient auscultés à l'aide d'un stéthoscope électronique permettant l'enregistrement des bruits du cœur. Ces enregistrements étaient ensuite réécoutés par deux cardiologues expérimentés. Une échocardiographie était proposée à tous les patients chez lesquels un souffle était détecté.

II.C. RÉSULTATS.

II.C.1. Evaluation de la répartition géographique des formes chirurgicales de rétrécissement aortique dans l'ouest de la France.

À partir de notre le fichier hospitalier des patients opérés d'un remplacement valvulaire aortique, nous avons pu, en utilisant le numéro de sécurité sociale identifier la commune de naissance pour tous les individus. La carte représentant la répartition géographique des patients opérés montre qu'il existe des foyers de haute fréquence du rétrécissement aortique.

L'incidence moyenne de chirurgie de remplacement valvulaire aortique pour rétrécissement aortique entre 1992 et 2002 est de 1,13/1000 habitants. Dans les communes où la fréquence est la plus élevée, l'incidence peut atteindre 9,38/1000 habitants. À l'inverse, dans les villes les plus importantes, la fréquence est de 0,93/1000 habitants.

Le test du Chi-squared montre une répartition observée significativement différente de la répartition théorique des patients opérés de rétrécissement aortique. Cette carte montre une répartition géographique non aléatoire de la maladie dans la région Ouest. Deux zones de haute fréquence sont identifiées. L'une entre Vannes et Redon et autour de Chateaubriand, l'autre comprise entre le sud de Nantes et la Roche sur Yon et entre la côte atlantique et Cholet. Cette deuxième zone correspond à une zone géographique appelée « Vendée choletaise ».

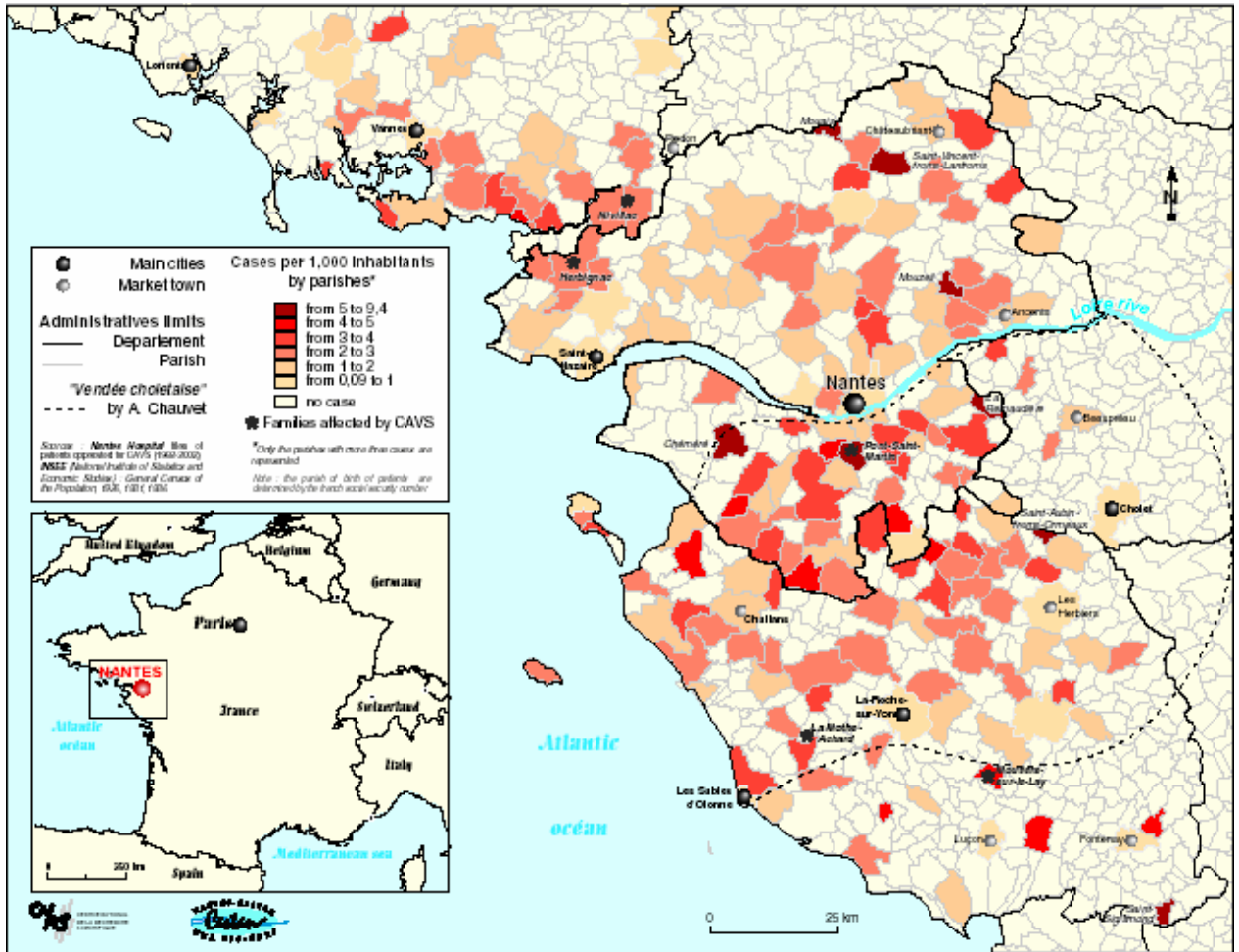


Figure 93 : Carte de la répartition des patients opérés d'un remplacement valvulaire aortique dans l'ouest de la France. La fréquence de la maladie a été calculée pour chaque commune en comparant le nombre de patients opérés nés dans la commune à la population vivant dans la commune. La population de la commune a été estimée par la moyenne des recensements réalisés en 1926, 1931 et 1936. Cette carte montre une importante hétérogénéité spatiale de la répartition de la maladie. Deux zones de haute fréquence sont identifiées. L'une entre Vannes et Redon et autour de Chateaubriant, l'autre comprise entre le sud de Nantes et la Roche sur Yon et entre la côte atlantique et Cholet. Cette deuxième zone correspond à une zone géographique appelée « Vendée choletaise ». Les étoiles représentent les communes dans lesquelles une forme familiale de la maladie a été identifiée.

II.C.2. Mise en évidence de formes familiales de rétrécissement aortique.

Afin d'évaluer si la fréquence élevée de maladie dans certaines communes pouvait être liée à une forme familiale de la maladie, nous avons recherché la présence de noms de famille identiques dans ces communes. Dans les communes où ce type d'homonymie était retrouvé, nous avons interrogé les patients afin de tenter d'identifier d'autres cas de rétrécissement aortique dans la famille et si tel était le cas nous avons réalisé des enquêtes familiales pour dépister des formes non diagnostiquées de la maladie.

Cette approche nous a permis identifier cinq familles différentes.

II.C.2.a. Famille A.

La famille A est une grande famille constituée de 135 membres parmi lesquels 83 étaient encore vivants au moment de l'étude. Treize patients étaient atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique (âge moyen 81 ± 7 ans). Parmi les patients atteints, 10 étaient toujours vivant au moment de l'étude. Huit avaient bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique pour rétrécissement aortique symptomatique. Dans deux cas, ce geste avait été associé à des pontages coronariens (patients II-3, II-14, II-28, II-39, II-41, II-43, II-44 et III-2). L'âge moyen pour le remplacement valvulaire aortique était de 73 ± 8 ans). Cinq autres patients avaient un rétrécissement aortique sévère dont la surface aortique était de $0,8 \pm 0,2$ cm² (patients II-7, II-12, II-32, II-45, III-30). Trois patients âgés de plus de 80 ans étaient clairement non-atteints (patients II-5, II-42, II-46). Le statut clinique des patients de la génération I n'a pas pu être déterminé.

Vingt autres membres de la famille avaient des anomalies sur la valve aortique qui n'étaient pas suffisantes pour permettre de les considérer comme atteints. Ces individus étaient plus jeunes que les patients qui avaient une forme sévère de rétrécissement aortique (58 ± 10 ans contre 81 ± 7 ans ; $p < 0.001$). La plupart de ces patients avec une atteinte modérée de la valve aortique étaient les descendants de patients atteints d'une forme sévère de la maladie. Les anomalies valvulaires retrouvées chez ces patients étaient une insuffisance aortique dans trois cas, une sclérose aortique avec une sténose modérée dans 15 cas et une insuffisance aortique associée à une sténose modérée de la valve dans deux cas (Figure 94).

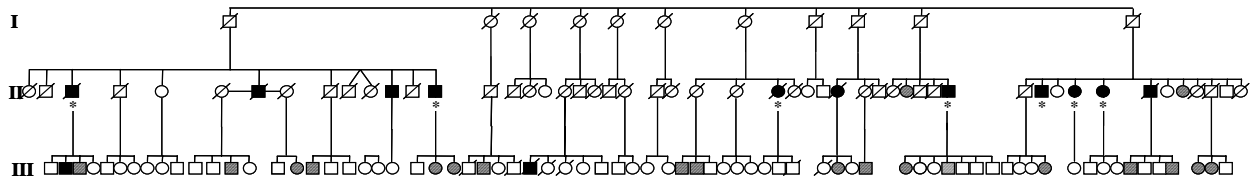


Figure 94 : Arbre généalogique de la famille A. Les patients en noirs sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique alors que les patients en hachuré sont atteints d'une anomalie mineure de la valve aortique. Les patients en blanc sont sains. Les cercles représentent les femmes, les carrés représentent les hommes. Les patients marqués avec une étoile ont bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique.

II.C.2.b. Famille B.

La famille B., est composée de 40 membres. Parmi eux 6 étaient atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique (patient II-13, III-4, III-8, III-15, III-16 et III-17). Les patients III-16 et III-17 ont nécessité un remplacement valvulaire aortique. La surface aortique moyenne des patients atteints de cette famille était de $0,7 \pm 0,1 \text{ cm}^2$. Le patient III-13 avait également une insuffisance mitrale modérée. Les patients III-10 et II-11 ont été considérés comme indéterminés car ils étaient atteints d'une forme non-sévère de rétrécissement aortique (surface aortique de $1,5 \text{ cm}^2$ et $1,4 \text{ cm}^2$ respectivement). Neuf autres membres de la famille n'avaient pas d'anomalie de la valve aortique (Figure 95).

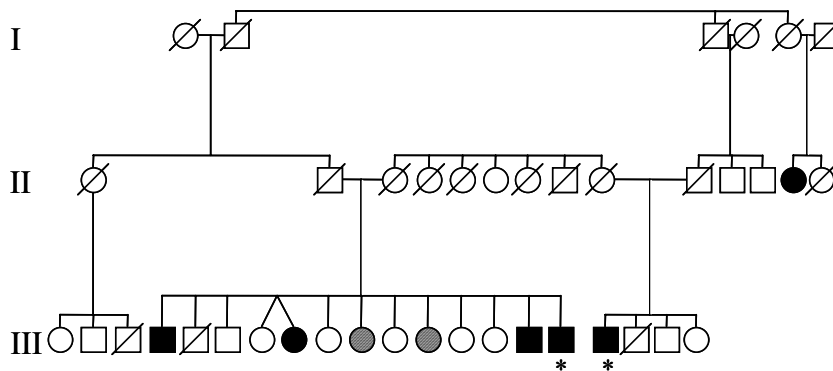


Figure 95 : Arbre généalogique de la famille B. Les patients en noir sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique alors que les patients en hachuré sont atteints d'une anomalie mineure de la valve aortique. Les patients en blanc sont sains. Les cercles représentent les femmes, les carrés représentent les hommes. Les patients marqués avec une étoile ont bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique.

II.C.2.c. Famille C.

La famille C. est composée de 13 membres. Parmi eux, 3 sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique (patients II-2, II-4 et II-6), deux de ces patients étaient toujours vivants au moment de l'étude. Tous ont bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique pour une forme sévère de rétrécissement aortique. L'âge moyen du remplacement valvulaire dans cette famille était de 71 ± 4 . Le patient II-11 a été considéré comme indéterminé en raison d'un rétrécissement aortique non-sévère. Les six autres membres de la famille n'avaient pas d'anomalie de la valve aortique (Figure 96).

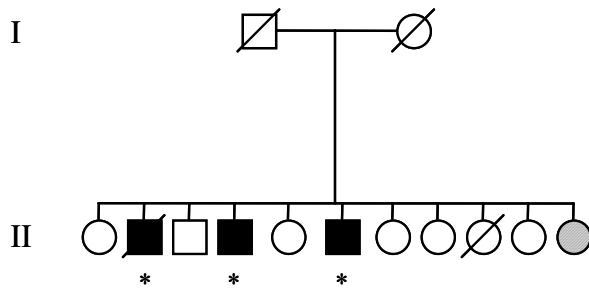


Figure 96 : *Arbre généalogique de la famille C. Les patients en noir sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique alors que les patients en hachuré sont atteints d'une anomalie mineure de la valve aortique. Les patients en blanc sont sains. Les cercles représentent les femmes, les carrés représentent les hommes. Les patients marqués avec une étoile ont bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique.*

II.C.2.d. Famille D.

La famille D, est composée de 20 membres. Parmi eux quatre sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique (patient II-2, II-4, II-11 et II-13). Deux de ces patients étaient toujours vivants au moment de l'étude. Les patients II-2, II-4, II-11 avaient été opérés d'un remplacement valvulaire aortique pour rétrécissement aortique serré à 72 ± 1 ans. Les six autres membres de la famille n'avaient pas d'anomalie de la valve aortique (Figure 97).

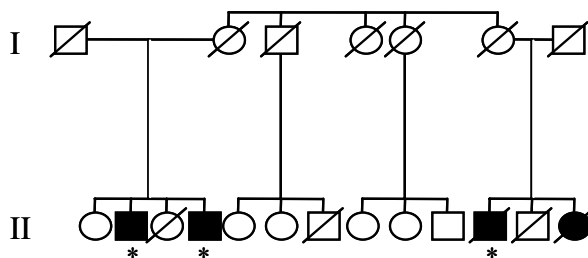


Figure 97 : *Arbre généalogique de la famille D. Les patients en noir sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique alors que les patients en hachuré sont atteints d'une anomalie mineure de la valve aortique. Les patients en blanc sont sains. Les cercles représentent les femmes, les carrés représentent les hommes. Les patients marqués avec une*

étoile ont bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique.

II.C.2.e. Famille E.

La famille E, est composé de 12 membres. Parmi eux trois sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique (patient II-1, II-3 et II-4), deux patients étaient toujours vivants au moment de l'étude. Ils avaient tous bénéficiés d'un remplacement valvulaire aortique pour rétrécissement aortique serré à un âge moyen de 68 ± 4 . Le patient II-5 a été considéré comme indéterminé en raison d'un rétrécissement aortique non serré. Les quatre autres membres de la famille ont été considérés comme non-atteints (Figure 98).

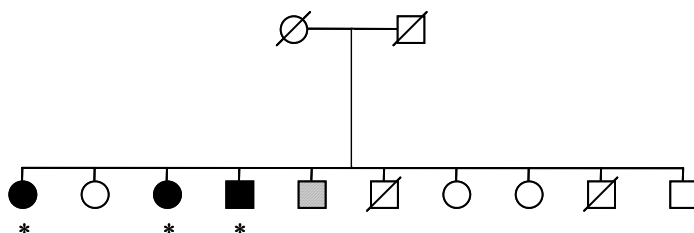


Figure 98 : Arbre généalogique de la famille E. Les patients en noir sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique alors que les patients en hachuré sont atteints d'une anomalie mineure de la valve aortique. Les patients en blanc sont sains. Les cercles représentent les femmes, les carrés représentent les hommes. Les patients marqués avec une étoile ont bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique.

