Université de Poitiers
Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2022

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(Décret du 25 novembre 2016)

présentée et soutenue publiquement
le 8 septembre 2022 à Poitiers
par Marie FOURNIER

Tests halothane caféine (IVCT) et biologie moléculaire : évolution de la méthode diagnostique de la sensibilité à l'hyperthermie maligne dans le temps et intérêt de la génétique

COMPOSITION DU JURY

Président : Monsieur le Professeur Denis FRASCA

Membres : Monsieur le Professeur Benoît TAVERNIER
Madame le Docteur Karin DHOSTE

Directeur de thèse : Madame le Docteur Anne-Frédérique DALMAS-LAURENT

Remerciements

A mon directeur de Thèse, Madame le Docteur Anne-Frédérique Dalmas-Laurent, pour la confiance que tu m'as accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour ton accompagnement et ta rigueur.

A mon Président du Jury, Monsieur le Professeur Denis Frasca, pour sa bienveillance tout au long de mon internat et ses valeurs humaines. J'ai un profond respect pour toi.

A Monsieur le Professeur Benoît Tavernier, pour avoir accepté de faire partie de mon jury et me faire l'honneur de juger mon travail.

A Madame le Docteur Karin Dhoste, pour son expérience et son sens clinique. J'ai beaucoup appris à tes côtés et je t'en remercie grandement.

A toute l'équipe de Jeanne de Flandre, pour son accueil chaleureux lors de mon interCHU.

A mes parents, pour leur amour et leur soutien sans faille. Je n'en serais pas là sans vous.

A mes tantes, Joëlle et Martine, pour leur présence et leurs attentions.

A mes grands-mères, pour leur générosité et leur prévenance.

A Solène, pour son affection au quotidien. J'espère que la route à tes côtés sera longue.

A Sébastien Montluc, pour sa gentillesse et son aide précieuse pour les biostatistiques.

A Féthi Brétel, pour avoir toujours cru en moi.

Aux amis de l'internat, pour leur fidélité : Maëva, Claire, Victoria, Léa, Léanna, Marie D., Jimmy, Camille, Sylvain. Vous comptez beaucoup pour moi. J'espère vous voir encore longtemps à mes côtés.

A Alysée et Jean-Maxime, pour m'avoir hébergée lors de mon interCHU et contribué à le rendre inoubliable.

A Estelle, pour les soirées mémorables à tes côtés, nos fous rires, nos baignades.

A Magalie, qui a je cite : « toujours raison ». Parole tenue, c'est écrit !

A Suzy, pour sa sincérité, et son affection.

A Emmanuelle, pour son oreille attentive et ses précieux conseils.

Sigles

ACMG	*American College of Medical Genetics*
CPK	*Creatine PhosphoKinase*
DHRP	*Dihydropyridine Receptor*
EMHG	*European Malignant Hyperthermia Group*
FETCO2	Fraction Télé-Expiratoire en CO2
HM	Hyperthermie Maligne
HMA	Hyperthermie Maligne de l'Anesthésie
HMN	Non sensible à l'Hyperthermie Maligne
HMS	Sensible à l'Hyperthermie Maligne
HMSc	Hyperthermie Maligne Sensible à la caféine
HMSh	Hyperthermie Maligne Sensible à l'halothane
IVCT	*In Vitro Contracture Test*
MHAUS	*Malignant Hyperthermia Association of the United States*
NGS	*Next Generation Sequencing*
RYR 1	*Ryanodine Receptor 1*
Se	Sensibilité
SFAR	Société Française d'Anesthésie Réanimation
Sp	Spécificité
VPN	Valeur Prédictive Négative
VPP	Valeur Prédictive Positive

Sommaire

Remerciements.....2

Sigles.....4

Sommaire.....5

INTRODUCTION.....7

Matériel et méthodes.....12

1/ Design de l'étude.....12

2/ Définition d'un proband.....12

3/ Définition d'un apparenté.....13

4/ Critères d'inclusion et de non-inclusion.....13

5/ Période d'inclusion : 1951-2022.....13

6/ Test de contracture in vitro.....13

7/ Biologie moléculaire.....13

8/ Analyse statistique.....14

9/ Cadre réglementaire.....15

Résultats.....16

A/ Caractéristiques des probands.....17

1/Âge.....17

2/ Sexe.....17

3/ Survie.....17

4/ Diagnostic par IVCT.....17

a/ Résultats sur l'ensemble de la période d'inclusion.....17

b/ Résultats avant 2008.....17

5/ Diagnostic par biologie moléculaire.....18

a/ Résultats sur l'ensemble de la période d'inclusion.....18

b/ Résultats après 2008.....19

6/ Statut HM final.....19

B/ Caractéristiques des apparentés.....19

1/ Âge.....20

2/ Sexe.....20

3/ Diagnostic par IVCT……20

4/ Diagnostic par biologie moléculaire……21

C/ Évolution de la méthode de diagnostic au cours du temps et apport qualitatif de la génétique……..21

1/ Évolution de la méthode de diagnostic……..21

2/ Évolution du type de mutation retrouvé……23

3/ Tableau de contingence……24

Discussion……26

Conclusion……32

Liste des figures……34

***Références*……35**

Annexe 1……38

Annexe 2……39

Annexe 3……40

Annexe 4……41

Annexe 5……42

Introduction

La crise d'Hyperthermie Maligne de l'Anesthésie (HMA) est un évènement rare, mais potentiellement létal en absence de reconnaissance de la crise et la mise en œuvre de son traitement. L'incidence de la crise HMA est estimée entre 1/10 000 à 1/250 000 individus recevant une anesthésie générale (1). La prévalence de la crise HMA est difficile à évaluer, mais sur la base de la mention de crise d'HM dans les dossiers de patients anesthésiés aux États-Unis, des études successives ont conduit à une estimation de prévalence à 1/100 000. (2)(3). Elle survient chez des individus prédisposés génétiquement pendant l'exposition à des facteurs déclenchants : les agents volatils halogénés associés ou non à un curare dépolarisant tel que la succinylcholine ou suxaméthonium (Célocurine®). Tous les agents anesthésiques volatils inhalés comme l'halothane et actuellement le desflurane, le sévoflurane ou l'isoflurane sont susceptibles de déclencher une crise HMA. (4)(5)

Sur l'observation de larges études familiales, Denborough suggère en 1962 que la sensibilité à l'hyperthermie maligne est d'origine génétique et qu'elle se transmet sur le mode autosomique dominant mais à pénétrance incomplète (6). Quelques années plus tard, Britt émet l'hypothèse que le défaut moléculaire concerne le muscle squelettique par le phénomène de rigidité observée chez les patients pendant la crise HMA.(7)

L'HMA est une myopathie pharmacogénétique de transmission autosomique dominante liée à des mutations dans les gènes RYR1 et CACNA1S principalement, entrainant une anomalie de l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique. Le gène RYR1 localisé chez l'Homme sur le chromosome 19q13.2, code pour le canal calcique RYR1 exprimé à la membrane du réticulum sarcoplasmique permettant le relâchement massif de calcium dans le cytoplasme nécessaire à la contraction musculaire. Les mutations responsables d'HM entrainent une diminution du seuil d'activation de L'ouverture du canal RyR1 par ses différents agonistes, provoquant une hypersensibilité du canal. Les agents halogénés potentialisent cette hypersensibilité ce qui provoque la libération massive de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique générant une contraction musculaire permanente (4) (8) (9)

La crise HMA est secondaire à une dérégulation du couple excitation-contraction, au sein de la fibre musculaire striée squelettique entraînant un relargage massif du calcium contenu dans le Réticulum Sarcoplasmique (RS) générant une contraction musculaire permanente par ouverture anormale en présence d'un agent anesthésique halogéné et/ou d'un curare

dépolarisant. L'activité musculaire devient continue et intense qui entraîne un dégagement de chaleur pouvant aller jusqu'à l'hyperthermie. (10) L'hypermétabolisme musculaire très intense est responsable d'une souffrance puis d'une lyse des cellules musculaires. On observe alors rapidement une augmentation du taux sanguin des produits de cette lyse musculaire avec une hyperkaliémie, une myoglobinémie et myoglobinurie, puis une augmentation des CPK (Créatine Phosphokinase) entre 12 et 24 heures après le début de la crise.

Il existe une grande variété de présentations cliniques. Les signes les plus précoces sont l'hypercapnie, la tachycardie sinusale, le spasme des masséters et seulement après l'hyperthermie. (11) Mais elle doit être évoquée devant toute association de signes d'hypermétabolisme, au décours d'une anesthésie générale avec utilisation d'agents halogénés et/ou de curares dépolarisants. (1)(5)(12)(13)(10) En l'absence d'arrêt de l'exposition aux halogénés et de traitement réanimatoire, cela conduira à l'épuisement du métabolisme aérobie, l'utilisation du métabolisme anaérobie avec production de lactates et à l'apparition d'une acidose mixte. La crise évolue ensuite vers un syndrome de défaillance multi-viscérale fatal. (1) Dès les premiers signes d'alerte, il est impératif d'arrêter immédiatement l'administration de tout agent déclenchant et d'administrer rapidement du dantrolène, actuellement le seul traitement pharmacologique efficace pour traiter une crise d'HM. (12). Le délai entre l'apparition des premiers signes et l'induction anesthésique peut être très variable, de quelques minutes à plusieurs heures. La crise d'HM représente une urgence vitale.

L'efficacité de la prise en charge de la crise HM repose en grande partie sur l'identification précoce des signes de crise HMA et la rapidité de mise en œuvre des mesures curatives. Même si la mortalité a grandement diminué depuis les années 1970, elle reste encore élevée puisqu'elle atteint 10% dans des publications récentes nord-américaines. (14) ; 5% en Grande Bretagne et en France. Il n'en demeure pas moins essentiel de pouvoir identifier les individus sensibles HM ou à risque afin de prévenir la survenue d'une crise HMA et de proposer un dépistage pour leurs apparentés. Le diagnostic de la sensibilité HM peut être réalisé selon deux méthodes : soit par les IVCT (In Vitro Contracture Test) encore appelés tests halothane-caféine sur biopsie musculaire, soit par biologie moléculaire. Depuis plus de 30 ans, les IVCT sont la méthode de diagnostic de référence de la sensibilité à l'hyperthermie maligne (MHS).

Ils ont été inventés par les Anglais ELLIS et BRITT et introduits en Europe par l'EMHG (European Malignant Hyperthermia Group) dans les années 1980 (15). Chez un proband (ou propositus), avant 2008, il était recommandé de réaliser les tests de contracture in vitro sur muscle frais en première intention pour déterminer la susceptibilité à l'HM (15). Aujourd'hui, sa pratique n'est plus recommandée en première intention, mais ils demeurent l'examen de référence du diagnostic de sensibilité à l'HM (16). Le prélèvement musculaire se réalise chirurgicalement au niveau du vaste externe de la cuisse sous anesthésie locorégionale au bloc opératoire au cours d'une hospitalisation au CHU de Lille. Les IVCT par biopsie musculaire selon les recommandations de l'EMHG sont une technique invasive chirurgicale et requièrent des compétences de technique de laboratoire sur muscle frais. La taille du prélèvement est d'environ un centimètre de diamètre et a une longueur de deux centimètres. La biopsie musculaire est potentiellement pourvoyeuse de complications locales au site opératoire. Le principe des IVCT est d'exposer des faisceaux musculaires, à des concentrations croissantes des deux agonistes du récepteur RyR1 : l'halothane et la caféine et de mesurer la force de contraction du muscle exposé. La sensibilité de ce test est excellente (99%), avec une spécificité de 94%, responsable d'environ 6% de faux-positifs. (15) Les IVCT sont un excellent test diagnostic de la sensibilité HM.

Depuis environ 2008, selon les recommandations de l'European Malignant Hyperthermia Group et de MHAUS, l'association américaine, il est dorénavant recommandé de procéder en première intention au dépistage génétique à la recherche de mutations reconnues comme pathogènes par l'EMHG dans les gènes RYR1 principalement et CACNA1S (15) (17). Le diagnostic génétique est relativement accessible, facilement réalisable par un prélèvement sanguin avec recueil d'un consentement au cours d'une consultation génétique. Celui-ci est moins coûteux et moins invasif que les IVCT.

La prévalence de la prédisposition génétique conférant une sensibilité à l'HM est également difficile à évaluer. Il a été évoqué une prévalence allant de 1/8500 à 1/3000 individus. (18)(16)(19)

Le gène RYR1 est impliqué dans environ 50 à 70% des cas des crises HMA. La répartition géographique des mutations est variable : en France, la mutation p. Arg614Cys, découverte en 1991 (20) est la plus fréquemment retrouvée. (21)

La catégorisation des mutations dans le gène RYR1 réalisée jusqu'en 2017 par le séquençage

partiel du gène, encore appelé méthode Sanger, à la recherche de mutations HM uniquement dans les points chauds de mutation des gènes RYR 1 et CACNA1S, est aujourd'hui remise en cause suite à l'identification par séquençage haut-débit de l'ensemble de ces gènes, de nombreuses variations ou variants (22). Chez les patients dont la sensibilité à l'HM est avérée par un test de contracture in vitro positif, on identifie un taux de mutation pathogène variant entre 12% et 60% selon les études et les techniques de séquençage. (23).
Aujourd'hui, plus de 200 variants sur le gène RYR1 ont été associés à des cas d'HMA mais seules 48 mutations sont actuellement reconnues comme pathogènes par le Groupe Européen de l'Hyperthermie Maligne (EMHG) et peuvent être utilisées pour établir un diagnostic chez le cas index et proposer un dépistage chez les apparentés (www.EMHG.org)

La pathogénicité des variants est aujourd'hui dictée par des recommandations internationales (24) (25) et définie en cinq classes établies par l'ACMG : bénin/probablement bénin/signification inconnue/probablement pathogène/pathogène. Afin d'établir la pathogénicité d'un variant HM, l'EMHG a défini ses propres critères (15) et en l'absence de validation réalisée selon les recommandations de l'EMHG, les variants identifiés dans l'HM ne peuvent pas être utilisés à titre diagnostique. Le gène CACNA1S, quant à lui, code une des sous-unités (sous-unité α1s) du récepteur des dihydropyridines (DHPR) responsable de l'activation de RyR1. Il est plus rarement impliqué dans l'HM et seuls deux variants sont reconnus comme pathogènes par l'EMHG. (www.EMHG.org).

Actuellement, 48 mutations sont validées HM dans le gène RYR1 et 2 dans le gène CaCna1S et permettent de confirmer le diagnostic de la sensibilité HMA. Environ 40 autres mutations sont considérées comme hautement probables pathogènes sans nécessité de réaliser des IVCT chez le proband. Une mutation HM validée est retrouvée dans environ 50 à 60% des patients classés sensibles par IVCT. En cas d'absence de mutation retrouvée chez le proband ou cas index, celui-ci doit réaliser des IVCT pour confirmer ou infirmer le statut de sensibilité HM. Si une mutation HM est retrouvée chez le proband, il n'y a pas lieu de réaliser les IVCT pour confirmer la sensibilité et la mutation familiale peut être recherchée chez les apparentés. En cas d'absence de la mutation familiale, le risque de la sensibilité HM chez l'apparenté est celui de la population générale et ne nécessite pas d'IVCT.

Les outils diagnostiques disponibles aujourd'hui (IVCT, dépistage génétique) sont essentiels afin d'identifier les individus à risque et mettre en place des mesures de prévention. Le centre lillois a été ouvert en 1977. Il compte plus de 450 familles HM en France et de pays frontaliers. En utilisant la cohorte lilloise présentant une sensibilité HM ou ayant dans leur famille un membre présentant une sensibilité HM, notre objectif principal était d'étudier l'évolution de la méthode diagnostique de la sensibilité HM en fonction du temps. Notre objectif secondaire était d'évaluer l'apport qualitatif de la biologie moléculaire par rapport aux IVCT dans le diagnostic de la sensibilité HM, chez les probands et leurs apparentés.

Matériel et méthode

1/ Design de l'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective observationnelle descriptive à partir de la base de données de l'unité de diagnostic et de recherche de l'hyperthermie maligne, pôle d'Anesthésie-Réanimation et du Centre des maladies rares neuromusculaires du CHU de Lille.

La base de données du centre HM recense tous les patients fortement suspects d'avoir présenté une crise HM. Elle recense également tous les patients ayant présenté une hyperthermie d'effort ou une rhabdomyolyse post-anesthésique ou d'effort, une élévation chronique des CPK, ou une myopathie à risque HM.

Tous les patients ont été intégrés dans la base de données après avis médical du centre référent HM : soit par une forte probabilité de sensibilité HM sur l'expertise des données cliniques et biologiques, soit par un statut HM avéré par des investigations diagnostiques.

Le centre HM de Lille est le plus actif des trois centres français en nombre de patients et de familles HM suivis. Il est le seul à réaliser l'ensemble des missions HM : le conseil pré-anesthésique, le conseil HM, le diagnostic par tests halothane caféine par biopsie musculaire et le prélèvement génétique.

2/ Définition du Proband

En génétique, le proband, ou encore appelé propositus, est le sujet qui attire le premier l'attention dans une généalogie sur un caractère donné ou d'une maladie. Il permet d'initier l'analyse génétique familiale. Si le propositus est atteint, on peut alors parler de cas index.

Dans cette étude, un proband est donc un patient suspect d'une crise d'hyperthermie maligne. Dans ce cas, un avis était pris auprès du référent HM lillois qui décidait, en fonction de l'anamnèse, de la poursuite des investigations ou non.

3/ Définition d'un apparenté

Un apparenté est un patient possédant au moins un ascendant commun avec le proband. La proximité de parenté s'établit par le nombre de générations ; chaque génération s'appelle un degré.

Tous les apparentés pour un même proband ont été inclus, quel que soit leur degré de parenté. L'ensemble formé par le proband et ses apparentés constitue la famille génétique.

4/ Critères d'inclusion et de non-inclusion

Les patients inclus dans la cohorte devaient être fortement suspects de la survenue d'une crise d'hyperthermie maligne après une anesthésie générale ou une sédation avec des agents déclenchants (agents halogénés et/ou Succinylcholine) entre 1951 et 2022.

L'inclusion des probands était réalisée en fonction de l'anamnèse clinicobiologique par le référent HM du centre lillois. Les patients suspects d'hyperthermie maligne d'effort, de rhabdomyolyse d'effort, les patients atteints de myopathie, d'élévation chronique des CPK ont été exclus.

5/ Période d'inclusion : 1951 - 2022

Les probands dont la date de crise est dès 1951 ont été inclus. L'utilisation des halogénés en anesthésie a débuté à la fin des années 1950 avec l'halothane.

6/ Test de contracture in vitro

Les tests IVCT ont été mis en place dans les années 1990 au CHU de Lille. Ils sont pratiqués selon le protocole établi par l'EMHG afin de déterminer la susceptibilité des patients à l'hyperthermie maligne.

Les tests sont considérés positifs lorsque la contraction du muscle testé est équivalente ou supérieure à 0,2 g pour 2% d'halothane et/ou 2 mM de caféine. Selon la réponse obtenue, les patients sont classés comme MH non sensibles (MHN) en l'absence de contracture du muscle, MH sensibles (MHS) en cas de contracture en réponse à l'halothane et à la caféine, ou MH sensibles à halothane (MHSh) ou à la caféine (MHSc) en cas de contracture à un seul des stimuli.

Les probands et les apparentés ayant une réponse anormale à un seul des stimuli (halothane ou caféine) ont été considérés comme étant MH sensibles, au même titre que ceux ayant une réponse anormale aux deux stimuli.

7/ Biologie moléculaire

Lorsqu'une mutation validée HM est retrouvée (www.EMHG.org), le statut HMS est confirmé et équivaut aux tests de contracture.

Chez un proband, l'absence de mutation reconnue HM ou la présence d'un variant de pathogénicité inconnue n'exclut pas le diagnostic et nécessite la poursuite des investigations par la réalisation d'un IVCT qui infirme ou confirme le statut HM définitif.

Les probands pour lesquels la génétique n'a pas identifié de variant pathogène et le test de confirmation par IVCT n'a pu être réalisé, sont considérés comme HM jusqu'à preuve du contraire en attente d'investigations.