Dans toutes ces familles, les examens sanguins n'ont pas montré de formes familiales d'insuffisance rénale ou d'hypercholestérolémie.

II.C.3. Analyse génétique de la famille A.

En considérant les patients ayant une anomalie mineure de la valve aortique mais jeunes comme probablement atteints de la maladie le lod score théorique dans cette famille était de 5.02 avec une pénétrance de 90%. En ne considérant que les individus ayant l'atteinte la plus sévère (représentés en noir sur la Figure 94), le lod score théorique de la famille est de 2.67. Cela nous a

amené à réaliser une analyse de liaison sur le génome entier. En considérant l'ensemble des patients sévèrement et modérément atteints le génotypage de 383 marqueurs fluorescents espacés tous les 10 cM n'a pas montré de marqueur significativement lié à la pathologie.

En ne considérant que les individus ayant l'atteinte la plus sévère, 86 marqueurs, soit 22 % du génome, ne pouvait être exclus. La puissance statistique de cette famille n'était plus suffisante en ne gardant que les individus les plus sévèrement atteints.

II.C.4. Approche généalogique du rétrécissement aortique.

Afin d'augmenter la taille la famille A., nous avons recherché dans le fichier hospitalier du CHU de Nantes, les patients opérés de rétrécissement aortique et originaires de la commune de la famille A. Nous avons ainsi pu identifier 15 nouveaux patients. Nous avons également réalisé une recherche systématique du rétrécissement aortique dans la population âgée de plus de 60 ans et originaire de la commune de la famille A. Lors de ce screening, nous avons examiné 199 personnes. Nous avons ainsi pu détecter 53 patients qui avaient une auscultation cardiaque anormale. Une échocardiographie a été proposée à tous ces patients et 45 l'ont accepté. Cette échographie a montré la présence d'un rétrécissement aortique serré chez 20 patients. Une forme non sévère la maladie a été retrouvée chez 11 autres patients. Enfin, nous avons identifié une bicuspidie aortique chez 2 patients.

Nous avons émis l'hypothèse que tous les patients issus de la commune de la famille A. pouvaient être reliés au même ancêtre commun qui leurs auraient transmis la maladie. Nous avons donc réalisé la généalogie ascendante de l'ensemble de ces patients sur plus de 400 ans. Nous avons ainsi pu identifier un ancêtre commun à tous ces patients qui était né en 1650 soit 13 générations plus tôt (Figure 99).

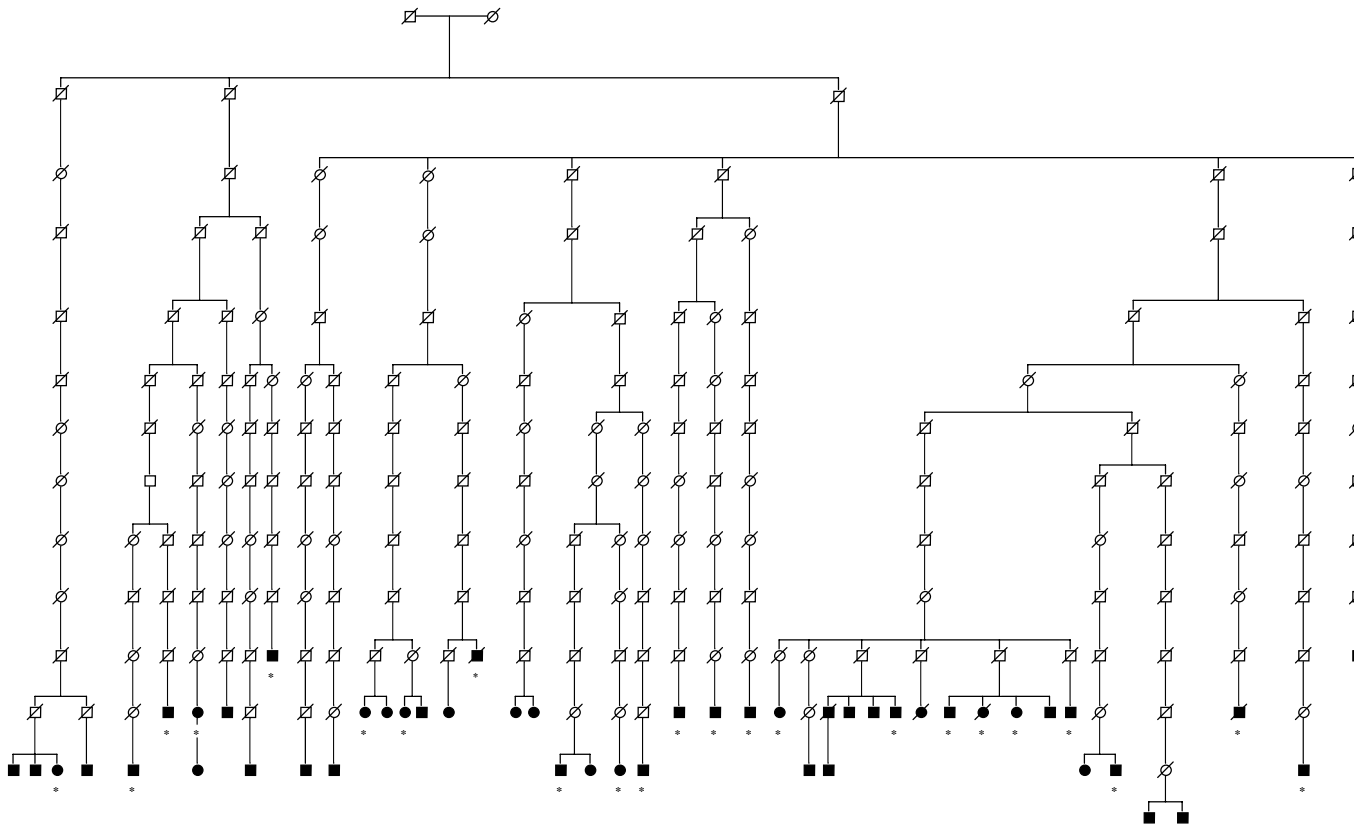


Figure 99 : Arbre généalogique simplifié montrant 48 patients atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique. Les patients atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique (en noir) qui étaient initialement considérés comme non reliés ont pu être rattachés à un ancêtre commun nés en 1650 soit 13 générations plus tôt. Les patients non atteints ne sont pas représentés sur l'arbre généalogique. Les cercles représentent les femmes, les carrés représentent les hommes. Les étoiles indiquent que les patients qui ont été opérés d'un remplacement valvulaire aortique (23 patients).

Afin de s'assurer que le rétrécissement aortique n'était pas lié à une forme familiale d'hypercholestérolémie ou d'insuffisance rénale dans cette famille, nous avons comparé le taux de cholestérol et de créatinine chez les patients atteints de cette famille et chez 20 membres de la famille âgée de plus de 65 ans, non-atteints de rétrécissement aortique et appartenant aux mêmes fratries.

Le taux moyen de cholestérol était de $5,7 \pm 1,2$ mm/l chez les patients atteints et de $5,43 \pm 1,3$ mm/l chez les non-atteints (ns). Quinze patients étaient traités par des hypocholestérolémiants chez les patients atteints tandis que neuf l'étaient chez les patients non-atteints.

Le taux de créatinine était significativement plus élevé chez les patients atteints $97,4 \pm 26$ mm/l contre $77,8 \pm 18$ mm/l ($p=0.006$).

Parmi les 25 patients qui ont bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique 5 ont bénéficié de pontages coronariens dans le même temps.

L'analyse du pedigree de cette famille apporte plusieurs éléments en faveur d'un trait génétique majeure responsable du rétrécissement aortique.

Une transmission liée à l'X peut être exclue en raison de la transmission dans 21 cas de la maladie d'un père à son fils même si nous n'avons pu déterminer le statut phénotypique du père et du fils que dans un seul cas (transmission du patient XII-25 au patient XIII-15).

Un mode de transmission récessif peut également être éliminé car dans deux cas, nous avons pu examiner les deux parents d'un enfant atteint et seul un des deux parents était atteint de la maladie (transmission du patient XII-5 au patient XIII-6 et transmission du patient XII-25 au patient XIII-15).

De plus, l'analyse du pedigree montre que parmi les 131 membres de fratries dans lesquels au moins un individu est atteint de rétrécissement aortique 48 individus sont atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique, 7 ont un rétrécissement aortique non-sévère, 34 n'ont pas d'anomalie de la valve aortique et enfin nous n'avons pas pu obtenir d'information pour 42 individus.

Dans le noyau initial de la famille A, l'analyse phénotypique de la génération III a permis d'identifier 25 descendants d'individus atteints et âgés de plus de 50 ans. Parmi eux 11 avaient des anomalies mineures de la valve aortique qui peuvent être probablement les premiers signes d'un rétrécissement aortique en voie de constitution chez ces patients encore trop jeunes pour avoir une forme complète de la maladie.

Finalement, même si l'identification du mode de transmission du rétrécissement aortique dans cette famille est compliquée par l'apparition tardive de la maladie, il semble que le rétrécissement aortique atteint environ la moitié des descendants d'individus atteints ce qui suggère fortement une transmission autosomale dominante.

II.C.5. Analyse génétique de la famille A étendue.

Le lod score théorique dans cette famille a pu être calculé à 4,874 avec une pénétrance de 90% en prenant en compte les 32 patients atteints de cette famille et 14 patients sains. En effet, afin de diminuer le risque de phénotypie, seuls les individus atteints d'une forme sévère de rétrécissement aortique et dont un apparenté de premier degré avait une anomalie de la valve aortique ont été retenus pour l'analyse génétique.

Parmi les 86 marqueurs initialement identifiés sur la famille A, les 46 marqueurs fluorescents les plus cohérents sur cette famille tant au niveau des haplotypes que du test statistique des lod scores, ont été testés par génotypage sur la famille A étendue.

Parmi ces 46 marqueurs, 17 marqueurs fluorescents restaient cohérents en incluant les nouveaux individus de la famille A étendue. Ces 17 régions chromosomiques ont été testées par des marqueurs adjacents, les distances étant accessibles sur la carte génétique du Généthon, les haplotypes construits, et les lod scores calculés.

Le génotypage de ces marqueurs non fluorescents nous a mené à exclure ces 17 locus potentiels.

II.D. DISCUSSION.

Ce travail a permis de montrer que, par une approche épidémiologie génétique, il était possible d'identifier de grandes familles atteintes de pathologie dégénérative. Jusqu'à ce jour, probablement en raison de l'apparition tardive de la maladie, il n'y avait aucune description de formes familiales de rétrécissement aortique dégénératif sur valve tricuspide.

L'identification de cinq familles différentes et en particulier d'une très grande famille montre qu'il existe des formes héréditaires de cette pathologie.

L'approche d'épidémiologie génétique que nous avons utilisé pour identifier les différentes familles décrites dans ce travail est soumise à des biais. En effet, seules les formes les plus sévères de la maladie qui ont conduit à un remplacement valvulaire sont identifiées et certains patients peuvent avoir été opérés dans d'autres centres. Cependant, le but de ce travail n'est pas

de constituer une carte exhaustive de la représentation du rétrécissement aortique dans notre région mais d'identifier les zones de fréquences les plus élevées.

Cette approche a été facilitée dans notre région par le fait que le CHU de Nantes soit le centre unique de chirurgie cardiaque et par le type de population qui compose la région. En effet, sur la carte de répartition du rétrécissement aortique dans notre région, la zone de plus haute concentration de la maladie est comprise entre le sud de Nantes et la Roche-sur-Yon d'une part et entre la côte atlantique et Cholet d'autre part. Ces limites correspondent aux frontières d'un isolat sociale et culturelle ancien appelé « vendée Cholettaise ». À la fin du XVIIIe siècle, cette région rurale s'était insurgée contre la révolution française, ce qui avait été à l'origine des guerres de Vendée. Cette société très catholique et conservatrice était opposée aux principales villes et particulièrement à Nantes. Cela a été à l'origine du développement d'une industrie rurale au cours du XXe siècle. Pour cette raison, il n'y a pas eu de migration de population du fait de la révolution industrielle, comme ont pu le connaître d'autres régions. De plus, dans cette région la densité de population est forte pour une région rurale (60 habitants/Km²) et le taux de fécondité est l'un des plus élevé en France ce qui a pu favoriser le développement de la maladie.

L'analyse de la répartition de la fréquence de la maladie dans la région montre que les principales villes ont un taux faible de la maladie. Cela est probablement dû au fait que dans ces villes les migrations de population sont plus importantes. Les zones de haute fréquence sont des zones rurales et agricoles dans lesquels les populations migrent très peu. Cependant, on peut noter que la maladie touche l'ensemble de la Vendée chollettaise. Cela est probablement lié à des migrations de population au sein de cette région. En effet, avant le milieu du XXe siècle, les paysans n'étaient pas propriétaires de leurs terres mais ils étaient métayers. En conséquence, les enfants étaient souvent amenés à rechercher du travail dans les villages voisins. Cela a favorisé la diffusion de la maladie au sein de l'isolat du fait de migrations de proximité.

Une approche de génétique familiale pour une pathologie telle que le rétrécissement aortique calcifié peut surprendre et pose certaines difficultés. Tout d'abord, il n'y avait jusqu'à présent aucune description de forme familiale pour cette pathologie et ce travail en est la première description. Sur le plan méthodologique, l'approche génétique est particulièrement complexe en raison de la difficulté d'identifier suffisamment de patients vivants en âge d'être

diagnostiqués. Une approche de génétique inverse basée sur l'existence d'un gène unique pouvant expliquer une forme très commune de pathologie valvulaire cardiaque dégénérative est par conséquent un réel défi.

Notre approche méthodologique est confortée par des approches similaires couronnées de succès, réalisées sur des populations isolées à l'aide des pedigrees semblables à la famille A étendue. Ainsi, la microcéphalie congénitale, la maladie de Parkinson à apparition précoce ou le diabète de type II ont permis d'identifier un gène ou un locus pour ces pathologies (Aulchenko Y. S. et al. 2003a; Aulchenko Y. S. et al. 2003b; Rosenberg M. J. et al. 2002; Sveinbjornsdottir S. et al. 2000). Par conséquent, la famille A étendue devrait nous permettre d'identifier un locus puis un gène responsable de la maladie au sein de notre grande famille.

La difficulté majeure de ce projet réside dans l'apparition tardive de la pathologie. Ainsi, tous les patients atteints pris en compte pour l'analyse de liaison génétique ont au moins 65 ans. La première tentative d'identification d'un locus pour le rétrécissement aortique (sur la famille A), en incluant sept individus très certainement atteints mais ne remplissant pas l'ensemble des critères cliniques communément admis pour le diagnostic, s'est avérée être un échec. La révision des phénotypes a permis d'être plus stringente mais a entraîné une diminution importante de l'informativité génétique de la famille.

La seconde difficulté est liée à la fréquence de la maladie dans la population générale (2 % des individus âgés de plus de 65 ans) engendrant potentiellement l'intégration de phénotopies au sein même de notre famille génétiquement prédisposée au rétrécissement aortique (Stewart B. F. et al. 1997). Ces phénotopies sont actuellement impossibles à détecter sur le plan clinique et résultent probablement d'une combinaison de facteurs de risques, fortement modulés par l'environnement.