Chez les apparentés, un diagnostic présymptomatique peut être réalisé par la recherche ciblée lorsqu'une mutation familiale est identifiée chez le proband.

Les apparentés chez lesquels la mutation familiale a été retrouvée, ont été classés comme étant sensibles à l'HM. Les apparentés pour lesquels la mutation familiale n'a pas été retrouvée ont été classés comme présentant un risque HM similaire à celui de la population générale et il n'y a pas lieu de poursuivre les investigations HM par des IVCT.

Les apparentés de probands HMS par IVCT sans mutation retrouvée ou avec présence d'un variant de pathogénicité inconnue doivent bénéficier d'IVCT afin de confirmer ou d'infirmer de manière définitive la sensibilité HM.

La recherche d'une mutation dans les gènes RYR1 et CACNa1s prend sur le plan technique quatre mois.

8/ Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SAS, version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) par l'Unité de Biostatistiques du CHU de Lille.

Les données qualitatives sont présentées en effectif et en pourcentage. Les données quantitatives sont exprimées par la moyenne et l'écart-type et/ou la médiane et l'intervalle interquartile. La normalité des paramètres numériques a été vérifiée graphiquement et par le test du Shapiro-Wilk.

Pour comparer les résultats de la biologie moléculaire aux résultats de l'IVCT (gold standard), nous avons calculé la sensibilité et la spécificité des tests, dans chacune des populations étudiées (probands, parentés, les deux populations).

Le seuil de significativité retenu est fixé à 5%.

9/ Cadre réglementaire

Toutes les données utilisées pour cette étude proviennent d'un enregistrement anonymisé reconnu par la CNIL (Commission nationale de l'informatique et des libertés) dans la base de données de l'unité HM de LILLE.

Tous les patients appartiennent à la base de données qui comprend tous les probands ou cas index et leurs apparentés. Le consentement éclairé écrit a été obtenu de tous les sujets de la base de données.

Résultats

La base de données lilloise regroupe 1313 patients **(Figure 1)** inclus entre 1951 et 2022. Tous les patients ayant présenté une crise ou suspicion de crise HM de l'anesthésie ont été inclus. Les membres de leur famille testés par IVCT, par biologie moléculaire ou en attente de tests ont également été inclus, quel que soit leur degré de parenté.

182 patients de la base de données présentant une myopathie, une hyperthermie d'effort, une rhabdomyolyse d'effort ou une élévation chronique des CPK ou des données manquantes ont été exclus.

Au total, 363 probands de l'anesthésie et 768 apparentés ont été inclus dans l'analyse descriptive.

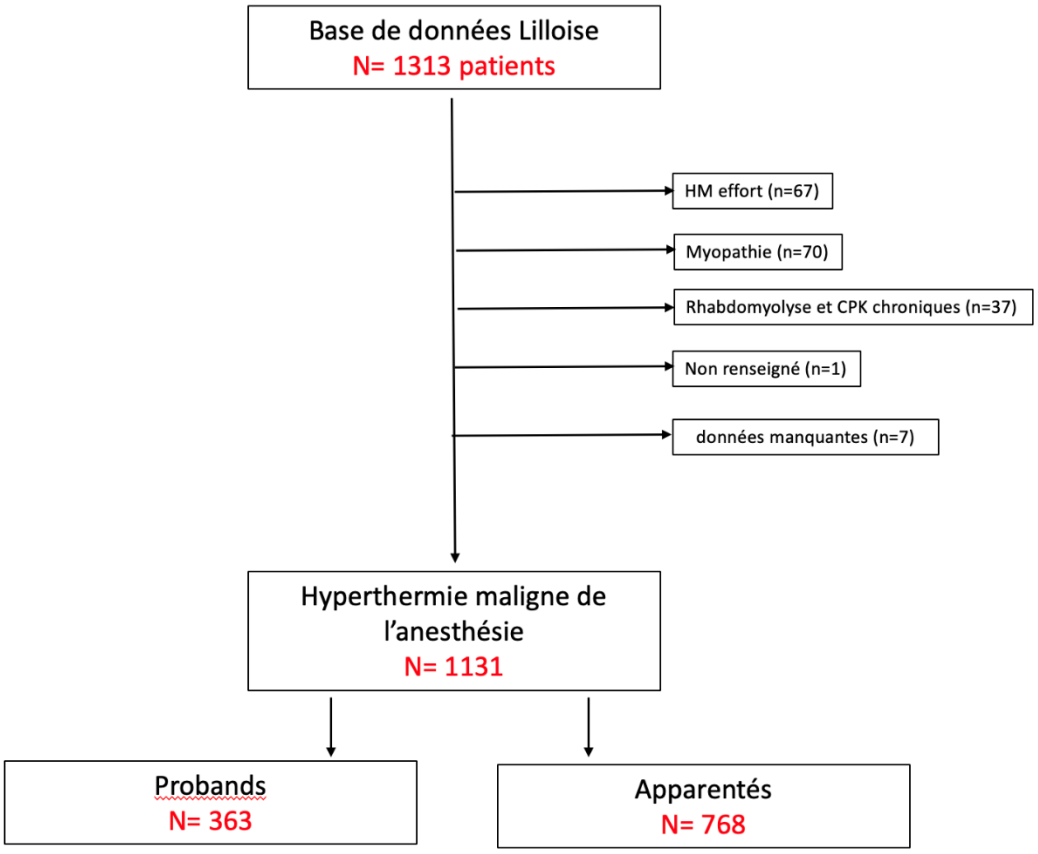


Figure 1. Flow chart

A/ Caractéristiques des probands

1/ Âge

Au total, 363 probands ont été étudiés.

La moyenne d'âge de la crise HM était de 23 ans. Le plus jeune proband avait moins d'un an et le plus âgé avait 84 ans. 50% des probands avaient moins de 18 ans au moment de la crise HM.

La moyenne d'âge du diagnostic par IVCT était de 27 ans. Le plus jeune proband à avoir bénéficié d'IVCT avait deux ans, le plus âgé, 82 ans. 50% des probands réalisaient un IVCT avant 24 ans.

La moyenne d'âge du diagnostic par génétique était de 32 ans. Le plus jeune proband à avoir bénéficié d'un test génétique avait moins d'un an, le plus âgé, 84 ans. 50 % des probands ont réalisé un test génétique avant 32 ans.

2/ Sexe

Le sexe ratio était de 64% d'hommes (N = 230/360) et 36% de femmes (N = 130/360).

3/ Survie

Parmi les probands, 15% (N = 54/362) sont décédés de la survenue d'une crise d'HM liée à l'anesthésie. Dans le cas des probands décédés au décours de la crise, le diagnostic a été réalisé par le biais des apparentés.

4/ Diagnostic par IVCT

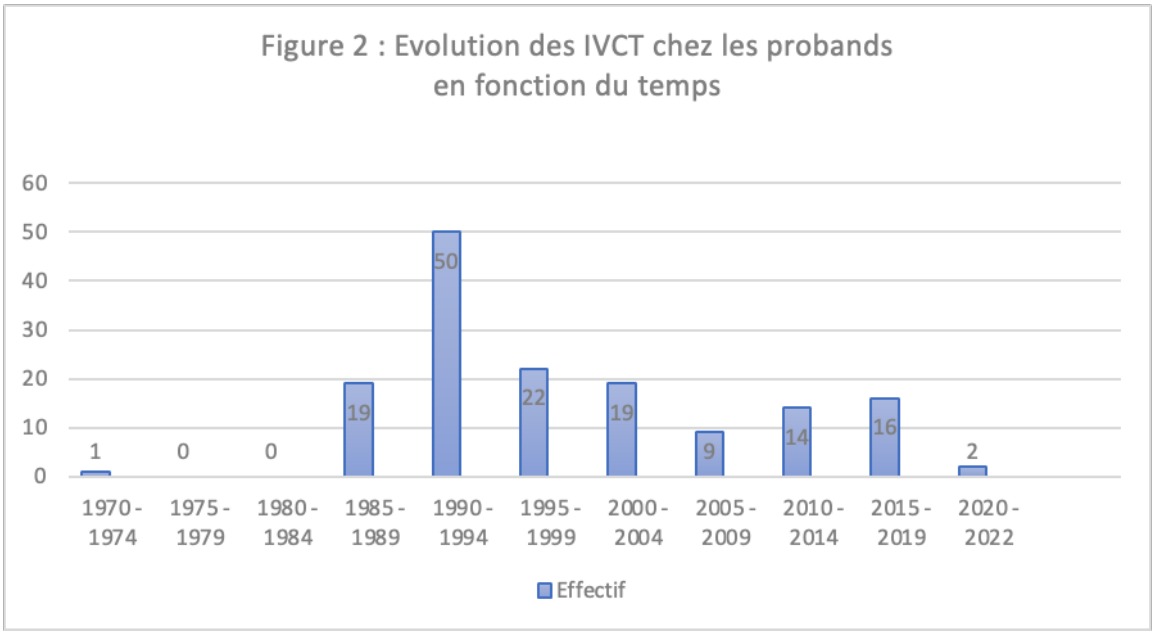
a/ Résultats sur l'ensemble de la période d'inclusion : 1951-2022 :

Au total, 42,5% (N= 154/362) des probands ont bénéficié d'IVCT. Parmi ceux-ci, 49,4% (N =76/154) des IVCT sont revenus positifs et ont permis de classer ces probands comme sensibles à l'HM. 50,6% (N= 78/154) des IVCT étaient normaux et ont permis de les classer comme étant non sensibles à l'HM. Chez 25% des probands (N=93/362), les IVCT sont en attente et ceux-ci sont considérés à risque HM.

b/ Résultats avant 2008 : IVCT en première intention :

Avant 2008, selon les recommandations de l'époque, le diagnostic de sensibilité était réalisé exclusivement par les IVCT en première intention, pour 116 probands. 49,1% (N = 57/116) ont des IVCT normaux et 50,9% (N= 59/116) ont un IVCT positif donc sensibles à l'HM.

Chez les probands dont le résultat des IVCT étaient positifs, la biologie moléculaire était réalisée dans un deuxième temps. Le séquençage de l'ensemble des gènes impliqués dans la sensibilité à l'HM a été réalisée chez 45 patients sensibles HM par IVCT. Une mutation a été retrouvée dans 42,2% (N = 19/45), dont 16 mutations causales dans le gène RYR1 et 3 variants de pathogénicité inconnue. Il n'y a pas de mutation retrouvée dans 57,8% (N = 26/45) des cas. Nous n'avons pas de résultats dans 14 cas.



La **Figure 2** représente la répartition du nombre d'IVCT réalisé chez les probands, en fonction du temps et par intervalle de 5 ans. Environ 50% des IVCT ont été réalisés entre 1990 et 1999 avec un maximum entre 1990 et 1994. Après cette date, le nombre de réalisation diminue pour atteindre un minimum lors de l'essor de la génétique entre 2005 et 2010.

5/ Diagnostic par biologie moléculaire

a/ Résultats sur l'ensemble de la période d'inclusion : 1951-2022

La biologie moléculaire à la recherche de l'ensemble des mutations causales a été réalisée chez 40,2% (N = 145/361) des probands. Parmi ces 40,2%, une mutation validée HM a été retrouvée dans seulement 37% (N = 54/145) des cas et a permis de classer ces probands comme sensibles à l'HM par la mutation retrouvée.

b/ Résultats après 2008 : génétique en première intention

Avant 2008, le bilan génétique était réalisé après les IVCT ; il n'était pas réalisé quand les tests IVCT étaient négatifs.

Après 2008, le bilan génétique était réalisé en première intention, ce qui représente un effectif de 68 probands. Une mutation a été retrouvée dans 33,8% (N = 23/68) des cas. Il n'a pas été retrouvé de mutation HM dans 60,3% (N= 41/68) des cas ; dans 4 cas en attente du résultat génétique.

La répartition des mutations retrouvées était la suivante : 52,2% (N = 12/23) de mutations sur le gène RYR1, 43,5% (N=10/23) de variants de pathogénicité inconnue, 4,3% (N= 1/23) de mutations sur le gène CACNA1S.

Chez les probands dont le bilan génétique ne retrouvait aucune mutation, des IVCT ont été réalisés en deuxième intention dans 34,2% (N = 14/41) des cas ; pas d'IVCT réalisé dans 26,8% (N = 11/41) des cas ; IVCT en attente dans 39% (N=16/41) des cas.

Les IVCT étaient positifs dans 21,4% (N=3/14) des cas et ont permis de classer les patients HMS. Ils étaient négatifs dans 78,6% (N = 11/14) des cas infirmant la sensibilité HM.

6/ Statut HM final

Parmi les probands, 21,3% (N = 77/361) ont été classés non sensibles à l'HM lorsque les IVCT étaient négatifs. Dans ce cas, l'enquête familiale est arrêtée.

Dans 53,3% (N = 193/361), les IVCT étaient positifs ou le test génétique retrouvant une mutation causale ont permis de les classer comme sensibles à l'HM. 25% (N = 92/361) restent en attente de diagnostic car les IVCT n'ont pas encore pu être réalisés (période de pandémie à COVID-19).

B/ Caractéristiques des apparentés

Au total, 768 apparentés ont été étudiés. Le nombre moyen d'apparentés par probands est de deux, allant de 0 soit aucun apparenté testé jusqu'à 31 membres d'une même famille testés.

1/ Age

La moyenne d'âge du diagnostic par IVCT était de 35 ans. Le plus jeune apparenté à avoir bénéficié d'IVCT avait moins d'un an, le plus âgé 82 ans. 50% des apparentés réalisaient les IVCT avant 34 ans.

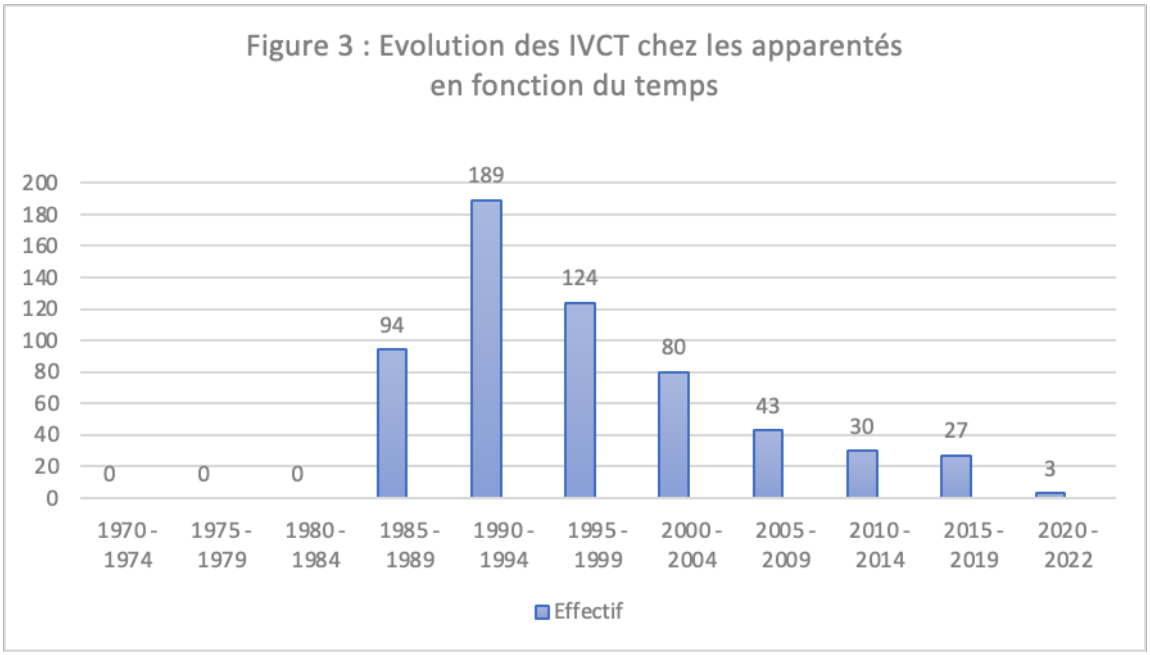
La moyenne d'âge du diagnostic par génétique était de 39 ans. Le plus jeune apparenté à avoir bénéficié d'un test génétique avait moins d'un an, le plus âgé 92 ans. 50 % des apparentés réalisaient un test génétique avant 37 ans.

2/ Sexe

Chez les apparentés, le sexe ratio est de 51,8% (N = 398/768) de femmes et 48,2% (N = 370/768) d'hommes.

3/ Diagnostic par IVCT

78,8% (N = 604/767) des apparentés ont bénéficié d'IVCT. Parmi ceux-ci, 43,3% (261/603) sont revenus positifs permettant de classer ces apparentés comme étant HMS de façon définitive.



Dans la **Figure 3**, la répartition du nombre d'IVCT est représentée fonction du temps, chez les apparentés et par intervalle de cinq ans. Comme chez les probands, environ 50% des IVCT ont été réalisés entre 1990 et 1999 avec un maximum entre 1990 et 1994 puis leur nombre ne

cesse de diminuer par la suite. La pandémie covid 19 et la restriction du nombre d'IVCT imposé par le service de chirurgie ont freiné le nombre d'IVCT limité à 12 par an.

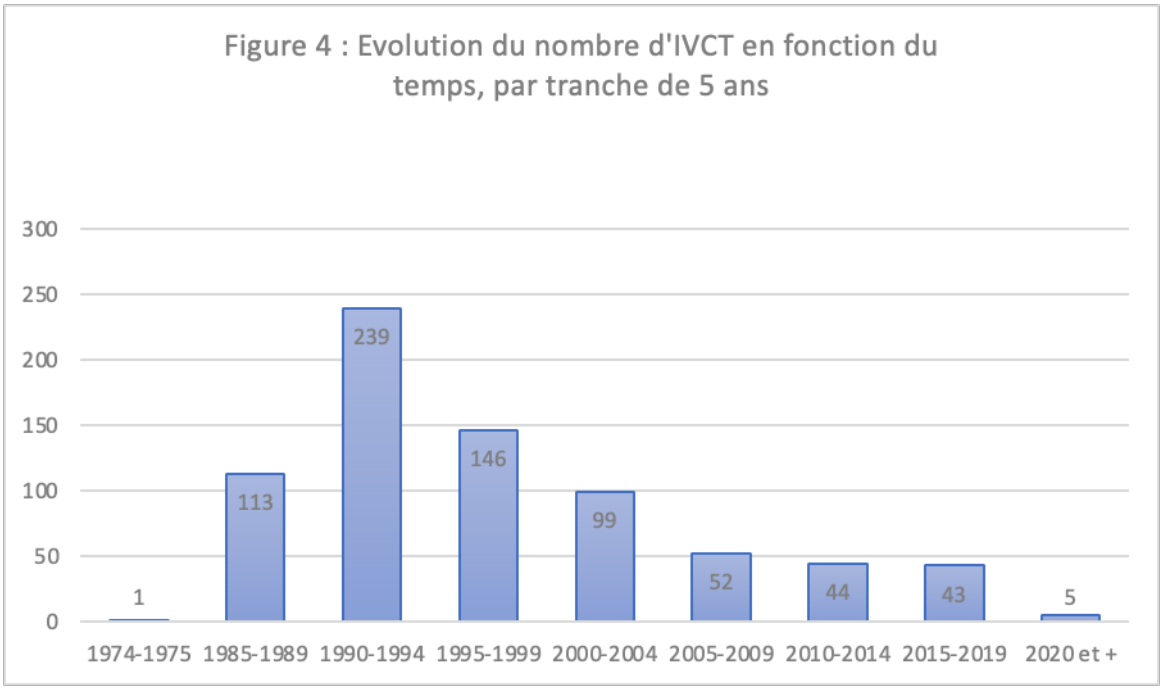
4/ Diagnostic par biologie moléculaire

Par opposition aux probands chez lesquels l'ensemble des mutations HM causales est recherché par séquençage des gènes impliqués dans la sensibilité à l'HM, seule la mutation familiale retrouvée chez le proband est recherchée chez les apparentés d'une même famille. La génétique a été demandée chez 47,1% (N = 361/767) des apparentés. Parmi ceux-ci, la biologie moléculaire a permis de détecter la mutation familiale dans 46,9% (N = 167/356) des cas soit environ un cas sur deux.