En revanche, il ne semble pas exister de facteur environnemental fort capable à lui seul d'expliquer la survenue trop fréquente de rétrécissement aortique dans commune de la famille A. puisque certains individus de cette famille atteints d'une forme typique de la maladie ont quitté la commune depuis des décennies.

L'analyse génétique de la famille A. étendue n'a pas permis, à ce jour, l'identification du gène malgré l'application de critères cliniques stringents. Cela doit nous amener à reconsidérer

nos données phénotypiques et l'approche génétique utilisée. L'hypothèse d'une atteinte autosomique dominante semble forte mais il est probable que la fréquence des phénotopies doit être élevée.

Plusieurs voies restent possibles pour tenter d'identifier le gène responsable de la maladie.

L'analyse génétique à l'échelle du génome entier n'a été réalisée que sur 46 marqueurs sélectionnés sur la base de leur co-ségrégation dans la famille A initiale. Si par malchance, un des individus considérés comme atteints initialement se révèle être une phénotopie, le gène morbide dans cette famille peut être situé dans les 78 % du génome exclu après l'analyse de liaison génétique sur la famille initiale.

Afin de rechercher de telles phénotopies, nous avons réévalué les phénotypes des patients de cette famille. Cette étude montre que l'individu XII.28 pourrait être considéré douteux (surface aortique 1.2 cm^2 , gradient moyen de pression 15 mm Hg) alors qu'il est âgé de 85 ans. Ainsi de nombreuses régions du génome exclues sur la base d'une recombinaison génétique chez cet individu pourraient être reconsidérées.

Nous allons réexaminer les génotypes en excluant cet individu, pour reconsidérer des marqueurs éliminés après l'analyse de liaison sur le génome entier.

En parallèle, une analyse statistique à l'échelle du génome entier va être reprise en collaboration avec l'équipe du Centre National de Génotypage, en appliquant des modèles d'analyse de type non paramétrique éventuellement plus adaptés à notre pedigree. L'algorithme le plus adapté à notre problématique est en cours d'évaluation. Il pourrait s'agir d'un logiciel basé sur l'analyse de ségrégation dans des paires de germains. En effet dans notre famille, à l'exception de la famille A initiale, tous les autres apparentés sont reliés entre eux à plus de quatre générations en moyenne, et pourraient de ce fait être considérés comme des individus non apparentés (dans le cadre du logiciel d'analyse de paires de germains).

Une analyse de déséquilibre de liaison sur l'ensemble du génome pourrait également être réalisée car sur le même type de population elle a permis la mise en évidence d'un locus dans le diabète de type II (Aulchenko Y. S. et al. 2003a; Aulchenko Y. S. et al. 2003b). Pour réaliser cette analyse, nous devons utiliser des marqueurs plus proches espacés tous les 3 cM.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les maladies cardiaques dégénératives sont des pathologies fréquentes dans la population générale. Elles entraînent par conséquent un coût élevé en termes de santé publique, ce coût allant croissant avec le vieillissement de la population. Bien que progressivement des stratégies thérapeutiques efficaces aient été élaborées, que ce soit avec la mise en place d'un pacemaker pour les troubles de la conduction dégénératifs ou la prise en charge chirurgicale des valvulopathies myxoïdes ou des rétrécissements aortiques, la connaissance de la physiopathologie de ces maladies reste limitée et il n'existe pas de traitement médical efficace pour éviter leurs évolutions.

Le but de ce travail a été, par une approche de génétique, de tenter d'identifier les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces maladies. En effet, même si les formes génétiques ne représentent qu'une minorité des patients atteints par ces différentes pathologies, les formes familiales de ces maladies peuvent donner l'opportunité d'identifier les gènes impliqués dans ces pathologies et donc de pouvoir comprendre les mécanismes à l'origine de la maladie.

Notre travail sur la génétique des maladies dégénératives cardiaques a permis l'identification du premier gène de troubles de la conduction dégénératifs et du troisième locus ainsi que du premier gène de valvulopathie myxoïde. Ces deux pathologies étaient pourtant considérées jusqu'à une époque récente comme des maladies dégénératives pour lesquelles la génétique ne jouait qu'un rôle très modeste.

Ce travail doit être réalisé maintenant car actuellement, du moins en France, la mobilité géographique des populations est encore relativement faible et il est donc encore possible d'identifier de grandes familles sur de nombreuses générations. L'approche d'épidémiologie génétique que nous avons utilisée pour ces différentes pathologies repose entièrement sur la faible mobilité de la population étudiée. Cette approche nous semble tout à fait prometteuse puisqu'elle nous a déjà permis d'identifier une grande famille atteinte de rétrécissement aortique ainsi qu'une autre famille atteinte de troubles de la conduction dégénératifs. De plus, elle peut être couplée à une approche familiale classique comme nous l'avons réalisé pour la valvulopathie

myxoïde mitrale liée au chromosome X. où nous avons montré qu'il est possible d'identifier de nouvelles branches familiales par une approche géographique de la maladie. Cette approche a l'avantage de permettre l'identification de formes familiales d'une maladie de façon systématique et sans qu'un facteur chance soit nécessaire. En effet, jusqu'à présent dans notre centre, les formes familiales d'une pathologie étaient identifiées lorsque plusieurs patients d'une même famille venaient à être hospitalisés à peu près au même moment. Il est donc probable que de nombreuses formes familiales ont pu nous échapper.

Bien que l'approche de type analyse de liaison soit puissante, il est probable que dans le cas de très grandes familles remontant sur de nombreuses générations avec une pénétrance très tardive est un taux de phénotopies probablement élevé, l'analyse statistique réalisée au cours d'une analyse de liaison peut être prise en défaut. Pour ces familles, d'autres types d'analyses statistiques sont peut-être préférables. À ce titre, une analyse de déséquilibre de liaison semble être intéressante.

Quelle que soit la maladie étudiée, l'identification de la mutation ne permet pas à elle seule d'expliquer toute la complexité de la pathologie. Ainsi, avec la même mutation certains patients développent une forme sévère de la maladie tandis que d'autres en sont pratiquement indemnes. D'autres facteurs, génétiques ou environnementaux, jouent un rôle majeur dans l'évolution de la maladie. Nous pensons que notre approche d'épidémiologie génétique doit nous permettre, à terme, d'identifier de très grandes familles composées de plusieurs centaines de patients porteurs de la même mutation. En effet, il est raisonnable de penser que dans une population stable géographiquement, un ancêtre très éloigné porteur d'une mutation a pu la transmettre à de nombreux descendants. Une fois cette mutation identifiée sur un noyau familial relativement large, un dépistage systématique de la maladie et la recherche systématique de la mutation dans la population des communes d'où sont originaires les membres de la famille devraient permettre d'identifier de nouveaux sujets porteurs de la mutation. Le premier travail que nous avons réalisé sur la famille de valvulopathie myxoïde liée au chromosome X. montre que cette approche est valide. Une fois les patients porteurs de la mutation identifiés, il deviendra alors possible de constituer une large banque de données comprenant les informations cliniques, environnementales et génétiques ce qui permettra ensuite d'évaluer les différents facteurs qui interviennent sur l'évolution de la maladie. Il est probable que les facteurs génétiques y jouent un

rôle important et nous pensons que l'identification de ces facteurs pourrait être une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie puis dans l'identification de nouvelles voies thérapeutiques pour ces pathologies.

Cette approche est d'autant plus intéressante que les facteurs modulateurs identifiés dans les formes génétiques des pathologies jouent probablement un rôle dans les formes non génétiques ou dans les formes liées à un autre gène. Les nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient ainsi être identifiées pourraient donc probablement s'appliquer à la majorité des patients atteints de ces pathologies.

Nous n'en sommes donc actuellement encore qu'à la première étape du travail qui devra probablement encore se continuer sur de nombreuses années. L'étape actuelle est pourtant essentielle car les grands fichiers qui permettront l'identification des facteurs modulateurs de ces différentes pathologies puis des nouvelles voies thérapeutiques doivent se constituer maintenant.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott G. W., Sesti F., Splawski I., Buck M. E., Lehmann M. H., Timothy K. W., Keating M. T., Goldstein S. A. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, 1999, 97: 175-187.
- Abriel H., Kamynina E., Horisberger J. D., Staub O. Regulation of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett*, 2000, 466: 377-380.
- Acar J., Michel P. L., Chomette G., Iung B., Starkman C. [Dystrophic aortic valve insufficiency]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1991, 84: 105-111.
- Adams J. C., Watt F. M. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, 1993, 117: 1183-1198.
- Akai J., Makita N., Sakurada H., Shirai N., Ueda K., Kitabatake A., Nakazawa K., Kimura A., Hiraoka M. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett*, 2000, 479: 29-34.
- Albanesi Filho F. M., Ginefra P., Castier M. B., da Rocha P. J., de Albuquerque D. C. [Familial complete atrioventricular block in patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol*, 1992, 59: 209-213.
- Alings M., Dekker L., Sadee A., Wilde A. Quinidine induced electrocardiographic normalization in two patients with Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2001, 24: 1420-1422.
- Alings M., Wilde A. "Brugada" syndrome: clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation*, 1999, 99: 666-673.
- Allen W. M., Matloff J. M., Fishbein M. C. Myxoid degeneration of the aortic valve and isolated severe aortic regurgitation. *Am J Cardiol*, 1985, 55: 439-444.
- Amat-y-Leon F., Racki A. J., Denes P., Ten Eick R. E., Singer D. H., Bharati S., Lev M., Rosen K. M. Familial atrial dysrhythmia with A-V block. Intracellular microelectrode, clinical electrophysiologic, and morphologic observations. *Circulation*, 1974, 50: 1097-1104.
- Antzelevitch C. The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2001, 12: 268-272.
- Antzelevitch C., Sicouri S., Litovsky S. H., Lukas A., Krishnan S. C., Di Diego J. M., Gintant G. A., Liu D. W. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res*, 1991, 69: 1427-1449.
- Arbustini E., Morbini P., Grasso M., Fasani R., Verga L., Bellini O., Dal Bello B., Campana C., Piccolo G., Febo O., Opasich C., Gavazzi A., Ferrans V. J. Restrictive cardiomyopathy, atrioventricular block and mild to subclinical myopathy in patients with desmin-immunoreactive material deposits. *J Am Coll*

Cardiol, 1998, 31: 645-653.

Atarashi H., Ogawa S., Harumi K., Sugimoto T., Inoue H., Murayama M., Toyama J., Hayakawa H. Three-year follow-up of patients with right bundle branch block and ST segment elevation in the right precordial leads: Japanese Registry of Brugada Syndrome. Idiopathic Ventricular Fibrillation Investigators. J Am Coll Cardiol, 2001, 37: 1916-1920.

Aulchenko Y. S., Axenovich T. I., Mackay I., van Duijn C. M. miLD and booLD programs for calculation and analysis of corrected linkage disequilibrium. Ann Hum Genet, 2003a, 67: 372-375.

Aulchenko Y. S., Vaessen N., Heutink P., Pullen J., Snijders P. J., Hofman A., Sandkuijl L. A., Houwing-Duistermaat J. J., Edwards M., Bennett S., Oostra B. A., van Duijn C. M. A genome-wide search for genes involved in type 2 diabetes in a recently genetically isolated population from the Netherlands. Diabetes, 2003b, 52: 3001-3004.

Balser J. R. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33: 599-613.

Bareiss P., Christmann D., Beissel J. [Familial forms of the mid-end systolic click and murmur syndrome with deviations of left ventricular kinetics]. Arch Mal Coeur Vaiss, 1976a, 69: 71-81.

Bareiss P., Christmann D., Class J. J., Stoll C., Warter J. [Hereditary transmission of idiopathic valvular mitral prolapse]. Nouv Presse Med, 1976b, 5: 2812.

Barlow J. B. The diagnosis and treatment of mitral incompetence. S Afr Med J, 1968, 42: 400-403.

Barlow J. B., Bosman C. K., Pocock W. A., Marchand P. Late systolic murmurs and non-ejection ("mid-late") systolic clicks. An analysis of 90 patients. Br Heart J, 1968, 30: 203-218.

Barlow J. B., Pocock W. A. Mitral valve prolapse, the specific billowing mitral leaflet syndrome, or an insignificant non-ejection systolic click. Am Heart J, 1979, 97: 277-285.

Baron R. C., Kirschner R. H. Sudden night-time death among South-East Asians too. Lancet, 1983a, 1: 764.

Baron R. C., Thacker S. B., Gorelkin L., Vernon A. A., Taylor W. R., Choi K. Sudden death among Southeast Asian refugees. An unexplained nocturnal phenomenon. Jama, 1983b, 250: 2947-2951.

Baroudi G., Acharfi S., Larouche C., Chahine M. Expression and intracellular localization of an SCN5A double mutant R1232W/T1620M implicated in Brugada syndrome. Circ Res, 2002, 90: E11-16.

Baroudi G., Carbonneau E., Pouliot V., Chahine M. SCN5A mutation (T1620M) causing Brugada syndrome exhibits different phenotypes when expressed in *Xenopus* oocytes and mammalian cells. FEBS Lett, 2000, 467: 12-16.

Baroudi G., Pouliot V., Denjoy I., Guicheney P., Shrier A., Chahine M. Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). Circ Res, 2001, 88: E78-83.

Barry C. P., Xie J., Lemmon V., Young A. P. Molecular characterization of a multi-promoter gene encoding a chicken filamin protein. J Biol Chem, 1993, 268: 25577-25586.

- Beighton P. Cardiac abnormalities in the Ehlers-Danlos syndrome. *Br Heart J*, 1969, 31: 227-232.
- Benson D. W. The genetic origin of atrioventricular conduction disturbance in humans. *Novartis Found Symp*, 2003, 250: 242-252; discussion 252-249, 276-249.
- Benson D. W., Silberbach G. M., Kavanaugh-McHugh A., Cottrill C., Zhang Y., Riggs S., Smalls O., Johnson M. C., Watson M. S., Seidman J. G., Seidman C. E., Plowden J., Kugler J. D. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest*, 1999, 104: 1567-1573.
- Bezzina C., Veldkamp M. W., van Den Berg M. P., Postma A. V., Rook M. B., Viersma J. W., van Langen I. M., Tan-Sindhunata G., Bink-Boelkens M. T., van Der Hout A. H., Mannens M. M., Wilde A. A. A single Na⁽⁺⁾ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res*, 1999, 85: 1206-1213.
- Bezzina C. R., Rook M. B., Groenewegen W. A., Herfst L. J., van der Wal A. C., Lam J., Jongsma H. J., Wilde A. A., Mannens M. M. Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ Res*, 2003, 92: 159-168.
- Bezzina C. R., Rook M. B., Wilde A. A. Cardiac sodium channel and inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res*, 2001, 49: 257-271.
- Bianco M., Bria S., Gianfelici A., Sanna N., Palmieri V., Zeppilli P. Does early repolarization in the athlete have analogies with the Brugada syndrome? *Eur Heart J*, 2001, 22: 504-510.
- Bon Tempo C. P., Ronan J. A., Jr., de Leon A. C., Jr., Twigg H. L. Radiographic appearance of the thorax in systolic click-late systolic murmur syndrome. *Am J Cardiol*, 1975, 36: 27-31.
- Bonadio J., Ramirez F., Barr M. An intron mutation in the human alpha 1(I) collagen gene alters the efficiency of pre-mRNA splicing and is associated with osteogenesis imperfecta type II. *J Biol Chem*, 1990, 265: 2262-2268.
- Bonne G., Di Barletta M. R., Varnous S., Becane H. M., Hammouda E. H., Merlini L., Muntoni F., Greenberg C. R., Gary F., Urtizbera J. A., Duboc D., Fardeau M., Toniolo D., Schwartz K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1999, 21: 285-288.
- Bordachar P., Reuter S., Garrigue S., Cai X., Hocini M., Jais P., Haissaguerre M., Clementy J. Incidence, clinical implications and prognosis of atrial arrhythmias in Brugada syndrome. *Eur Heart J*, 2004, 25: 879-884.
- Bowles K. R., Gajarski R., Porter P., Goytia V., Bachinski L., Roberts R., Pignatelli R., Towbin J. A. Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23. *J Clin Invest*, 1996, 98: 1355-1360.
- Branch K. R., O'Brien K. D., Otto C. M. Aortic valve sclerosis as a marker of active atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep*, 2002, 4: 111-117.
- Brener S. J., Duffy C. I., Thomas J. D., Stewart W. J. Progression of aortic stenosis in 394 patients: relation to changes in myocardial and mitral valve dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 25: 305-310.