C) Évolution de la méthode de diagnostique au cours du temps et apport qualitatif de la génétique

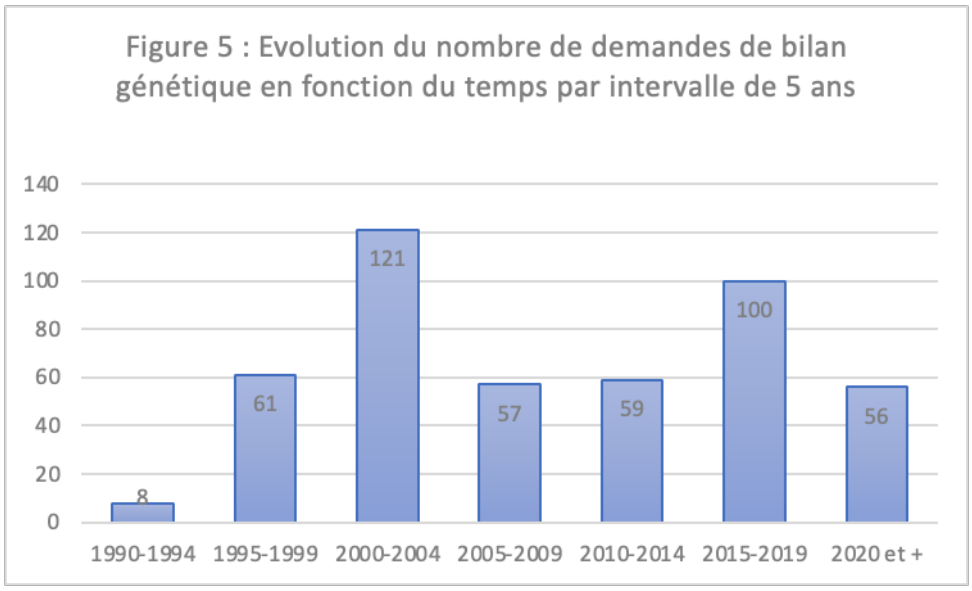
1/ Evolution de la méthode diagnostique

Cette évolution a été étudiée sur l'ensemble de la population des probands et de leurs apparentés.

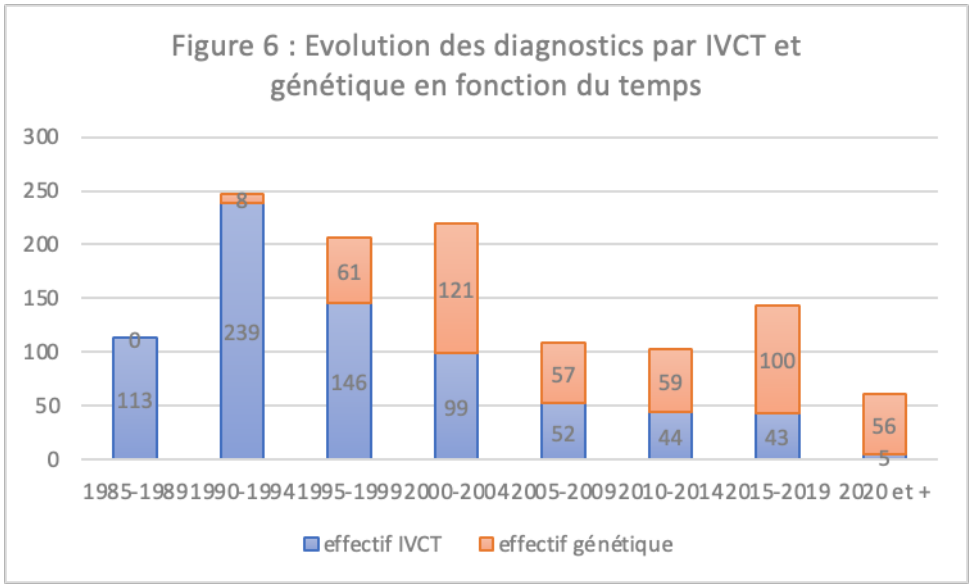


Dans la **Figure 4**, la répartition du nombre d'IVCT est représentée fonction du temps, sur l'ensemble de la population incluse et par intervalle de cinq ans

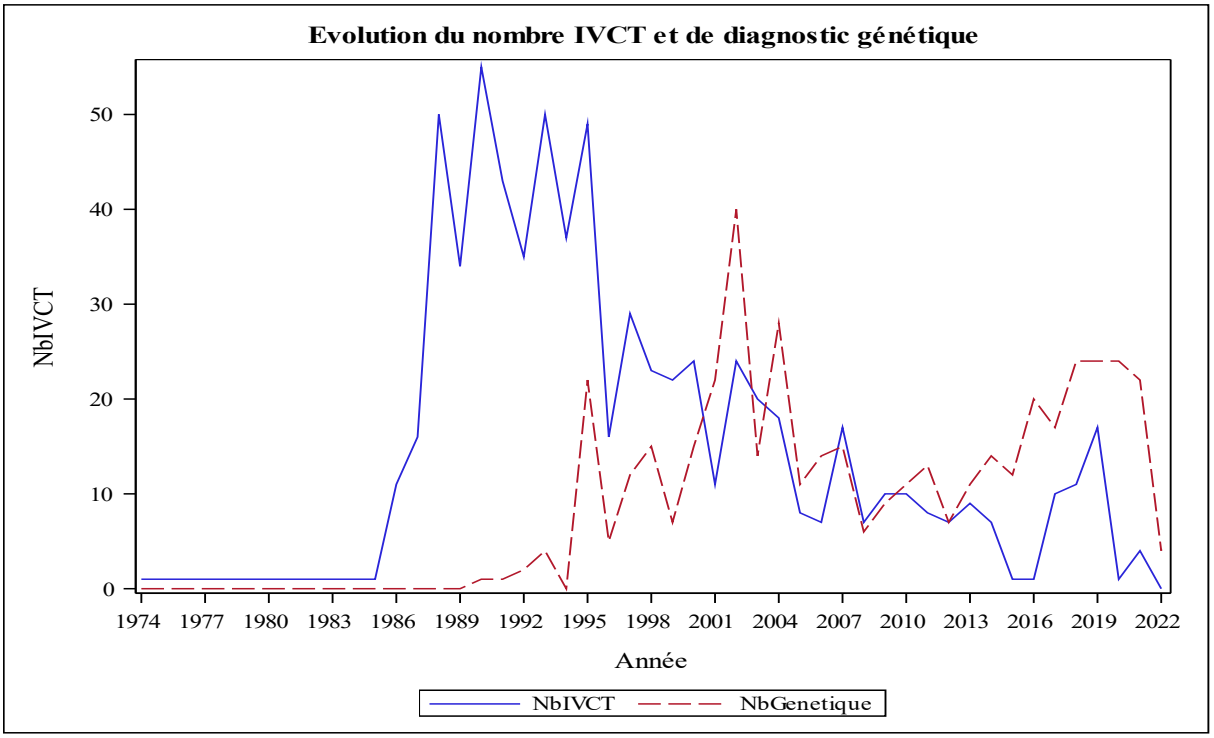
Plus de 50% des IVCT ont été réalisés entre les années 1990 et 2000, avec un maximum de 239 IVCT entre 1990 et 1995. Après 2005, ce nombre diminue nettement pour atteindre environ 40 IVCT par an.



Sur le plan de la génétique, on constate dans la **Figure 5** son essor au début des années 2000. Le recours à la génétique diminue par la suite et semble se stabiliser dans les années 2020.



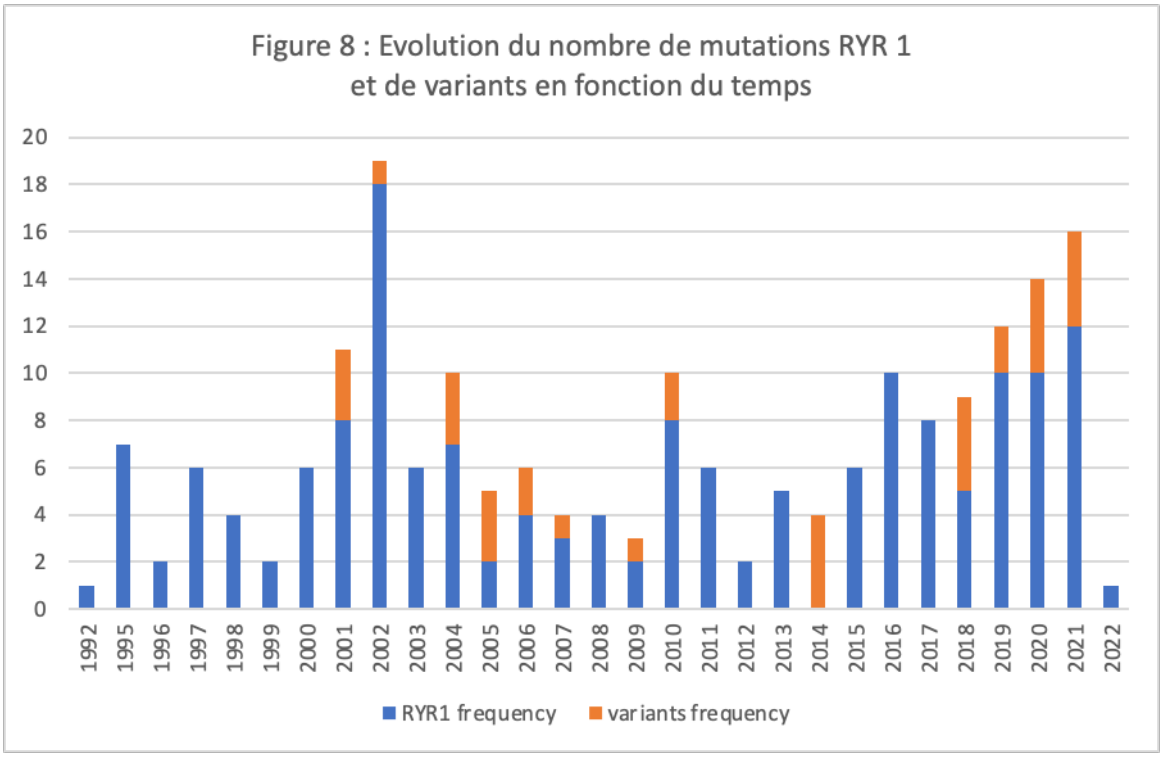
La **Figure 6** montre l'évolution combinée des 2 méthodes diagnostiques en fonction du temps. Le nombre de diagnostics réalisés par bilan génétique devient supérieur à ceux réalisés par IVCT dès le début des années 2000.



En 2008, les recommandations européennes et américaines ont préconisé la réalisation de la biologie moléculaire en première intention par son caractère moins invasif entrainant le déclin du nombre de diagnostic par IVCT comme le montre la **Figure 7**.

La pandémie de COVID-19 a considérablement ralenti le diagnostic d'HM dans notre centre et le nombre imposé par les chirurgiens, expliquant les 26% de probands en attente d'IVCT.

2/ Évolution du type de mutation retrouvé



La **Figure 8** représente l'évolution en fonction du temps de la proportion de variants, c'est-à-dire des mutations en attente de validation, par rapport aux mutations HM validées. La recherche en biologie moléculaire est en constante progression. Seules 16 mutations étaient connues et recherchées en 1998, 27 en 2007, 34 en 2015 et 48 en 2022 sur le gène RYR1.

Ces cinq dernières années, de nombreux variants RYR1 ou CACNA1s sont découverts et sont en attente de validation. Dans l'ensemble de la population, 16% (N= 35/217) de variants ont été retrouvés et 84% (N = 181/217) de mutations sur le gène RYR1.

3/ Tableau de contingence

Par souci d'effectif, le tableau de contingence est calculé sur l'ensemble de la population ayant bénéficié des deux tests diagnostiques : IVCT et test génétique. Un sujet est considéré comme atteint si les IVCT sont revenus positifs et non atteint si les IVCT sont revenus négatifs.

Le test à l'étude (test génétique) est considéré comme positif si une mutation est retrouvée (RYR 1 ou variant de pathogénicité inconnue).

	Malades	Sains	
Test +	N = 106 41%	N = 2 0,78%	**VPP = 98%**
Test -	N = 83 32%	N = 65 25%	**VPN = 43%**
	Se = 56%	**Sp = 97%**	

La probabilité d'avoir un test génétique positif en étant réellement prédisposé à la crise HM est de 56%. Sa valeur prédictive négative est également basse signifiant que la probabilité de ne pas être atteint en ayant un test génétique négatif est de seulement 43%. Par conséquent, le diagnostic par biologie moléculaire a une sensibilité très faible pour le diagnostic de sensibilité à l'hyperthermie maligne et ne permet en aucun cas d'éliminer le diagnostic s'il est négatif. Il a en revanche une spécificité et une valeur prédictive positive élevées, respectivement 97 et 98%. Ce test n'a donc de valeur que s'il est positif, à corréler à l'anamnèse et aux données clinicobiologiques.

Discussion

Le centre lillois de diagnostic et de recherche de l'hyperthermie maligne est le principal centre de référence sur l'hyperthermie maligne en France. Il met à disposition toutes les missions HM : conseil anesthésique et HM, diagnostic par IVCT et prélèvement génétique. Il regroupe aussi le plus grand nombre de patients et familles provenant dans l'ensemble de la France et aussi de pays frontaliers. Ces données sont répertoriées dans une base de données de 1951 à 2022, soit une période de 71 ans.

La méthode de diagnostic de la sensibilité de l'hyperthermie maligne a beaucoup évolué au cours du temps : IVCT seuls, test génétique seul ou les deux tests. Les IVCT ont été mis en place dans les années 1980 pour dépister la sensibilité à l'HM (15). Les IVCT étaient le test diagnostique réalisé en première intention, puis avec les progrès de la biologie moléculaire, le test génétique est devenu le test réalisé en première intention après 2008. Les IVCT restent néanmoins le test diagnostique de référence de la sensibilité à l'HM par son excellente sensibilité (99%), mais avec 6% de faux-positifs (26)(15). Les IVCT sont notamment souvent positifs chez les patients avec des pathologies musculaires ou atteints de myopathie à cores centraux (1) chez lesquels ce test n'est d'ailleurs plus recommandé en raison notamment de discordances observées entre le phénotype myopathique et le résultat des IVCT (12). En France, deux centres réalisent ces tests, mais seul le centre HM de Lille est reconnu par le Groupe Européen d'Hyperthermie Maligne (EMHG). Les IVCT sont réalisés par la technique du lambeau musculaire selon les recommandations de l'EMHG. La biopsie musculaire, est prélevée chirurgicalement sous anesthésie locorégionale. Les tests nécessitent un matériel musculaire important limitant le diagnostic chez les enfants et requièrent des compétences de techniques de type laboratoire. Il y a dorénavant de moins en moins de centres en Europe réalisant les IVCT en raison du coût, de la technicité spécifique de ces tests sur muscle frais et le caractère invasif de la biopsie musculaire.

Le diagnostic par biologie moléculaire est plus accessible par un simple prélèvement sanguin pouvant être réalisé dans un centre de conseil génétique et de moindre coût financier. Sur le plan de la biologie moléculaire, la méthode diagnostique varie selon la population étudiée : chez les probands suspects de crise HM, l'ensemble des mutations causales est recherché alors que chez les apparentés, seule la mutation familiale est recherchée.

En France, la présence d'une mutation en faveur de l'hyperthermie maligne est estimée entre 1 sur 3000 à 8500 individus représentant un risque génétique élevé (19). Cependant, au fur et à mesure que les connaissances progressent sur la génétique de la sensibilité HM et que le nombre de mutations validées HM augmente, on constate un écart entre la prévalence des variations génétiques associées à un risque accru de sensibilité HM et l'incidence des évènements cliniques HMA. (27)(28) Des raisons génétiques et non génétiques expliquant la pénétrance incomplète de la sensibilité HM sont évoqués et restent du domaine de recherche actif : des facteurs environnementaux, un épisode infectieux préalable, un effort intense quelques jours avant une anesthésie, le type de mutation sur le canal calcique. (28) Mais les progrès techniques en biologie moléculaire permettent la découverte de nouveaux variants dans le gène RYR1 et CACNa1S dont la pathogénicité reste inconnue. Pour valider ces mutations, les IVCT associés à des études de liaison entre apparentés d'une même famille et entre familles différentes restent indispensables.
Dans notre cohorte, nous avons étudié l'évolution temporelle de la méthode diagnostique de la sensibilité HM et cherché à analyser l'apport qualitatif de la génétique par rapport aux IVCT chez 363 patients fortement suspects d'une crise HM, ainsi que leurs apparentés quel que soit le degré de filiation.

Certaines caractéristiques dans notre population des probands sont similaires aux autres études comme l'âge médian de survenue de la crise estimé à 18 ans, quel que soit le groupe ethnique, avec deux fois plus de suspicion de crises HM chez les hommes que chez les femmes (1).
Dans la cohorte lilloise, 54 probands sur 363 sont décédés au décours d'une crise HM. Ce taux de mortalité globale de 15% chez les probands est plus élevé que celui retrouvé dans des études précédentes, comme les 4% de mortalité retrouvés dans une étude en 2015. (29) Cela s'explique par la durée de notre période d'inclusion, s'étendant de 1951 à 2022. Dans les années 80-90, on observe environ 50% de mortalité, puis après les années 2000, une nette diminution de la mortalité en France comme dans les autres pays avec la survenue de crises HM aux tableaux cliniques plus frustres. (5). Dans notre cohorte, quatre décès sont survenus dans les deux dernières décennies dont pour deux d'entre eux le statut HM n'a pas été prouvé et représentent environ 5% de mortalité. Entre 1990 et 2000, l'obligation du capnographe, les formations professionnelles et la disponibilité légale du Dantrolène au sein du bloc opératoire

ont contribué largement à la diminution d'évènements HM graves et d'issues fatales. La mortalité en Grande Bretagne est estimée à 4% comme en France. (29) Aux États-Unis, la mortalité est passée de 80% à la fin des années 1980 à 1,4% début 2000 (30), mais certaines études plus récentes montrent une réascension de la mortalité à 9,5% (21) probablement par un accès aux diagnostics par IVCT ou la biologie moléculaire restreints.

Dans notre cohorte, certains probands ont bénéficié d'IVCT très jeunes (âge minimum : 2ans). Bien qu'il s'agisse d'une méthode diagnostique plus invasive, l'âge médian de réalisation des IVCT est inférieur à celui de réalisation du test génétique, respectivement 24 et 32 ans. De récentes recommandations du Royaume-Uni préconisent d'effectuer les IVCT chez des enfants d'au moins dix ans. Le centre HM de Lille réalise les tests IVCT à partir de la grande adolescence. Dans notre population, le test génétique a été réalisée pour de jeunes patients dès l'âge de trois mois. Lorsque la biologie moléculaire est réalisée en première intention sans retrouver de mutation causale chez les probands de très jeune âge, les IVCT sont proposés aux deux parents. (31) Bien que moins invasif, le diagnostic génétique s'effectue néanmoins dans notre population tardivement.

Avant 2008 chez les probands avec IVCT réalisé en première intention et positif, une mutation causale a été retrouvée dans un deuxième temps dans 42,2% (N = 19/45) des cas. On estime dans l'étude française conduite par Monnier en 2005 qu'une mutation HM est présente dans 50 à 60% des patients sensibles HM (21). Cette valeur est inférieure à la prévalence de 76% publiée plus récemment par Miller en Grande Bretagne. (17) Dans notre étude, parmi les mutations identifiées, 86% sont des mutations HM dans le gène RYR1 considérées comme pathogènes par l'EMHG, ce qui est bien plus important que la prévalence retrouvée par Miller (46%) (23), mais similaire à celle retrouvée dans une étude canadienne de 2011 (32). Les probands avec IVCT positifs réalisés dans les décennies 80-90 n'ont pas tous bénéficié de test génétique car perdus de vue. Cette mésestimation dans notre cohorte de la prévalence de l'ensemble des mutations causales peut s'expliquer par le nombre moindre de mutation HM identifiée chez les patients ayant un test de contracture in vitro partiellement positif à l'halothane (MHSh) ou à la caféine (MHSc) (appelés encore « tests équivoques halothane ou caféine »), par trop grande sensibilité de l'IVCT avec une évaluation de 6% de faux positifs (26). Ces patients sont néanmoins considérés HMS et les précautions HM en cas d'anesthésie

doivent être appliquées. On observe une fréquence de 14% de variants de pathogénicité inconnue. Avant 2008, la technique de séquençage de l'ADN utilisée était préférentiellement la méthode Sanger, séquençage des points chauds de mutation remplacée actuellement par le séquençage haut débit (NGS) de l'ensemble du gène RYR1.