- Brink A. J., Torrington M. Progressive familial heart block--two types. *S Afr Med J*, 1977, 52: 53-59.
- Brink P. A., Ferreira A., Moolman J. C., Weymar H. W., van der Merwe P. L., Corfield V. A. Gene for progressive familial heart block type I maps to chromosome 19q13. *Circulation*, 1995, 91: 1633-1640.
- Brugada J., Brugada P., Brugada R. The syndrome of right bundle branch block ST segment elevation in V1 to V3 and sudden death--the Brugada syndrome. *Europace*, 1999, 1: 156-166.
- Brugada J., Brugada R., Antzelevitch C., Towbin J., Nademanee K., Brugada P. Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation*, 2002, 105: 73-78.
- Brugada P., Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol*, 1992, 20: 1391-1396.
- Brugada P., Brugada R., Mont L., Rivero M., Geelen P., Brugada J. Natural history of Brugada syndrome: the prognostic value of programmed electrical stimulation of the heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003, 14: 455-457.
- Brugada R., Brugada J., Antzelevitch C., Kirsch G. E., Potenza D., Towbin J. A., Brugada P. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation*, 2000, 101: 510-515.
- Brugada R., Tapscott T., Czernuszewicz G. Z., Marian A. J., Iglesias A., Mont L., Brugada J., Girona J., Domingo A., Bachinski L. L., Roberts R. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 1997, 336: 905-911.
- Bruns H. J., Eckardt L., Vahlhaus C., Schulze-Bahr E., Haverkamp W., Borggrefe M., Breithardt G., Wichter T. Body surface potential mapping in patients with Brugada syndrome: right precordial ST segment variations and reverse changes in left precordial leads. *Cardiovasc Res*, 2002, 54: 58-66.
- Buob A., Siaplaouras S., Janzen I., Schwaab B., Hammer B., Schneider G., Kandolf R., Bohm M., Jung J. Focal parvovirus B19 myocarditis in a patient with Brugada syndrome. *Cardiol Rev*, 2003, 11: 45-49.
- Cabeen W. R., Jr., Reza M. J., Kovick R. B., Stern M. S. Mitral valve prolapse and conduction defects in Ehlers-Danlos syndrome. *Arch Intern Med*, 1977, 137: 1227-1231.
- Cabo C., Pertsov A. M., Baxter W. T., Davidenko J. M., Gray R. A., Jalife J. Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle. *Circ Res*, 1994, 75: 1014-1028.
- Campbell M. Calcific aortic stenosis and congenital bicuspid aortic valves. *Br Heart J*, 1968, 30: 606-616.
- Cao H., Hegele R. A. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, 2000, 9: 109-112.
- Carabello B. A. Aortic sclerosis--a window to the coronary arteries? *N Engl J Med*, 1999, 341: 193-195.
- Charpentier F., Demolombe S., Escande D. Cardiac channelopathies: from men to mice. *Ann Med*, 2004, 36 Suppl 1: 28-34.

- Chauhan V. S., Tuvia S., Buhusi M., Bennett V., Grant A. O. Abnormal cardiac Na(+) channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice. *Circ Res*, 2000, 86: 441-447.
- Chen C. Y., Schwartz R. J. Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J Biol Chem*, 1995, 270: 15628-15633.
- Chen Q., Kirsch G. E., Zhang D., Brugada R., Brugada J., Brugada P., Potenza D., Moya A., Borggrefe M., Breithardt G., Ortiz-Lopez R., Wang Z., Antzelevitch C., O'Brien R. E., Schulze-Bahr E., Keating M. T., Towbin J. A., Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*, 1998, 392: 293-296.
- Cheng G., Lichtenberg W. H., Cole G. J., Mikawa T., Thompson R. P., Gourdie R. G. Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development*, 1999, 126: 5041-5049.
- Chou H. T., Chen Y. T., Shi Y. R., Tsai F. J. Association between angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and mitral valve prolapse syndrome. *Am Heart J*, 2003a, 145: 169-173.
- Chou H. T., Shi Y. R., Hsu Y., Tsai F. J. Association between fibrillin-1 gene exon 15 and 27 polymorphisms and risk of mitral valve prolapse. *J Heart Valve Dis*, 2003b, 12: 475-481.
- Christiano A. M., Anhalt G., Gibbons S., Bauer E. A., Uitto J. Premature termination codons in the type VII collagen gene (COL7A1) underlie severe, mutilating recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Genomics*, 1994, 21: 160-168.
- Clancy C. E., Rudy Y. Na(+) channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation*, 2002, 105: 1208-1213.
- Clementi M., Notari L., Borghi A., Tenconi R. Familial congenital bicuspid aortic valve: a disorder of uncertain inheritance. *Am J Med Genet*, 1996, 62: 336-338.
- Coffman J. D., Sommers S. C. Familial pseudoxanthoma elasticum and valvular heart disease. *Circulation*, 1959, 19: 242-250.
- Combrink J. M. D., W. H.; Snyman, H. W. Familial bundle branch block. *Am. Heart J*, 1962, 64: 397-400.
- Corrado D., Basso C., Buja G., Nava A., Rossi L., Thiene G. Right bundle branch block, right precordial st-segment elevation, and sudden death in young people. *Circulation*, 2001, 103: 710-717.
- Criscitiello M. G., Ronan J. A., Jr., Besterman E. M., Schoehwetter W. Cardiovascular Abnormalities in Osteogenesis Imperfecta. *Circulation*, 1965, 31: 255-262.
- Crispell K. A. Familial cardiomyopathies: significant causes of heart failure. *Curr Cardiol Rep*, 2003, 5: 187-192.
- Dalakas M. C., Park K. Y., Semino-Mora C., Lee H. S., Sivakumar K., Goldfarb L. G. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N Engl J Med*, 2000, 342: 770-780.
- Darsee J. R., Mikolich J. R., Nicoloff N. B., Lesser L. E. Prevalence of mitral valve prolapse in

presumably healthy young men. *Circulation*, 1979, 59: 619-622.

Davies M. J. A histological study of the conduction system in complete heart block. *J Pathol Bacteriol*, 1967, 94: 351-358.

— Pathology of chronic AV block. *Acta Cardiol*, 1976, 21: 19-30.

Davies M. J., Moore B. P., Braimbridge M. V. The floppy mitral valve. Study of incidence, pathology, and complications in surgical, necropsy, and forensic material. *Br Heart J*, 1978, 40: 468-481.

de Carvalho A., de Almeida D. Spread of activity through the atrioventricular node. *Circ Res*, 1960, 8: 801-809.

de Meeus A., Stephan E., Debrus S., Jean M. K., Loiselet J., Weissenbach J., Demaille J., Bouvagnet P. An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Circ Res*, 1995, 77: 735-740.

DeForest R. E. Four cases of 'benign' left bundle branch block in the same family. *Am. Heart J*, 1956, 51: 398-404.

Delorme B., Dahl E., Jarry-Guichard T., Marics I., Briand J. P., Willecke K., Gros D., Theveniau-Ruissy M. Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Dev Dyn*, 1995, 204: 358-371.

Deschenes I., Baroudi G., Berthet M., Barde I., Chalvidan T., Denjoy I., Guicheney P., Chahine M. Electrophysiological characterization of SCN5A mutations causing long QT (E1784K) and Brugada (R1512W and R1432G) syndromes. *Cardiovasc Res*, 2000, 46: 55-65.

Devereux R. B., Brown W. T., Kramer-Fox R., Sachs I. Inheritance of mitral valve prolapse: effect of age and sex on gene expression. *Ann Intern Med*, 1982a, 97: 826-832.

Devereux R. B., Brown W. T., Lutas E. M., Kramer-Fox R., Laragh J. H. Association of mitral-valve prolapse with low body-weight and low blood pressure. *Lancet*, 1982b, 2: 792-795.

Devereux R. B., Kramer-Fox R., Brown W. T., Shear M. K., Hartman N., Kligfield P., Lutas E. M., Spitzer M. C., Litwin S. D. Relation between clinical features of the mitral prolapse syndrome and echocardiographically documented mitral valve prolapse. *J Am Coll Cardiol*, 1986, 8: 763-772.

Devereux R. B., Kramer-Fox R., Kligfield P. Mitral valve prolapse: causes, clinical manifestations, and management. *Ann Intern Med*, 1989, 111: 305-317.

Devereux R. B., Kramer-Fox R., Shear M. K., Kligfield P., Pini R., Savage D. D. Diagnosis and classification of severity of mitral valve prolapse: methodologic, biologic, and prognostic considerations. *Am Heart J*, 1987, 113: 1265-1280.

Devereux R. B., Perloff J. K., Reichek N., Josephson M. E. Mitral valve prolapse. *Circulation*, 1976, 54: 3-14.

Di Diego J. M., Cordeiro J. M., Goodrow R. J., Fish J. M., Zygmunt A. C., Perez G. J., Scornik F. S., Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation*, 2002, 106: 2004-2011.

- Di Diego J. M., Sun Z. Q., Antzelevitch C. I(to) and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol*, 1996, 271: H548-561.
- 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. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, 1996, 380: 152-154.
- Disse S., Abergel E., Berrebi A., Houot A. M., Le Heuzey J. Y., Diebold B., Guize L., Carpentier A., Corvol P., Jeunemaitre X. Mapping of a first locus for autosomal dominant myxomatous mitral-valve prolapse to chromosome 16p11.2-p12.1. *Am J Hum Genet*, 1999, 65: 1242-1251.
- Dolan M. S., Castello R., St Vrain J. A., Aguirre F., Labovitz A. J. Quantitation of aortic regurgitation by Doppler echocardiography: a practical approach. *Am Heart J*, 1995, 129: 1014-1020.
- Donner R., Carabello B. A., Black I., Spann J. F. Left ventricular wall stress in compensated aortic stenosis in children. *Am J Cardiol*, 1983, 51: 946-951.
- Douglas P. S., Carmichael K. A., Palevsky P. M. Extreme hypercalcemia and electrocardiographic changes. *Am J Cardiol*, 1984, 54: 674-675.
- Dumaine R., Towbin J. A., Brugada P., Vatta M., Nesterenko D. V., Nesterenko V. V., Brugada J., Brugada R., Antzelevitch C. Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circ Res*, 1999, 85: 803-809.
- Dunn R. B., Griggs D. M., Jr. Ventricular filling pressure as a determinant of coronary blood flow during ischemia. *Am J Physiol*, 1983, 244: H429-436.
- Eckardt L., Kirchhof P., Johna R., Haverkamp W., Breithardt G., Borggrefe M. Wolff-Parkinson-White syndrome associated with Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2001a, 24: 1423-1424.
- Eckardt L., Kirchhof P., Loh P., Schulze-Bahr E., Johna R., Wichter T., Breithardt G., Haverkamp W., Borggrefe M. Brugada syndrome and supraventricular tachyarrhythmias: a novel association? *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2001b, 12: 680-685.
- Egeo A., Mazzocco M., Sotgia F., Arrigo P., Oliva R., Bergonon S., Nizetic D., Rasore-Quartino A., Scartezzini P. Identification and characterization of a new human cDNA from chromosome 21q22.3 encoding a basic nuclear protein. *Hum Genet*, 1998, 102: 289-293.
- Elliott P., McKenna W. J. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*, 2004, 363: 1881-1891.
- Emanuel R., Withers R., O'Brien K., Ross P., Feizi O. Congenitally bicuspid aortic valves. Clinicogenetic study of 41 families. *Br Heart J*, 1978, 40: 1402-1407.
- Fatkin D., MacRae C., Sasaki T., Wolff M. R., Porcu M., Frenneaux M., Atherton J., Vidaillet H. J., Jr., Spudich S., De Girolami U., Seidman J. G., Seidman C., Muntoni F., Muehle G., Johnson W., McDonough B. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*, 1999, 341: 1715-1724.
- Fauchier J. P., Charbonnier B., Latour F., Brochier M. [Chronic idiopathic binodal block. Occurrence, course and pathogenesis]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1979a, 72: 1052-1058.

Fauchier J. P., Latour F., Charbonnier B., Brochier M. [Adult familial idiopathic binodal block]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1979b, 72: 1059-1068.

Feldman T. Rheumatic heart disease. *Curr Opin Cardiol*, 1996, 11: 126-130.

Fluture A., Chaudhari S., Frishman W. H. Valvular heart disease and systemic lupus erythematosus: therapeutic implications. *Heart Dis*, 2003, 5: 349-353.

Fox J. W., Lamperti E. D., Eksioglu Y. Z., Hong S. E., Feng Y., Graham D. A., Scheffer I. E., Dobyns W. B., Hirsch B. A., Radtke R. A., Berkovic S. F., Huttenlocher P. R., Walsh C. A. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*, 1998, 21: 1315-1325.

Frable W. J. Mucinous degeneration of the cardiac valves: the "floppy valve" syndrome. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1969, 58: 62-70.

Freed L. A., Acierno J. S., Jr., Dai D., Leyne M., Marshall J. E., Nesta F., Levine R. A., Slaugenhaupt S. A. A locus for autosomal dominant mitral valve prolapse on chromosome 11p15.4. *Am J Hum Genet*, 2003, 72: 1551-1559.

Freed L. A., Levy D., Levine R. A., Larson M. G., Evans J. C., Fuller D. L., Lehman B., Benjamin E. J. Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N Engl J Med*, 1999, 341: 1-7.

Frink R. J., James T. N. Normal blood supply to the human His bundle and proximal bundle branches. *Circulation*, 1973, 47: 8-18.

Froment R., Silie M., Boissel J. P., Normand J. [Click syndrome and mesotelesystolic murmur (apropos of familial forms)]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1972, 65: 1357-1364.

Fujimoto K., Nagafuchi A., Tsukita S., Kuraoka A., Ohokuma A., Shibata Y. Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci*, 1997, 110 (Pt 3): 311-322.

Fulton Z., Judson C., Norris G. Congenital heart block occurring in a father and two children, one an infant. *Am J Med*, 1910, 140: 339-348.

Gazes P., Culler R., Taber E., Kelly T. Congenital familial cardiac conduction defects. *Circulation*, 1965, 32: 32-34.

Glesby M. J., Pyeritz R. E. Association of mitral valve prolapse and systemic abnormalities of connective tissue. A phenotypic continuum. *Jama*, 1989, 262: 523-528.

Glick B. N., Roberts W. C. Congenitally bicuspid aortic valve in multiple family members. *Am J Cardiol*, 1994, 73: 400-404.

Godin J. F., Nicolas G., Bouhour J. B., Horeau J. [Familial form of atrio-ventricular conduction disorders. Apropos of a case of syncopal atrioventricular block in a 21-month-old child. Pacemaker implantation]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*, 1973, 22: 331-337.