Après 2008, le bilan génétique était réalisé en première intention chez 68 probands. Une mutation a été retrouvée dans 33,8% (N = 23/68) des cas dont 52,2% (N = 12/23) de mutations pathogènes sur le gène RYR 1, 43,5% (N=10/23) de variants de pathogénicité inconnue, 4,3% (N= 1/23) de mutations pathogènes sur le gène CACNA1S. Ce résultat est supérieur aux 20% de mutations retrouvées par N Monnier (21) chez des patients adressés pour suspicion clinique de crise HM. Après 2008 et en constante augmentation notamment depuis 2017, on note l'émergence sensible d'une proportion de variants de pathogénicité inconnue (***figure 9)***. Ces variants sans validation fonctionnelle in vitro par l'EHMG ne peuvent être utilisés pour le diagnostic des patients à risque et pour le dépistage de leurs apparentés : seul le test de contracture in vitro permet de poser le diagnostic de sensibilité à l'HM. Des crises cliniques plus frustres avec des signes précoces peu spécifiques : tachycardie, ascension de la FetC02 au cours de coelioscopie par exemple, les nouveaux agents halogénés notamment le sévoflurane moins déclenchant que l'halothane peuvent expliquer ce résultat (33). Cette constatation souligne l'importance de la définition clinique de la crise HM et de soumettre les cas cliniques aux centres experts HM pour une meilleure expertise des évènements anesthésiques et une meilleure discrimination des tests diagnostiques HM. Environ 25% des probands de notre cohorte restent en attente de leur statut HM final lié à la difficulté de réalisation des IVCT notamment en période de pandémie à COVID 19, et des vacations chirurgicales restreintes. D'autres facteurs peuvent être évoqués : le délai du résultat génétique de plusieurs mois, des patients testés par génétique sans avis préalable des centres HM experts, l'absence de réelle connaissance théorique de la sensibilité HM par les généticiens HM, deux seuls centres HM en France avec une estimation de la réalisation de trente à quarante tests IVCT par an sur le plan national français peut expliquer également le faible rendement diagnostique de la biologie moléculaire et la non progression du nombre de dépistage génétique. On constate également de manière moins scientifique un phénomène social avec éclatement des familles, dispersion géographique, moins de liens et contacts familiaux et des fratries beaucoup moins nombreuses.

Malgré donc une bonne sélection des patients sur la suspicion clinique d'une crise HM, chez les probands sans mutation retrouvée, les IVCT réalisés secondairement ont permis de classer 21,4% (N=3/14) des cas comme HMS, de façon définitive soulignant le manque de sensibilité du test génétique.

Parmi les 768 apparentés, comme chez les probands, l'âge médian de diagnostic par IVCT est inférieur à celui par test génétique, respectivement 34 et 37. Le sexe ratio retrouve 50% d'hommes et de femmes. Environ 50% (N = 193/361) des probands testés soit par IVCT positifs ou par la présence d'une mutation causale ont été classés sensibles HM, comme attendu, témoignant de la transmission autosomique dominante de la sensibilité HM.

Parmi les apparentés chez lesquels seul le diagnostic génétique a été demandé, une mutation a été retrouvée dans environ 47% (N = 167/356) des cas, soit environ un cas sur deux.

Le diagnostic génétique et sa fiabilité chez les apparentés soulève plusieurs questions. D'une part, seule la mutation familiale retrouvée chez le proband et non l'ensemble des mutations causales est recherchée chez l'apparenté. D'autre part, le degré d'appariement de l'apparenté au proband : en effet, plus le degré d'appariement diminue, plus la probabilité de retrouver une mutation diminue. Une autre mutation HM peut être transmise par un parent non lié à la famille HM en investigation. La fréquence d'une mutation est estimée à 1 sur 3000 à 6000 individus en France. Des patients dont la fréquence n'est pas connue mais probablement inférieur à 1% dans notre population sont homozygotes pour une mutation HM ou possèdent une double mutation HM voire combinent plusieurs variants, ou la possibilité exceptionnelle de mutations de novo. Par conséquent, il est donc possible de ne pas détecter une mutation HM chez un apparenté. Son risque théorique est celui de la population générale alors que les IVCT permettent de confirmer ou infirmer définitivement le statut HM. Ces éléments contribuent à diminuer d'autant plus la sensibilité du test génétique sur la population des apparentés.

Afin de comparer les résultats de la génétique à ceux des IVCT, tests de référence, le tableau de contingence a été calculé à partir des patients ayant bénéficié des deux tests diagnostiques. Par soucis d'effectif, ce tableau a été réalisé à partir des résultats obtenus pour les probands et les apparentés. Ce calcul est critiquable car il s'agit de deux populations différentes. Il en résulte une sensibilité de 56% et une VPN de 43%. Ces résultats sont en défaveur d'un test génétique de dépistage de masse sur la population générale. Mais sa spécificité de 97% et sa VPP de 98% sont plutôt en faveur d'un test diagnostique de confirmation chez une population

ciblée, comme celle de familles HM, et ce d'autant plus en raison de la pénétrance incomplète créant un écart entre la prévalence des variations génétiques associées à un risque accru d'HM et l'incidence des épisodes cliniques d'HM. Le test génétique n'a donc de valeur que s'il est positif au sein d'une famille HM, mais n'élimine en rien le diagnostic de sensibilité HM s'il est négatif, ne permettant pas de surseoir aux IVCT. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés dans la littérature, avec une sensibilité de 50% retrouvée au Royaume-Uni. (23)

Les points faibles de notre étude sont qu'il s'agit d'une étude rétrospective, monocentrique.
La force principale réside dans la grandeur de notre cohorte étudiée avec 1131 patients au total. Mais elle comprend deux populations différentes, celle des probands et celle des apparentés, avec des degrés d'appariements aux probands différents pouvant être à l'origine de biais. Afin de comparer la génétique au gold standard, tous les patients ont bénéficié de tests IVCT réalisés au centre HM de Lille, avec les mêmes normes de laboratoire.
En effet, l'utilisation de différents protocoles de test de diagnostic in vitro entre l'Amérique du Nord (test de contracture à la caféine et à l'halothane CHCT), le Japon (test des fibres cutanées ou technique par fibres pelées) et l'Europe (IVCT) pourraient également affecter les estimations de la prévalence des mutations entre ces différents pays. Ce n'est qu'après avoir uniformisé le protocole de test diagnostique qu'une évaluation pourrait être faite des véritables différences dans la prévalence des mutations génétiques chez les patients sensibles à l'HM de différents pays. (23)

Conclusion

L'hyperthermie maligne est définie dans la Classification internationale des maladies comme « une réaction hyperthermique progressive menaçant le pronostic vital survenant au cours d'une anesthésie générale ». Il n'y a pas de caractéristiques cliniques spécifiques ou de phénotypes de l'hyperthermie maligne. Les personnes génétiquement prédisposées risquent de développer une crise HM si elles sont exposées à l'un des agents halogénés ou au suxaméthonium. Celle-ci peut s'avérer fatale si elle n'est pas reconnue précocement et si le traitement n'est pas mis en œuvre rapidement.

La SFAR a actualisé les recommandations de bonnes pratiques professionnelles concernant la prise en charge de l'hyperthermie maligne depuis le dépistage des patients à risque en consultation d'anesthésie, jusqu'au diagnostic et au traitement de la crise HM en 2019. La prise en compte d'antécédents personnels et familiaux de problèmes anesthésiques est obligatoire dans l'évaluation préopératoire. En cas d'éléments pouvant évoquer des antécédents personnels ou familiaux de suspicion d'hyperthermie maligne non explorée, il est recommandé de demander avis auprès d'un centre HM expert. Le diagnostic de sensibilité peut se faire par biopsie musculaire ou par analyse génétique de l'ADN issu du sang périphérique chez les sujets à risque. En France, il faut rappeler que ce dépistage fait l'objet d'un encadrement juridique (décret d'application no 2000-570) qui impose une consultation de conseil génétique au patient et le recueil de son consentement écrit pour l'analyse génétique à des fins médicales dont les résultats sont remis au seul médecin prescripteur.

Bien que des progrès considérables des outils de génétique moléculaire dans l'exploration détaillée des génomes d'individus aient été réalisés, ceux-ci s'accompagnent parfois de difficultés accrues dans le diagnostic car les corrélations génotype-phénotype qui permettraient un diagnostic de certitude manquent encore et sont incertaines. Avec une sensibilité de 50% dans le diagnostic de sensibilité HM chez un individu sensible HM, le test génétique, bien que moins invasif, ne peut à l'heure actuelle pas supplanter entièrement aux tests halothane cafeine par biopsie musculaire chez les sujets à risque. Des connaissances supplémentaires sur les bases génétiques exactes de l'HM sont encore nécessaires pour envisager, peut-être, à l'avenir la possibilité d'un dépistage de masse.

De nombreux variants sont découverts. Pour valider la pathogénicité de ceux-ci, les IVCT restent indispensables alors que le nombre de laboratoires décline en Europe et dans le monde. Aucun autre test (immunofluorescence, études des myotubes, mouvements calciques, microtechniques musculaires) n'a à ce jour la qualité diagnostique des IVCT. Il est donc indispensable de maintenir leur pratique en France et dans le monde.