Goldbaum T. S., Lindsay J., Jr., Garcia J. M., Pichard A. D. Ascending aortic calcification and calcific aortic stenosis in a young woman. *Am Heart J*, 1986, 111: 992-993.

- Gorlin J. B., Yamin R., Egan S., Stewart M., Stossel T. P., Kwiatkowski D. J., Hartwig J. H. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol*, 1990, 111: 1089-1105.
- Gorlin R., Gorlin S. G. Hydraulic formula for calculation of the area of the stenotic mitral valve, other cardiac valves, and central circulatory shunts. I. *Am Heart J*, 1951, 41: 1-29.
- Gosset P., Ghezala G. A., Korn B., Yaspo M. L., Poutska A., Lehrach H., Sinet P. M., Creau N. A new inward rectifier potassium channel gene (KCNJ15) localized on chromosome 21 in the Down syndrome chromosome region 1 (DCR1). *Genomics*, 1997, 44: 237-241.
- Gourdie R. G., Severs N. J., Green C. R., Rothery S., Germroth P., Thompson R. P. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci*, 1993, 105 (Pt 4): 985-991.
- Graber H. L., Unverferth D. V., Baker P. B., Ryan J. M., Baba N., Wooley C. F. Evolution of a hereditary cardiac conduction and muscle disorder: a study involving a family with six generations affected. *Circulation*, 1986, 74: 21-35.
- Grant A. O. Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med*, 2001, 110: 296-305.
- Greenspahn B. R., Denes P., Daniel W., Rosen K. M. Chronic bifascicular block: evaluation of familial factors. *Ann Intern Med*, 1976, 84: 521-525.
- Gronefeld G., Hohnloser S. H. What do implantable cardioverter/defibrillators teach us about the mechanisms of sudden cardiac death? *Cardiovasc Res*, 2001, 50: 232-241.
- Gussak I., Antzelevitch C., Bjerregaard P., Towbin J. A., Chaitman B. R. The Brugada syndrome: clinical, electrophysiologic and genetic aspects. *J Am Coll Cardiol*, 1999, 33: 5-15.
- Gutierrez-Roelens I., Sluysmans T., Gewillig M., Devriendt K., Vikkula M. Progressive AV-block and anomalous venous return among cardiac anomalies associated with two novel missense mutations in the CSX/NKX2-5 gene. *Hum Mutat*, 2002, 20: 75-76.
- Hadjimiltiades S., Panidis I. P., Feldman M. H., McAllister M., Mintz G. S. Mitral valve prolapse and seizures in a family. *Am J Cardiol*, 1986, 58: 171-172.
- Harvey K. F., Kumar S. Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol*, 1999, 9: 166-169.
- Hatle L. Noninvasive assessment and differentiation of left ventricular outflow obstruction with Doppler ultrasound. *Circulation*, 1981, 64: 381-387.
- Hecht H. H., Kossmann C. E., Childers R. W., Langendorf R., Lev M., Rosen K. M., Pruitt R. D., Truex R. C., Uhley H. N., Watt T. B., Jr. Atrioventricular and intraventricular conduction. Revised nomenclature and concepts. *Am J Cardiol*, 1973, 31: 232-244.
- Heckman B. A., Steinberg I. Congenital heart disease (mitral regurgitation) in osteogenesis imperfecta.

- Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med, 1968, 103: 601-607.
- Hegrenaes L., Hatle L. Aortic stenosis in adults. Non-invasive estimation of pressure differences by continuous wave Doppler echocardiography. *Br Heart J*, 1985, 54: 396-404.
- Heiss N. S., Gloeckner G., Bachner D., Kioschis P., Klauck S. M., Hinzmann B., Rosenthal A., Herman G. E., Poustka A. Genomic structure of a novel LIM domain gene (ZNF185) in Xq28 and comparisons with the orthologous murine transcript. *Genomics*, 1997, 43: 329-338.
- Helmcke F., Nanda N. C., Hsiung M. C., Soto B., Adey C. K., Goyal R. G., Gatewood R. P., Jr. Color Doppler assessment of mitral regurgitation with orthogonal planes. *Circulation*, 1987, 75: 175-183.
- Henry W. L., DeMaria A., Gramiak R., King D. L., Kisslo J. A., Popp R. L., Sahn D. J., Schiller N. B., Tajik A., Teichholz L. E., Weyman A. E. Report of the American Society of Echocardiography Committee on Nomenclature and Standards in Two-dimensional Echocardiography. *Circulation*, 1980, 62: 212-217.
- Hermida J. S., Denjoy I., Clerc J., Extramiana F., Jarry G., Milliez P., Guicheney P., Di Fusco S., Rey J. L., Cauchemez B., Leenhardt A. Hydroquinidine therapy in Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43: 1853-1860.
- Hermida J. S., Lemoine J. L., Aoun F. B., Jarry G., Rey J. L., Quiret J. C. Prevalence of the brugada syndrome in an apparently healthy population. *Am J Cardiol*, 2000, 86: 91-94.
- Hess O. M., Ritter M., Schneider J., Grimm J., Turina M., Krayenbuehl H. P. Diastolic stiffness and myocardial structure in aortic valve disease before and after valve replacement. *Circulation*, 1984, 69: 855-865.
- Hong K., Berruezo-Sanchez A., Pongvarin N., Oliva A., Vatta M., Brugada J., Brugada P., Towbin J. A., Dumaine R., Pinero-Galvez C., Antzelevitch C., Brugada R. Phenotypic characterization of a large European family with Brugada syndrome displaying a sudden unexpected death syndrome mutation in SCN5A. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2004, 15: 64-69.
- Hunt D., Sloman G. Prolapse of the posterior leaflet of the mitral valve occurring in eleven members of a family. *Am Heart J*, 1969, 78: 149-153.
- Husson G. S., Blackman M. S., Rogers M. C., Bharati S., Lev M. Familial congenital bundle branch system disease. *Am J Cardiol*, 1973, 32: 365-369.
- Ikeda Y., Hiroi Y., Hosoda T., Utsunomiya T., Matsuo S., Ito T., Inoue J., Sumiyoshi T., Takano H., Nagai R., Komuro I. Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/NKX2.5 associated with congenital heart disease. *Circ J*, 2002, 66: 561-563.
- Imaizumi S., Mazgalev T., Dreifus L. S., Michelson E. L., Miyagawa A., Bharati S., Lev M. Morphological and electrophysiological correlates of atrioventricular nodal response to increased vagal activity. *Circulation*, 1990, 82: 951-964.
- Itoh H., Shimizu M., Ino H., Okeie K., Yamaguchi M., Fujino N., Mabuchi H. Arrhythmias in patients with Brugada-type electrocardiographic findings. *Jpn Circ J*, 2001, 65: 483-486.
- James T. N. Cardiac innervation: anatomic and pharmacologic relations. *Bull N Y Acad Med*, 1967, 43:

1041-1086.

Jamieson W. R., Munro A. I., Miyagishima R. T., Allen P., Burr L. H., Tyers G. F. Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: clinical performance to seventeen years. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60: 999-1006; discussion 1007.

Johnson G. L., Vine D. L., Cottrill C. M., Noonan J. A. Echocardiographic mitral valve deformity in the mucopolysaccharidoses. *Pediatrics*, 1981, 67: 401-406.

Jouquand S., Cheron A., Galibert F. Microsatellite analysis using a two-step procedure for fluorescence labeling of PCR products. *Biotechniques*, 1999, 26: 902-905.

Kakita A., Hayashi S., Moro F., Guerrini R., Ozawa T., Ono K., Kameyama S., Walsh C. A., Takahashi H. Bilateral periventricular nodular heterotopia due to filamin 1 gene mutation: widespread glomeruloid microvascular anomaly and dysplastic cytoarchitecture in the cerebral cortex. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2002, 104: 649-657.

Kanada M., Demirtas M., Guzel R., San M., Tuncer I. Cardiomyopathy and atrioventricular block in Emery-Dreifuss muscular dystrophy--a case report. *Angiology*, 2002, 53: 109-112.

Kannel W. B., Cupples L. A., D'Agostino R. B. Sudden death risk in overt coronary heart disease: the Framingham Study. *Am Heart J*, 1987, 113: 799-804.

Kasahara H., Lee B., Schott J. J., Benson D. W., Seidman J. G., Seidman C. E., Izumo S. Loss of function and inhibitory effects of human CSX/NKX2.5 homeoprotein mutations associated with congenital heart disease. *J Clin Invest*, 2000, 106: 299-308.

Kasahara H., Usheva A., Ueyama T., Aoki H., Horikoshi N., Izumo S. Characterization of homo- and heterodimerization of cardiac Csx/Nkx2.5 homeoprotein. *J Biol Chem*, 2001a, 276: 4570-4580.

Kasahara H., Wakimoto H., Liu M., Maguire C. T., Converso K. L., Shioi T., Huang W. Y., Manning W. J., Paul D., Lawitts J., Berul C. I., Izumo S. Progressive atrioventricular conduction defects and heart failure in mice expressing a mutant Csx/Nkx2.5 homeoprotein. *J Clin Invest*, 2001b, 108: 189-201.

Kasper W., Meinertz T., Weber T., Geibel A., Just H. [Incidence of tricuspid valve prolapse]. *Z Kardiol*, 1991, 80: 333-337.

Kass S., MacRae C., Graber H. L., Sparks E. A., McNamara D., Boudoulas H., Basson C. T., Baker P. B., 3rd, Cody R. J., Fishman M. C., et al. A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1. *Nat Genet*, 1994, 7: 546-551.

Katz LN P. A. 1956 Part 1: The arrhythmias. Philadelphia:

Keane J. F., Driscoll D. J., Gersony W. M., Hayes C. J., Kidd L., O'Fallon W. M., Pieroni D. R., Wolfe R. R., Weidman W. H. Second natural history study of congenital heart defects. Results of treatment of patients with aortic valvar stenosis. *Circulation*, 1993, 87: 116-27.

Kennel A. J., Callahan J. A., Maloney J. D., Zajarias A. Adult-onset familial infra-Hisian block. *Am Heart J*, 1981, 102: 447-452.

Kern W. H., Tucker B. L. Myxoid changes in cardiac valves: pathologic, clinical, and ultrastructural studies. *Am Heart J*, 1972, 84: 294-301.

- Kim R. J., Becker R. C. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *American Heart Journal*, 2003, 146: 948-957.
- Kim Y. M., Yoo S. J., Choi J. Y., Kim S. H., Bae E. J., Lee Y. T. Natural course of supra-aortic stenosis and peripheral pulmonary arterial stenosis in Williams' syndrome. *Cardiol Young*, 1999, 9: 37-41.
- King B. D., Clark M. A., Baba N., Kilman J. W., Wooley C. F. "Myxomatous" mitral valves: collagen dissolution as the primary defect. *Circulation*, 1982, 66: 288-296.
- Korenberg J. R., Chen X. N., Tran H., Argraves W. S. Localization of the human gene for fibulin-1 (FBLN1) to chromosome band 22q13.3. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 68: 192-193.
- Korn S., Seilnacht J., Huth C., Feller A. M. [Cardiovascular manifestations of pseudoxanthoma elasticum (Gronblad-Strandberg syndrome)]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1987, 35: 191-194.
- Krawczak M., Reiss J., Cooper D. N. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet*, 1992, 90: 41-54.
- Kucera J. P., Kleber A. G., Rohr S. Slow conduction in cardiac tissue, II: effects of branching tissue geometry. *Circ Res*, 1998, 83: 795-805.
- Kyndt F., Probst V., Potet F., Demolombe S., Chevallier J. C., Baro I., Moisan J. P., Boisseau P., Schott J. J., Escande D., Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*, 2001, 104: 3081-3086.
- kyndt F., Schott J., Probst V., Le Marec H.**
2000 A new locus for isolated cardiac conduction defect maps to 16q23-24. In: *circulation* (ed.).
AHA, 2000; pp. 358.
- Lakier J. B., Copans H., Rosman H. S., Lam R., Fine G., Khaja F., Goldstein S. Idiopathic degeneration of the aortic valve: a common cause of isolated aortic regurgitation. *J Am Coll Cardiol*, 1985, 5: 347-357.
- Lebwohl M. Images in clinical medicine. Pseudoxanthoma elasticum. *N Engl J Med*, 1993, 329: 1240.
- Lebwohl M., Halperin J., Phelps R. G. Brief report: occult pseudoxanthoma elasticum in patients with premature cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 1993, 329: 1237-1239.
- Lebwohl M., Neldner K., Pope F. M., De Paepe A., Christiano A. M., Boyd C. D., Uitto J., McKusick V. A. Classification of pseudoxanthoma elasticum: report of a consensus conference. *J Am Acad Dermatol*, 1994, 30: 103-107.
- Lee Y. S., Chou Y. Y. Pathogenetic mechanism of senile calcific aortic stenosis: the role of apoptosis. *Chin Med J (Engl)*, 1998, 111: 934-939.
- Leier C. V., Call T. D., Fulkerson P. K., Wooley C. F. The spectrum of cardiac defects in the Ehlers-Danlos syndrome, types I and III. *Ann Intern Med*, 1980, 92: 171-178.
- Lenegre J. The pathology of complete atrio-ventricular block. *Prog. Cardiovas. Dis*, 1964, 6: 317-323.
- Lenegre J., Gay J. [A case of "solitary" probably congenital complete auriculo-ventricular block due to

- Tawara's node destruction]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1970, 63: 740-748.
- Lenegre J., Moreau P., Iris L. [2 cases of complete auriculo-ventricular block due to primary sarcoma of the heart]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1963, 56: 361-387.
- Leszczynski P., Straburzynska-Migaj E., Korczowska I., Lacki J. K., Mackiewicz S. Cardiac valvular disease in patients with systemic lupus erythematosus. Relationship with anticardiolipin antibodies. *Clin Rheumatol*, 2003, 22: 405-408.
- Lev M. Anatomic basis for atrioventricular block. *Am J Cardiol*, 1964, 37: 742-748.
- Lev M., Kinare S. G., Pick A. The pathogenesis of atrioventricular block in coronary disease. *Circulation*, 1970, 42: 409-425.
- Levine H. D., Wanzer S. H., Merrill J. P. Dialyzable currents of injury in potassium intoxication resembling acute myocardial infarction or pericarditis. *Circulation*, 1956, 13: 29-36.
- Levine R. A., Stathogiannis E., Newell J. B., Harrigan P., Weyman A. E. Reconsideration of echocardiographic standards for mitral valve prolapse: lack of association between leaflet displacement isolated to the apical four chamber view and independent echocardiographic evidence of abnormality. *J Am Coll Cardiol*, 1988, 11: 1010-1019.
- Levine R. A., Triulzi M. O., Harrigan P., Weyman A. E. The relationship of mitral annular shape to the diagnosis of mitral valve prolapse. *Circulation*, 1987, 75: 756-767.
- Levy D., Savage D. Prevalence and clinical features of mitral valve prolapse. *Am Heart J*, 1987, 113: 1281-1290.
- Li D., Czernuszewicz G. Z., Gonzalez O., Tapscoft T., Karibe A., Durand J. B., Brugada R., Hill R., Gregoritch J. M., Anderson J. L., Quinones M., Bachinski L. L., Roberts R. Novel cardiac troponin T mutation as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 2001, 104: 2188-2193.
- Li D., Tapscoft T., Gonzalez O., Burch P. E., Quinones M. A., Zoghbi W. A., Hill R., Bachinski L. L., Mann D. L., Roberts R. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 1999, 100: 461-464.
- Lindblom D., Lindblom U., Qvist J., Lundstrom H. Long-term relative survival rates after heart valve replacement. *J Am Coll Cardiol*, 1990, 15: 566-573.
- Lombard J. T., Selzer A. Valvular aortic stenosis. A clinical and hemodynamic profile of patients. *Ann Intern Med*, 1987, 106: 292-298.
- Lorber A., Maisuls E., Naschitz J. Hereditary right axis deviation: electrocardiographic pattern of pseudo left posterior hemiblock and incomplete right bundle branch block. *Int J Cardiol*, 1988, 20: 399-402.
- Luft F. C. Present status of genetic mechanisms in hypertension. *Med Clin North Am*, 2004, 88: 1-18, vii.
- Lupoglazoff J. M., Cheav T., Baroudi G., Berthet M., Denjoy I., Cauchemez B., Extramiana F., Chahine M., Guicheney P. Homozygous SCN5A mutation in long-QT syndrome with functional two-to-one atrioventricular block. *Circ Res*, 2001, 89: E16-21.

- Lupoglazoff J. M., Denjoy I., Cheav T., Berthet M., Extramiana F., Cauchemez B., Villain E., Leenhardt A., Guicheney P. [Homozygous mutation of the SCN5A gene responsible for congenital long QT syndrome with 2/1 atrioventricular block]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2002, 95: 440-446.
- Lynch H. T., Mohiuddin S., Moran J., Kaplan A., Sketch M., Zencka A., Runco V. Hereditary progressive atrioventricular conduction defect. *Am J Cardiol*, 1975, 36: 297-301.
- Lynch H. T., Mohiuddin S., Sketch M. H., Krush A. J., Carter S., Runco V. Hereditary progressive atrioventricular conduction defect. A new syndrome? *Jama*, 1973, 225: 1465-1470.
- Maeda M., Holder E., Lowes B., Valent S., Bies R. D. Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculin. *Circulation*, 1997, 95: 17-20.
- Makita N., Shirai N., Wang D. W., Sasaki K., George A. L., Jr., Kanno M., Kitabatake A. Cardiac Na(+) channel dysfunction in Brugada syndrome is aggravated by beta(1)-subunit. *Circulation*, 2000, 101: 54-60.
- Malergue M. C., Urena P., Prieur P., Guedon-Rapoud C., Petrover M. [Incidence and development of aortic stenosis in chronic hemodialysis. An ultrasonographic and biological study of 112 patients]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1997, 90: 1595-1601.
- Marcus M. L., Doty D. B., Hiratzka L. F., Wright C. B., Eastham C. L. Decreased coronary reserve: a mechanism for angina pectoris in patients with aortic stenosis and normal coronary arteries. *N Engl J Med*, 1982, 307: 1362-1366.
- Mardelli T. J., Morganroth J., Naito M., Chen C. C. Cross-sectional echocardiographic detection of aortic valve prolapse. *Am Heart J*, 1980, 100: 295-301.
- Markiewicz W., Stoner J., London E., Hunt S. A., Popp R. L. Mitral valve prolapse in one hundred presumably healthy young females. *Circulation*, 1976, 53: 464-473.
- Martini B., Nava A., Thiene G., Buja G., Canciani B., Scognamiglio R., Daliento L., Dalla Volta S. Ventricular fibrillation without apparent heart disease: description of six cases. *Am Heart J*, 1989, 118: 1203-1209.
- Massing G. K., James T. N. Anatomical configuration of the His bundle and bundle branches in the human heart. *Circulation*, 1976, 53: 609-621.
- Masson-Pevet M B. W., Mackaay A. 1978 Ultrastructural and functional aspects of the rabbit sinoatrial node (The sinus node,
- Matsuo K., Akahoshi M., Nakashima E., Suyama A., Seto S., Hayano M., Yano K. The prevalence, incidence and prognostic value of the Brugada-type electrocardiogram: a population-based study of four decades. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38: 765-770.
- Matsuo K., Akahoshi M., Seto S., Yano K. Disappearance of the Brugada-type electrocardiogram after surgical castration: a role for testosterone and an explanation for the male preponderance. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2003, 26: 1551-1553.
- Matsuo K., Kurita T., Inagaki M., Kakishita M., Aihara N., Shimizu W., Taguchi A., Suyama K., Kamakura S., Shimomura K. The circadian pattern of the development of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Eur Heart J*, 1999, 20: 465-470.

- Matsuo K., Shimizu W., Kurita T., Inagaki M., Aihara N., Kamakura S. Dynamic changes of 12-lead electrocardiograms in a patient with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1998, 9: 508-512.
- Maury P., Couderc P., Delay M., Boveda S., Brugada J. Electrical storm in Brugada syndrome successfully treated using isoprenaline. *Europace*, 2004, 6: 130-133.
- Mazzone A., Epistolato M. C., De Caterina R., Storti S., Vittorini S., Sbrana S., Gianetti J., Bevilacqua S., Glauber M., Biagini A., Tanganelli P. Neoangiogenesis, T-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43: 1670-1676.
- McLoughlin M. J., Pasternac A., Morch J., Wigle E. D. Idiopathic calcification of the ascending aorta and aortic valve in two young women. *Br Heart J*, 1974, 36: 96-100.
- Messina D. N., Speer M. C., Pericak-Vance M. A., McNally E. M. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet*, 1997, 61: 909-917.
- Miosge N., Gunther E., Heyder E., Manshausen B., Herken R. Light and electron microscopic localization of the alpha 1-chain and the E1 and E8 domains of laminin-1 in mouse kidney using monoclonal antibodies to establish the orientation of laminin-1 within basement membranes. *J Histochem Cytochem*, 1995, 43: 675-680.
- Miyasaka Y., Tsuji H., Yamada K., Tokunaga S., Saito D., Imuro Y., Matsumoto N., Iwasaka T. Prevalence and mortality of the Brugada-type electrocardiogram in one city in Japan. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38: 771-774.
- Miyatake K., Izumi S., Okamoto M., Kinoshita N., Asonuma H., Nakagawa H., Yamamoto K., Takamiya M., Sakakibara H., Nimura Y. Semiquantitative grading of severity of mitral regurgitation by real-time two-dimensional Doppler flow imaging technique. *J Am Coll Cardiol*, 1986, 7: 82-88.
- Miyazaki T., Mitamura H., Miyoshi S., Soejima K., Aizawa Y., Ogawa S. Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 27: 1061-1070.
- Mizumaki K., Fujiki A., Tsuneda T., Sakabe M., Nishida K., Sugao M., Inoue H. Vagal activity modulates spontaneous augmentation of ST elevation in the daily life of patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2004, 15: 667-673.
- Mohler P. J., Schott J. J., Gramolini A. O., Dilly K. W., Guatimosim S., duBell W. H., Song L. S., Haurogne K., Kyndt F., Ali M. E., Rogers T. B., Lederer W. J., Escande D., Le Marec H., Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*, 2003, 421: 634-639.
- Mok N. S., Priori S. G., Napolitano C., Chan N. Y., Chahine M., Baroudi G. A newly characterized SCN5A mutation underlying Brugada syndrome unmasked by hyperthermia. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003, 14: 407-411.
- Moorman A. F., de Jong F., Denyn M. M., Lamers W. H. Development of the cardiac conduction system. *Circ Res*, 1998, 82: 629-644.

- Morales A. R., Romanelli R., Boucek R. J., Tate L. G., Alvarez R. T., Davis J. T. Myxoid heart disease: an assessment of extravalvular cardiac pathology in severe mitral valve prolapse. *Hum Pathol*, 1992, 23: 129-137.
- Morgans C. M., Gray K. E., Robb G. H. A survey of familial heart block. *Br Heart J*, 1974, 36: 693-696.
- Morita H., Kusano-Fukushima K., Nagase S., Fujimoto Y., Hisamatsu K., Fujio H., Haraoka K., Kobayashi M., Morita S. T., Nakamura K., Emori T., Matsubara H., Hina K., Kita T., Fukatani M., Ohe T. Atrial fibrillation and atrial vulnerability in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40: 1437-1444.
- Moro F., Carozzo R., Veggiotti P., Tortorella G., Toniolo D., Volzone A., Guerrini R. Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene. *Neurology*, 2002, 58: 916-921.
- Morquio L. Sur une maladie infantile et familiale caracterisee par des modifications permanentes du poulx, des attaques syncopales et epileptiformes et la mort subite. *Arch. Med. Enfants*, 1901, 4: 467-475.
- Morton N. E. Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet*, 1955, 7: 277-318.
- Muntoni F., Cau M., Ganau A., Congiu R., Arvedi G., Mateddu A., Marrosu M. G., Cianchetti C., Realdi G., Cao A., et al. Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1993, 329: 921-925.
- Nademanee K. Sudden unexplained death syndrome in Southeast Asia. *Am J Cardiol*, 1997, 79: 10-11.
- Nademanee K., Veerakul G., Nimmannit S., Chaowakul V., Bhuripanyo K., Likittanasombat K., Tunsanga K., Kuasirikul S., Malasit P., Tansupasawadikul S., Tatsanavivat P. Arrhythmogenic marker for the sudden unexplained death syndrome in Thai men. *Circulation*, 1997, 96: 2595-2600.
- Nagase S., Kusano K. F., Morita H., Fujimoto Y., Kakishita M., Nakamura K., Emori T., Matsubara H., Ohe T. Epicardial electrogram of the right ventricular outflow tract in patients with the Brugada syndrome: using the epicardial lead. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39: 1992-1995.
- Nagatomo Y., Carabello B. A., Coker M. L., McDermott P. J., Nemoto S., Hamawaki M., Spinale F. G. Differential effects of pressure or volume overload on myocardial MMP levels and inhibitory control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278: H151-161.
- Nakamura K., Robertson M., Liu G., Dickie P., Guo J. Q., Duff H. J., Opas M., Kavanagh K., Michalak M. Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *J Clin Invest*, 2001, 107: 1245-1253.
- Nakano K., Corin W. J., Spann J. F., Jr., Biederman R. W., Denslow S., Carabello B. A. Abnormal subendocardial blood flow in pressure overload hypertrophy is associated with pacing-induced subendocardial dysfunction. *Circ Res*, 1989, 65: 1555-1564.
- Narula O., Sherlag b., Samet P., Javier R. Atrioventricular block: localisation and classification by His bundle recordings. *Am J Med*, 1971, 50: 146-165.
- Nguyen-Tran V. T., Kubalak S. W., Minamisawa S., Fiset C., Wollert K. C., Brown A. B., Ruiz-Lozano P., Barrere-Lemaire S., Kondo R., Norman L. W., Gourdie R. G., Rahme M. M., Feld G. K., Clark R. B.,

- Giles W. R., Chien K. R. A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. *Cell*, 2000, 102: 671-682.
- Niermann T., Kern F., Erne P., Resink T. The glycosyl phosphatidylinositol anchor of human T-cadherin binds lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276: 1240-1247.
- Nishimura R. A., McGoon M. D., Shub C., Miller F. A., Jr., Ilstrup D. M., Tajik A. J. Echocardiographically documented mitral-valve prolapse. Long-term follow-up of 237 patients. *N Engl J Med*, 1985, 313: 1305-1309.
- Nishizaki M., Sakurada H., Ashikaga T., Yamawake N., Fujii H., Arita M., Isobe M., Hiraoka M. Effects of glucose-induced insulin secretion on ST segment elevation in the Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003, 14: 243-249.
- Novaro G. M., Sachar R., Pearce G. L., Sprecher D. L., Griffin B. P. Association between apolipoprotein e alleles and calcific valvular heart disease. *Circulation*, 2003, 108: 1804-1808.
- Novaro G. M., Tiong I. Y., Pearce G. L., Lauer M. S., Sprecher D. L., Griffin B. P. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation*, 2001, 104: 2205-2209.
- Ohkubo R., Nakagawa M., Higuchi I., Utatsu Y., Miyazato H., Atsuchi Y., Osame M. Familial skeletal myopathy with atrioventricular block. *Intern Med*, 1999, 38: 856-860.
- Olson E. N., Srivastava D. Molecular pathways controlling heart development. *Science*, 1996, 272: 671-676.
- Olson T. M., Keating M. T. Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. *J Clin Invest*, 1996, 97: 528-532.
- Olson T. M., Michels V. V., Thibodeau S. N., Tai Y. S., Keating M. T. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science*, 1998, 280: 750-752.
- Olsson M., Dalsgaard C. J., Haegerstrand A., Rosenqvist M., Ryden L., Nilsson J. Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol*, 1994, 23: 1162-1170.
- Ortega-Carnicer J., Benezet J., Ruiz-Lorenzo F., Alcazar R. Transient Brugada-type electrocardiographic abnormalities in renal failure reversed by dialysis. *Resuscitation*, 2002, 55: 215-219.
- Ortega-Carnicer J., Bertos-Polo J., Gutierrez-Tirado C. Aborted sudden death, transient Brugada pattern, and wide QRS dysrhythmias after massive cocaine ingestion. *J Electrocardiol*, 2001, 34: 345-349.
- Ortiz-Lopez R., Li H., Su J., Goytia V., Towbin J. A. Evidence for a dystrophin missense mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 1997, 95: 2434-2440.
- Ortlepp J. R., Hoffmann R., Ohme F., Lauscher J., Bleckmann F., Hanrath P. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart*, 2001, 85: 635-638.
- Ortlepp J. R., Schmitz F., Mevissen V., Weiss S., Huster J., Dronskowski R., Langebartels G., Autschbach R., Zerres K., Weber C., Hanrath P., Hoffmann R. The amount of calcium-deficient hexagonal

hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis. *Eur Heart J*, 2004, 25: 514-522.

Osher H. L., Wolff L. Electrocardiographic pattern simulating acute myocardial injury. *Am J Med Sci*, 1953, 226: 541-545.

Osler W. On the so-called Stokes-Adams disease. *Lancet*, 1903, 2: 516-524.

Otto C. M., Burwash I. G., Legget M. E., Munt B. I., Fujioka M., Healy N. L., Kraft C. D., Miyake-Hull C. Y., Schwaegler R. G. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation*, 1997, 95: 2262-2270.

Otto C. M., Kuusisto J., Reichenbach D. D., Gown A. M., O'Brien K. D. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*, 1994a, 90: 844-853.

Otto C. M., Lind B. K., Kitzman D. W., Gersh B. J., Siscovick D. S. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med*, 1999, 341: 142-147.

Otto C. M., Mickel M. C., Kennedy J. W., Alderman E. L., Bashore T. M., Block P. C., Brinker J. A., Diver D., Ferguson J., Holmes D. R., Jr., et al. Three-year outcome after balloon aortic valvuloplasty. Insights into prognosis of valvular aortic stenosis. *Circulation*, 1994b, 89: 642-650.

Otto C. M., O'Brien K. D. Why is there discordance between calcific aortic stenosis and coronary artery disease? *Heart*, 2001, 85: 601-602.

Palta S., Pai A. M., Gill K. S., Pai R. G. New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. *Circulation*, 2000, 101: 2497-2502.

Passik C. S., Ackermann D. M., Pluth J. R., Edwards W. D. Temporal changes in the causes of aortic stenosis: a surgical pathologic study of 646 cases. *Mayo Clin Proc*, 1987, 62: 119-123.

Pelikka P. A., Nishimura R. A., Bailey K. R., Tajik A. J. The natural history of adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*, 1990, 15: 1012-1017.

Perloff J. K., Child J. S. Mitral valve prolapse. Evolution and refinement of diagnostic techniques. *Circulation*, 1989, 80: 710-711.

Perloff J. K., Child J. S., Edwards J. E. New guidelines for the clinical diagnosis of mitral valve prolapse. *Am J Cardiol*, 1986, 57: 1124-1129.

Peter M., Hoffmann A., Parker C., Luscher T., Burckhardt D. Progression of aortic stenosis. Role of age and concomitant coronary artery disease. *Chest*, 1993, 103: 1715-1719.

Pocock W. A., Barlow J. B. Etiology and electrocardiographic features of the billowing posterior mitral leaflet syndrome. Analysis of a further 130 patients with a late systolic murmur or nonejection systolic click. *Am J Med*, 1971, 51: 731-739.

Pomerance A. Ballooning deformity (mucoid degeneration) of atrioventricular valves. *Br Heart J*, 1969, 31: 343-351.

Potet F., Mabo P., Le Coq G., Probst V., Schott J. J., Airaud F., Guihard G., Daubert J. C., Escande D., Le Marec H. Novel brugada SCN5A mutation leading to ST segment elevation in the inferior or the right precordial leads. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003, 14: 200-203.

Priori S. G., Napolitano C., Gasparini M., Pappone C., Bella P. D., Giordano U., Bloise R., Giustetto C., De Nardis R., Grillo M., Ronchetti E., Faggiano G., Nastoli J. Natural History of Brugada Syndrome: Insights for Risk Stratification and Management. *Circulation*, 2002a, 105: 1342-1347.

Priori S. G., Napolitano C., Gasparini M., Pappone C., Della Bella P., Brignole M., Giordano U., Giovannini T., Menozzi C., Bloise R., Crotti L., Terreni L., Schwartz P. J. Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: A prospective evaluation of 52 families. *Circulation*, 2000a, 102: 2509-2515.

Priori S. G., Napolitano C., Gasparini M., Pappone C., Della Bella P., Giordano U., Bloise R., Giustetto C., De Nardis R., Grillo M., Ronchetti E., Faggiano G., Nastoli J. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation*, 2002b, 105: 1342-1347.

Priori S. G., Napolitano C., Schwartz P. J., Bloise R., Crotti L., Ronchetti E. The elusive link between LQT3 and Brugada syndrome: the role of flecainide challenge. *Circulation*, 2000b, 102: 945-947.

Probst V., Kyndt F., Allouis M., Schott J. J., Le Marec H. [Genetics and cardiac arrhythmias]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2003a, 96: 1054-1062.

Probst V., Kyndt F., Potet F., Trochu J. N., Mialet G., Demolombe S., Schott J. J., Baro I., Escande D., Le Marec H. Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol*, 2003b, 41: 643-652.

Procacci P. M., Savran S. V., Schreiter S. L., Bryson A. L. Prevalence of clinical mitral-valve prolapse in 1169 young women. *N Engl J Med*, 1976, 294: 1086-1088.

Prystowsky E. N., Grant A. O., Wallace A. G., Strauss H. C. An analysis of the effects of acetylcholine on conduction and refractoriness in the rabbit sinus node. *Circ Res*, 1979, 44: 112-120.

Rajamannan N. M., Gersh B., Bonow R. O. Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside--emerging clinical and cellular concepts. *Heart*, 2003a, 89: 801-805.

Rajamannan N. M., Subramaniam M., Rickard D., Stock S. R., Donovan J., Springett M., Orszulak T., Fullerton D. A., Tajik A. J., Bonow R. O., Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation*, 2003b, 107: 2181-2184.

Rallidis L., Naoumova R. P., Thompson G. R., Nihoyannopoulos P. Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolaemia. *Heart*, 1998, 80: 583-590.

Read R. C., Thal A. P., Wendt V. E. Symptomatic valvular myxomatous transformation (the floppy valve syndrome). A possible forme fruste of the Marfan syndrome. *Circulation*, 1965, 32: 897-910.

Remme C. A., Wever E. F., Wilde A. A., Derksen R., Hauer R. N. Diagnosis and long-term follow-up of the Brugada syndrome in patients with idiopathic ventricular fibrillation. *Eur Heart J*, 2001, 22: 400-409.

Rhee S. G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 281-312.

- Richards A. M., Nicholls M. G., Ikram H., Hamilton E. J., Richards R. D. Syncope in aortic valvular stenosis. *Lancet*, 1984, 2: 1113-1116.
- Rippe J., Fishbein M. C., Carabello B., Angoff G., Sloss L., Collins J. J., Jr., Alpert J. S. Primary myxomatous degeneration of cardiac valves. Clinical, pathological, haemodynamic, and echocardiographic profile. *Br Heart J*, 1980, 44: 621-629.
- Rivolta I., Abriel H., Tateyama M., Liu H., Memmi M., Vardas P., Napolitano C., Priori S. G., Kass R. S. Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes. *J Biol Chem*, 2001, 276: 30623-30630.
- Rizzon P., Biasco G., Brindicci G., Mauro F. Familial syndrome of midsystolic click and late systolic murmur. *Br Heart J*, 1973, 35: 245-259.
- Roberts W. C. The congenitally bicuspid aortic valve. A study of 85 autopsy cases. *Am J Cardiol*, 1970, 26: 72-83.
- Robertson S. P., Twigg S. R., Sutherland-Smith A. J., Biancalana V., Gorlin R. J., Horn D., Kenwrick S. J., Kim C. A., Morava E., Newbury-Ecob R., Orstavik K. H., Quarrell O. W., Schwartz C. E., Shears D. J., Suri M., Kendrick-Jones J., Wilkie A. O. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet*, 2003, 33: 487-491.
- Roden D. M., George A. L., Jr., Bennett P. B. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1995, 6: 1023-1031.
- Roger V. L., Tajik A. J., Bailey K. R., Oh J. K., Taylor C. L., Seward J. B. Progression of aortic stenosis in adults: new appraisal using Doppler echocardiography. *Am Heart J*, 1990, 119: 331-338.
- Rohr S., Kucera J. P., Kleber A. G. Slow conduction in cardiac tissue, I: effects of a reduction of excitability versus a reduction of electrical coupling on microconduction. *Circ Res*, 1998, 83: 781-794.
- Rook M. B., Bezzina Alshinawi C., Groenewegen W. A., van Gelder I. C., van Ginneken A. C., Jongsma H. J., Mannens M. M., Wilde A. A. Human SCN5A gene mutations alter cardiac sodium channel kinetics and are associated with the Brugada syndrome. *Cardiovasc Res*, 1999, 44: 507-517.
- Rose A. G., Forman R. Idiopathic aortitis with calcification of ascending aorta, and aortic and mitral valves. *Br Heart J*, 1976, 38: 650-652.
- Rosenbaum M. B. The hemiblocks: diagnostic criteria and clinical significance. *Mod Concepts Cardiovasc Dis*, 1970, 39: 141-146.
- Rosenberg M. J., Agarwala R., Bouffard G., Davis J., Fiermonte G., Hilliard M. S., Koch T., Kalikin L. M., Makalowska I., Morton D. H., Petty E. M., Weber J. L., Palmieri F., Kelley R. I., Schaffer A. A., Biesecker L. G. Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nat Genet*, 2002, 32: 175-179.
- Ross D. N. Aortic and pulmonary homografts for right ventricular outflow tract reconstruction. *J Heart Valve Dis*, 1995, 4: 396-397.
- Ross J., Jr., Braunwald E. Aortic stenosis. *Circulation*, 1968, 38: 61-67.

Rouleau F., Asfar P., Boulet S., Dube L., Dupuis J. M., Alquier P., Victor J. Transient ST segment elevation in right precordial leads induced by psychotropic drugs: relationship to the Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2001, 12: 61-65.

Rubegni P., Mondillo S., De Aloe G., Agricola E., Bardelli A. M., Fimiani M. Mitral valve prolapse in healthy relatives of patients with familial Pseudoxanthoma elasticum. *Am J Cardiol*, 2000, 85: 1268-1271.

Saffitz J. E., Laing J. G., Yamada K. A. Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ Res*, 2000, 86: 723-728.

Sakura H., Wat N., Horton V., Millns H., Turner R. C., Ashcroft F. M. Sequence variations in the human Kir6.2 gene, a subunit of the beta-cell ATP-sensitive K-channel: no association with NIDDM in white Caucasian subjects or evidence of abnormal function when expressed in vitro. *Diabetologia*, 1996, 39: 1233-1236.

Salomon J., Shah P. M., Heinle R. A. Thoracic skeletal abnormalities in idiopathic mitral valve prolapse. *Am J Cardiol*, 1975, 36: 32-36.

Sanfilippo A. J., Weyman A. E., Levine R. A. The problem of echocardiographic detection of mitral valve prolapse and determination of its true prevalence. *Herz*, 1988, 13: 284-292.

Sanguinetti M. C., Curran M. E., Zou A., Shen J., Spector P. S., Atkinson D. L., Keating M. T. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*, 1996, 384: 80-83.

Sangwatanaroj S., Prechawat S., Sunsaneewitayakul B., Sitthisook S., Tosukhowong P., Tungsanga K. New electrocardiographic leads and the procainamide test for the detection of the Brugada sign in sudden unexplained death syndrome survivors and their relatives. *Eur Heart J*, 2001, 22: 2290-2296.

Sarachek N. S., Leonard J. L. Familial heart block and sinus bradycardia. Classification and natural history. *Am J Cardiol*, 1972, 29: 451-458.

Savage D. D., Garrison R. J., Devereux R. B., Castelli W. P., Anderson S. J., Levy D., McNamara P. M., Stokes J., 3rd, Kannel W. B., Feinleib M. Mitral valve prolapse in the general population. 1. Epidemiologic features: the Framingham Study. *Am Heart J*, 1983, 106: 571-576.

Sbarbaro J. A., Mehlman D. J., Wu L., Brooks H. L. A prospective study of mitral valvular prolapse in young men. *Chest*, 1979, 75: 555-559.

Schaal S. F., Seidensticker J., Goodman R., Wooley C. F. Familial right bundle-branch block, left axis deviation, complete heart block, and early death. A heritable disorder of cardiac conduction. *Ann Intern Med*, 1973, 79: 63-66.

Scherlag B. J., Lazzara R., Helfant R. H. Differentiation of "A-V junctional rhythms". *Circulation*, 1973, 48: 304-312.

Schiller N. B., Shah P. M., Crawford M., DeMaria A., Devereux R., Feigenbaum H., Gutgesell H., Reichek N., Sahn D., Schnittger I., et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr*, 1989, 2:

358-367.

Schonherr E., Witsch-Prehm P., Harrach B., Robenek H., Rauterberg J., Kresse H. Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem*, 1995, 270: 2776-2783.

Schott J. J., Alshinawi C., Kyndt F., Probst V., Hoorntje T. M., Hulsbeek M., Wilde A. A., Escande D., Mannens M. M., Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet*, 1999, 23: 20-21.

Schott J. J., Benson D. W., Basson C. T., Pease W., Silberbach G. M., Moak J. P., Maron B. J., Seidman C. E., Seidman J. G. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*, 1998, 281: 108-111.

Schott J. J., Charpentier F., Peltier S., Foley P., Drouin E., Bouhour J. B., Donnelly P., Vergnaud G., Bachner L., Moisan J. P., et al. Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 1114-1122.

Schulze-Bahr E., Eckardt L., Breithardt G., Seidl K., Wichter T., Wolpert C., Borggrefe M., Haverkamp W. Sodium channel gene (SCN5A) mutations in 44 index patients with Brugada syndrome: different incidences in familial and sporadic disease. *Hum Mutat*, 2003, 21: 651-652.

Schwartz L. S., Goldfischer J., Sprague G. J., Schwartz S. P. Syncope and sudden death in aortic stenosis. *Am J Cardiol*, 1969, 23: 647-658.

Seul K. H., Tadros P. N., Beyer E. C. Mouse connexin40: gene structure and promoter analysis. *Genomics*, 1997, 46: 120-126.

Shaw R. M., Rudy Y. Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ Res*, 1997, 81: 727-741.

Shell W. E., Walton J. A., Clifford M. E., Willis P. W., 3rd. The familial occurrence of the syndrome of mid-late systolic click and late systolic murmur. *Circulation*, 1969, 39: 327-337.

Shimizu W., Antzelevitch C., Suyama K., Kurita T., Taguchi A., Aihara N., Takaki H., Sunagawa K., Kamakura S. Effect of sodium channel blockers on ST segment, QRS duration, and corrected QT interval in patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2000a, 11: 1320-1329.

Shimizu W., Matsuo K., Takagi M., Tanabe Y., Aiba T., Taguchi A., Suyama K., Kurita T., Aihara N., Kamakura S. Body surface distribution and response to drugs of ST segment elevation in Brugada syndrome: clinical implication of eighty-seven-lead body surface potential mapping and its application to twelve-lead electrocardiograms. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2000b, 11: 396-404.

Simon A. M., Goodenough D. A., Paul D. L. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol*, 1998, 8: 295-298.

Simonsen E. E., Madsen E. G. Four cases of right-sided bundle-branch block and one case of atrioventricular block in three generations of a family. *Br Heart J*, 1970, 32: 501-504.

Skjaerpe T., Hegrenaes L., Hatle L. Noninvasive estimation of valve area in patients with aortic stenosis

by Doppler ultrasound and two-dimensional echocardiography. *Circulation*, 1985, 72: 810-818.

Smits J. P., Eckardt L., Probst V., Bezzina C. R., Schott J. J., Remme C. A., Haverkamp W., Breithardt G., Escande D., Schulze-Bahr E., LeMarec H., Wilde A. A. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40: 350-356.

Song M., Helguera G., Eghbali M., Zhu N., Zarei M. M., Olcese R., Toro L., Stefani E. Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones. *J Biol Chem*, 2001, 276: 31883-31890.

Stannard M., Sloman J. G., Hare W. S., Goble A. J. Prolapse of the posterior leaflet of the mitral valve: a clinical, familial, and cineangiographic study. *Br Med J*, 1967, 3: 71-74.

Steenkamp W. F. Familial trifascicular block. *Am Heart J*, 1972, 84: 758-760.

Steenkamp W. F., Combrink J. M., Myburgh D. P. Familial right bundle-branch block. *S Afr Med J*, 1980, 58: 393.

Stein D., Kloster F. E. Valvular heart disease in osteogenesis imperfecta. *Am Heart J*, 1977, 94: 637-641.

Stephan E. Hereditary bundle branch system defect: survey of a family with four affected generations. *Am Heart J*, 1978, 95: 89-95.

Stephan E., Aftimos G., Allam C. Familial fascicular block: histologic features of Lev's disease. *Am Heart J*, 1985, 109: 1399-1401.

Stephan E., Chedid R., Loiselet J., Bouvagnet P. [Clinical and molecular genetics of familial bundle branch block related to chromosome 19]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1998, 91: 1465-1474.

Stephan E., de Meeus A., Bouvagnet P. Hereditary bundle branch defect: right bundle branch blocks of different causes have different morphologic characteristics. *Am Heart J*, 1997, 133: 249-256.

Stewart B. F., Siscovick D., Lind B. K., Gardin J. M., Gottdiener J. S., Smith V. E., Kitzman D. W., Otto C. M. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *Cardiovascular Health Study. J Am Coll Cardiol*, 1997, 29: 630-634.

Stossel T. P., Condeelis J., Cooley L., Hartwig J. H., Noegel A., Schleicher M., Shapiro S. S. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 138-145.

Strauss H. C., Prystowsky E. N., Scheinman M. M. Sino-atrial and atrial electrogenesis. *Prog Cardiovasc Dis*, 1977, 19: 385-404.

Suzuki K., Murakami Y., Mori K., Hatai Y., Mimori S., Takahashi Y., Kikuchi T., Tatsuno K., Matsushita T. Multiple floppy valves with all cardiac valves prolapsing: clinical course and treatment. *Pediatr Cardiol*, 1991, 12: 110-113.

Sveinbjornsdottir S., Hicks A. A., Jonsson T., Petursson H., Gugmundsson G., Frigge M. L., Kong A., Gulcher J. R., Stefansson K. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med*, 2000, 343: 1765-1770.

Takafuta T., Wu G., Murphy G. F., Shapiro S. S. Human beta-filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha. *J Biol Chem*, 1998, 273: 17531-17538.

Takagi M., Aihara N., Kuribayashi S., Taguchi A., Shimizu W., Kurita T., Suyama K., Kamakura S., Hamada S., Takamiya M. Localized right ventricular morphological abnormalities detected by electron-beam computed tomography represent arrhythmogenic substrates in patients with the Brugada syndrome. *Eur Heart J*, 2001, 22: 1032-1041.

Takagi M., Aihara N., Takaki H., Taguchi A., Shimizu W., Kurita T., Suyama K., Kamakura S. Clinical characteristics of patients with spontaneous or inducible ventricular fibrillation without apparent heart disease presenting with J wave and ST segment elevation in inferior leads. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2000, 11: 844-848.

Takagi M., Toda I., Takeuchi K., Yoshikawa J. Utility of right precordial leads at higher intercostal space positions to diagnose Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2002, 25: 241-242.

Tam J. W., Masters R. G., Burwash I. G., Mayhew A. D., Chan K. L. Management of patients with mild aortic stenosis undergoing coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*, 1998, 65: 1215-1219.

Tamura K., Fukuda Y., Ishizaki M., Masuda Y., Yamanaka N., Ferrans V. J. Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve. *Am Heart J*, 1995, 129: 1149-1158.

Tan H. L., Bink-Boelkens M. T., Bezzina C. R., Viswanathan P. C., Beaufort-Krol G. C., van Tintelen P. J., van den Berg M. P., Wilde A. A., Balsler J. R. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature*, 2001, 409: 1043-1047.

Tanaka H., Kinoshita O., Uchikawa S., Kasai H., Nakamura M., Izawa A., Yokoseki O., Kitabayashi H., Takahashi W., Yazaki Y., Watanabe N., Imamura H., Kubo K. Successful prevention of recurrent ventricular fibrillation by intravenous isoproterenol in a patient with Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2001, 24: 1293-1294.

Tarin N., Farre J., Rubio J. M., Tunon J., Castro-Dorticos J. Brugada-like electrocardiographic pattern in a patient with a mediastinal tumor. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1999, 22: 1264-1266.

Tatsanavivat P., Chiravatkul A., Klungboonkrong V., Chaisiri S., Jarerntanyaruk L., Munger R. G., Saowakontha S. Sudden and unexplained deaths in sleep (Laitai) of young men in rural northeastern Thailand. *Int J Epidemiol*, 1992, 21: 904-910.

Tentolouris C., Kontozoglou T., Toutouzas P. Familial calcification of aorta and calcific aortic valve disease associated with immunologic abnormalities. *Am Heart J*, 1993, 126: 904-909.

Theman T. E., Silver M. D., Haust M. D., McLoughlin M. J., Wigle E. D., Williams W. R. Morphological findings in idiopathic calcification of the ascending aorta and aortic valve affecting a young woman. *Histopathology*, 1979, 3: 181-190.

Thongtang V., Panchavinin P., Chaithiraphan S. Familial hypertrophic cardiomyopathy associated with spontaneous complete heart block. *J Med Assoc Thai*, 1991, 74: 301-305.

Tomcsanyi J., Simor T., Papp L. Images in cardiology. Haemopericardium and Brugada-like ECG pattern in rheumatoid arthritis. *Heart*, 2002, 87: 234.

- Tonnemacher D., Reid C., Kawanishi D., Cummings T., Chandrasoma P., McKay C. R., Rahimtoola S. H., Chandraratna P. A. Frequency of myxomatous degeneration of the aortic valve as a cause of isolated aortic regurgitation severe enough to warrant aortic valve replacement. *Am J Cardiol*, 1987, 60: 1194-1196.
- Torrington M., Weymar H. W., van der Merwe P. L., Brink A. J. Progressive familial heart block. Part I. Extent of the disease. *S Afr Med J*, 1986, 70: 353-355.
- Tsutsui H., Ishihara K., Cooper G. t. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science*, 1993, 260: 682-687.
- Ueda K., Nakamura K., Hayashi T., Inagaki N., Takahashi M., Arimura T., Morita H., Higashiuesato Y., Hirano Y., Yasunami M., Takishita S., Yamashina A., Ohe T., Sunamori M., Hiraoka M., Kimura A. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem*, 2004, 279: 27194-27198.
- Undrovinas A. I., Maltsev V. A. Cytochalasin D alters kinetics of Ca²⁺ transient in rat ventricular cardiomyocytes: an effect of altered actin cytoskeleton? *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30: 1665-1670.
- Undrovinas A. I., Shander G. S., Makielski J. C. Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am J Physiol*, 1995, 269: H203-214.
- Valdivia C. R., Ackerman M. J., Tester D. J., Wada T., McCormack J., Ye B., Makielski J. C. A novel SCN5A arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine. *Cardiovasc Res*, 2002, 55: 279-289.
- Valdivia C. R., Tester D. J., Rok B. A., Porter C. B., Munger T. M., Jahangir A., Makielski J. C., Ackerman M. J. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc Res*, 2004, 62: 53-62.
- van der Flier A., Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1538: 99-117.
- van der Merwe P. L., Rose A. G., van der Walt J. J., Weymar H. W., Hunter J. C., Weich H. F. Progressive familial heart block type I. Clinical and pathological observations. *S Afr Med J*, 1991, 80: 34-38.
- van der Merwe P. L., Weymar H. W., Torrington M., Brink A. J. Progressive familial heart block. Part II. Clinical and ECG confirmation of progression--report on 4 cases. *S Afr Med J*, 1986, 70: 356-357.
- Van der Merwe P. L., Weymar H. W., Torrington M., Brink A. J. Progressive familial heart block (type I). A follow-up study after 10 years. *S Afr Med J*, 1988, 73: 275-276.
- Vergopoulos A., Knoblauch H., Schuster H. DNA testing for familial hypercholesterolemia: improving disease recognition and patient care. *Am J Pharmacogenomics*, 2002, 2: 253-262.
- Viamonte V. M., Steinberg S. F., Chow Y. K., Legato M. J., Robinson R. B., Rosen M. R. Phospholipase C modulates automaticity of canine cardiac Purkinje fibers. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 252: 886-893.
- Virmani R., Atkinson J. B., Forman M. B., Robinowitz M. Mitral valve prolapse. *Hum Pathol*, 1987, 18: 596-602.

- Viskin S., Belhassen B. Idiopathic ventricular fibrillation. *Am Heart J*, 1990, 120: 661-671.
- Viswanathan P. C., Benson D. W., Balser J. R. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest*, 2003, 111: 341-346.
- Viswanathan P. C., Bezzina C. R., George A. L., Jr., Roden D. M., Wilde A. A., Balser J. R. Gating-dependent mechanisms for flecainide action in SCN5A-linked arrhythmia syndromes. *Circulation*, 2001, 104: 1200-1205.
- Wang D. W., Viswanathan P. C., Balser J. R., George A. L., Jr., Benson D. W. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation*, 2002, 105: 341-346.
- Wang Q., Li Z., Shen J., Keating M. T. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics*, 1996, 34: 9-16.
- Wang Q., Shen J., Splawski I., Atkinson D., Li Z., Robinson J. L., Moss A. J., Towbin J. A., Keating M. T. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*, 1995, 80: 805-811.
- Warth D. C., King M. E., Cohen J. M., Tesoriero V. L., Marcus E., Weyman A. E. Prevalence of mitral valve prolapse in normal children. *J Am Coll Cardiol*, 1985, 5: 1173-1177.
- Waxman M. B., Catching J. D., Felderhof C. H., Downar E., Silver M. D., Abbott M. M. Familial atrioventricular heart block; an autosomal dominant trait. *Circulation*, 1975, 51: 226-233.
- Weisman H. F., Gaither N. S., Moore J., Rogan K. M., Hellmann D. B., McKusick V. A., Pyeritz R. E. The Storm syndrome: a new, pleiotropic, autosomal dominant disorder affecting connective tissue. *Am. J. Hum. Genet*, 1989, 45: A67.
- Weiss A. N., Mimbs J. W., Ludbrook P. A., Sobel B. E. Echocardiographic detection of mitral valve prolapse. Exclusion of false positive diagnosis and determination of inheritance. *Circulation*, 1975, 52: 1091-1096.
- Weiss R., Barmada M. M., Nguyen T., Seibel J. S., Cavlovich D., Kornblit C. A., Angelilli A., Villanueva F., McNamara D. M., London B. Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation*, 2002, 105: 707-713.
- Weissman N. J., Pini R., Roman M. J., Kramer-Fox R., Andersen H. S., Devereux R. B. In vivo mitral valve morphology and motion in mitral valve prolapse. *Am J Cardiol*, 1994, 73: 1080-1088.
- Wichter T., Matheja P., Eckardt L., Kies P., Schafers K., Schulze-Bahr E., Haverkamp W., Borggrefe M., Schober O., Breithardt G., Schafers M. Cardiac autonomic dysfunction in Brugada syndrome. *Circulation*, 2002, 105: 702-706.
- Wilde A. A., Antzelevitch C., Borggrefe M., Brugada J., Brugada R., Brugada P., Corrado D., Hauer R. N., Kass R. S., Nademanee K., Priori S. G., Towbin J. A. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation*, 2002, 106: 2514-2519.
- Willich S. N., Levy D., Rocco M. B., Tofler G. H., Stone P. H., Muller J. E. Circadian variation in the

incidence of sudden cardiac death in the Framingham Heart Study population. *Am J Cardiol*, 1987, 60: 801-806.

Winters S. J., Schreiner B., Griggs R. C., Rowley P., Nanda N. C. Familial mitral valve prolapse and myotonic dystrophy. *Ann Intern Med*, 1976, 85: 19-22.

Wong R. S., Follis F. M., Shively B. K., Wernly J. A. Osteogenesis imperfecta and cardiovascular diseases. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60: 1439-1443.

Wright J. C., Hejtmancik M., Hermann G., Shields. A clinical study of complete AV blok. *Am Heart J*, 1956, 52: 369.

Xu H., Guo W., Nerbonne J. M. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol*, 1999a, 113: 661-678.

Xu H., Li H., Nerbonne J. M. Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 alpha subunit. *J Physiol*, 1999b, 519 Pt 1: 11-21.

Xu T., Bianco P., Fisher L. W., Longenecker G., Smith E., Goldstein S., Bonadio J., Boskey A., Heegaard A. M., Sommer B., Satomura K., Dominguez P., Zhao C., Kulkarni A. B., Robey P. G., Young M. F. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet*, 1998, 20: 78-82.

Yan G. X., Antzelevitch C. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation*, 1999, 100: 1660-1666.

Yan G. X., Lankipalli R. S., Burke J. F., Musco S., Kowey P. R. Ventricular repolarization components on the electrocardiogram: cellular basis and clinical significance. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42: 401-409.

Yap E. Y., Gleaton M. S., Buettner H. Visual loss associated with pseudoxanthoma elasticum. *Retina*, 1992, 12: 315-319.

Yoshida K., Yoshikawa J., Shakudo M., Akasaka T., Jyo Y., Takao S., Shiratori K., Koizumi K., Okumachi F., Kato H., et al. Color Doppler evaluation of valvular regurgitation in normal subjects. *Circulation*, 1988, 78: 840-847.

Yun K. L., Miller D. C., Moore K. A., Mitchell R. S., Oyer P. E., Stinson E. B., Robbins R. C., Reitz B. A., Shumway N. E. Durability of the Hancock MO bioprosthesis compared with standard aortic valve bioprostheses. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60: S221-228.

Zuppiroli A., Rinaldi M., Kramer-Fox R., Favilli S., Roman M. J., Devereux R. B. Natural history of mitral valve prolapse. *Am J Cardiol*, 1995, 75: 1028-1032.

ARTICLES PARUS :

[Probst V, Evain S, Gournay V, Marie A, Schott JJ, Boisseau P, LE Marec H.](#)

Monomorphic ventricular tachycardia due to Brugada syndrome successfully treated by hydroquinidine therapy in a 3-year-old child.

J Cardiovasc Electrophysiol. 2006 Jan;17(1):97-100.

PMID: 16426410 [PubMed - in process]

- 2: [Eckardt L, Probst V, Smits JP, Bahr ES, Wolpert C, Schimpf R, Wichter T, Boisseau P, Heinecke A, Breithardt G, Borggrefe M, LeMarec H, Bocker D, Wilde AA.](#)

Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada syndrome.

Circulation. 2005 Jan 25;111(3):257-63. Epub 2005 Jan 10.

PMID: 15642768 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 3: [Potet F, Mabo P, Le Coq G, Probst V, Schott JJ, Airaud F, Guihard G, Daubert JC, Escande D, Le Marec H.](#)

Novel brugada SCN5A mutation leading to ST segment elevation in the inferior or the right precordial leads.

J Cardiovasc Electrophysiol. 2003 Feb;14(2):200-3.

PMID: 12693506 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 4: [Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H, Wilde AA.](#)

Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients.

J Am Coll Cardiol. 2002 Jul 17;40(2):350-6.

PMID: 12106943 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 5: [Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H.](#)

Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family.

Circulation. 2001 Dec 18;104(25):3081-6.

RESUME

Dans cette thèse, nous présentons les résultats de nos travaux sur la génétique des maladies rythmiques et des valvulopathies cardiaques.

Notre travail a permis d'identifier le premier gène responsable de troubles de la conduction dégénératifs (*SCN5A*), de ré exprimer la mutation causale pour en faire l'étude électrophysiologique et de réaliser une étude des relations phénotype-génotype dans cette famille. Nous présentons également l'étude de plusieurs familles atteintes de troubles de la conduction dégénératifs dont une nous a permis d'identifier le troisième locus responsable de cette maladie sur le chromosome 16.

Nous montrons que les relations phénotype-génotype des patients porteurs d'une mutation du gène *SCN5A* sont complexes par l'étude d'une famille dans laquelle la même mutation de ce gène peut être responsable de trouble de la conduction ou d'un syndrome de Brugada.

Nous présentons également nos travaux qui ont permis l'identification du premier gène de valvulopathies myxoïdes (filamine A) ainsi que d'une grande famille atteinte d'une forme classique et tricuspide de rétrécissement aortique calcifié.

In this thesis, we present the results of our work on the role of the genetic factors for cardiac arrhythmias and valvulopathies.

Our work allowed the identification of the first gene responsible for progressive cardiac conduction defects (*SCN5A*). We have performed the electrophysiological characterisation of this mutation and the analysis of the genotype to phenotype relationships. We also present the study of several families affected by progressive cardiac conduction defects. One of these families, allow us to identify the third locus for this disease on the chromosome 16.

We have also showed that the genotype to phenotype relationships for *SCN5A* mutations are complex as in one of the family the same mutation could lead to cardiac conduction defects or Brugada syndrome.

We also present our works on myxomatous valvulopathies, which allow us to identify the first gene (Filamin A) for this disease. We also present a very large family affected by a classic and trileaflet form of calcific aortic valve stenosis.