Liste des figures

Figure 1. Flowchart……..16
Figure 2. Évolution des IVCT chez les probands en fonction du temps……..18
Figure 3. Évolution des IVCT chez les apparentés en fonction du temps……..20
Figure 4. Évolution du nombre d'IVCT en fonction du temps, par tranche de 5 ans…….21
Figure 5. Évolution du nombre de demandes de bilan génétique en fonction du temps par intervalle de 5 ans……..22
Figure 6. Évolution des diagnostics par IVCT et génétique en fonction du temps……..…..22
Figure 7. Évolution du nombre d'IVCT et de diagnostic génétique en fonction du temps……23
Figure 8. Évolution du nombre de mutations RYR 1 et de variants en fonction du temps……24

Références bibliographiques

1. Rosenberg H, Pollock N, Schiemann A, Bulger T, Stowell K. Malignant hyperthermia: a review. Orphanet J Rare Dis. 4 août 2015;10:93.

2. Lu Z, Rosenberg H, Li G. Prevalence of malignant hyperthermia diagnosis in hospital discharge records in California, Florida, New York, and Wisconsin. J Clin Anesth. juin 2017;39:10-4.

3. Lu Z, Rosenberg H, Brady JE, Li G. Prevalence of Malignant Hyperthermia Diagnosis in New York State Ambulatory Surgery Center Discharge Records 2002 to 2011. Anesth Analg. févr 2016;122(2):449-53.

4. Hopkins PM. Malignant hyperthermia: pharmacology of triggering. Br J Anaesth. juill 2011;107(1):48-56.

5. Riazi S, Kraeva N, Hopkins PM. Updated guide for the management of malignant hyperthermia. Can J Anesth Can Anesth. 1 juin 2018;65(6):709-21.

6. Denborough MA, Forster JFA, Lovell RRH, Maplestone PA, Villiers JD. ANAESTHETIC DEATHS IN A FAMILY. Br J Anaesth. juin 1962;34(6):395-6.

7. Britt BA, Locher WG, Kalow W. Hereditary aspects of malignant hyperthermia. Can Anaesth Soc J. mars 1969;16(2):89-98.

8. Riazi S, Kraeva N, Hopkins PM. Malignant Hyperthermia in the Post-Genomics Era: New Perspectives on an Old Concept. Anesthesiology. janv 2018;128(1):168-80.

9. Jiang D, Chen W, Xiao J, Wang R, Kong H, Jones PP, et al. Reduced Threshold for Luminal Ca2+ Activation of RyR1 Underlies a Causal Mechanism of Porcine Malignant Hyperthermia. J Biol Chem. juill 2008;283(30):20813-20.

10. Monnier N, Lunardi J. Biologie de l'hyperthermie maligne : une maladie des canaux calciques du muscle squelettique. Ann Biol Clin (Paris). 3 avr 2000;58(2):147-56.

11. Larach MG, Gronert GA, Allen GC, Brandom BW, Lehman EB. Clinical Presentation, Treatment, and Complications of Malignant Hyperthermia in North America from 1987 to 2006. Anesth Analg. févr 2010;110(2):498-507.

12. Dalmas-Laurent AF, Bruneau B, Julien-Marsollier F, Garnier M, Krivosic-Horber R. Prise en charge de l'Hyperthermie Maligne Actualisation 2019. Anesth Réanimation. nov 2019;5(6):534-43.

13. Hopkins PM, Gupta PK, Bilmen JG. Chapter 38 - Malignant hyperthermia. In: Romanovsky AA, éditeur. Handbook of Clinical Neurology [Internet]. Elsevier; 2018 [cité 11 févr 2022]. p. 645-61. (Thermoregulation: From Basic Neuroscience to Clinical Neurology, Part II; vol. 157). Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444640741000380

14. Larach MG, Klumpner TT, Brandom BW, Vaughn MT, Belani KG, Herlich A, et al. Succinylcholine Use and Dantrolene Availability for Malignant Hyperthermia Treatment: Database Analyses and Systematic Review. Anesthesiology. 1 janv 2019;130(1):41-54.

15. Hopkins PM, Rüffert H, Snoeck MM, Girard T, Glahn KPE, Ellis FR, et al. European Malignant Hyperthermia Group guidelines for investigation of malignant hyperthermia susceptibility. Br J Anaesth. oct 2015;115(4):531-9.

16. Julien-Marsollier F, Bruneau B, Dalmas AF, Dahmani S. Hyperthermie Maligne de l'anesthésie. Prat En Anesth Réanimation. oct 2018;22(5):282-8.

17. Genetic Testing - MHAUS [Internet]. [cité 21 août 2022]. Disponible sur: https://www.mhaus.org/testing/genetic-testing/

18. Monnier N, Krivosic-Horber R, Payen JF, Kozak-Ribbens G, Nivoche Y, Adnet P, et al. Presence of Two Different Genetic Traits in Malignant Hyperthermia Families. Anesthesiology. 1 nov 2002;97(5):1067-74.

19. Masson E. Hyperthermie Maligne de l'anesthésie [Internet]. EM-Consulte. [cité 11 févr 2022]. Disponible sur: https://www.em-consulte.com/article/1251345/hyperthermie-maligne-de-l-anesthesie

20. Gillard EF, Otsu K, Fujii J, Khanna VK, de Leon S, Derdemezi J, et al. A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. Genomics. nov 1991;11(3):751-5.

21. Monnier N, Kozak-Ribbens G, Krivosic-Horber R, Nivoche Y, Qi D, Kraev N, et al. Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional, and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility. Hum Mutat. nov 2005;26(5):413-25.

22. Fiszer D, Shaw MA, Fisher NA, Carr IM, Gupta PK, Watkins EJ, et al. Next Generation Sequencing of RYR1 and CACNA1S in Malignant Hyperthermia and Exertional Heat Illness. Anesthesiology. mai 2015;122(5):1033-46.

23. Miller DM, Daly C, Aboelsaod EM, Gardner L, Hobson SJ, Riasat K, et al. Genetic epidemiology of malignant hyperthermia in the UK. Br J Anaesth. oct 2018;121(4):944-52.

24. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. Genet Med. avr 2008;10(4):294-300.

25. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. mai 2015;17(5):405-24.

26. Ørding H, Brancadoro V, Cozzolino S, Ellis FR, Glauber V, Gonano EF, et al. In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: Results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. Acta Anaesthesiol Scand. sept 1997;41(8):955-66.

27. Shaw MA, Hopkins PM. Mission Impossible or Mission Futile? Anesthesiology. 1 nov 2019;131(5):957-9.

28. Ibarra Moreno CA, Hu S, Kraeva N, Schuster F, Johannsen S, Rueffert H, et al. An Assessment of Penetrance and Clinical Expression of Malignant Hyperthermia in Individuals Carrying Diagnostic Ryanodine Receptor 1 Gene Mutations. Anesthesiology. 1 nov 2019;131(5):983-91.

29. Forrest KML, Foulds N, Millar JS, Sutherland PD, Pappachan VJ, Holden S, et al. RYR1-related malignant hyperthermia with marked cerebellar involvement – A paradigm of heat-induced CNS injury? Neuromuscul Disord. 1 févr 2015;25(2):138-40.

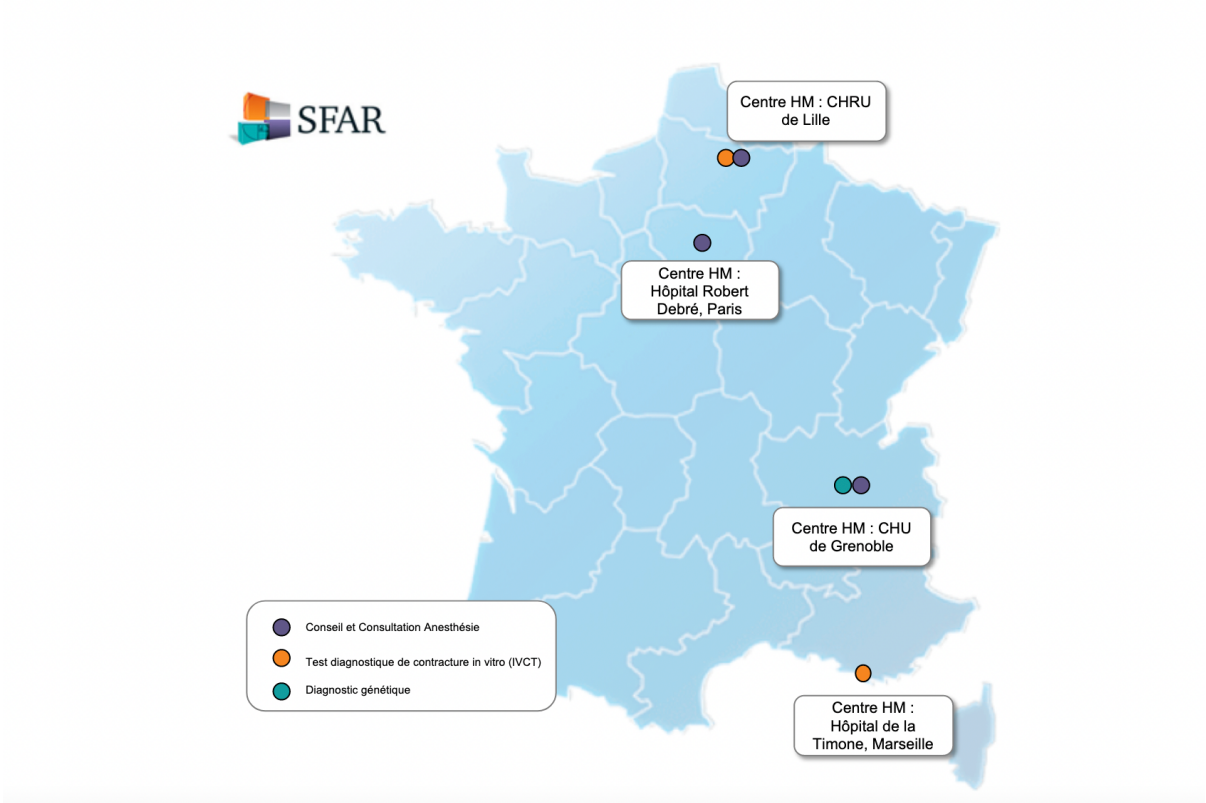
30. Larach MG, Brandom BW, Allen GC, Gronert GA, Lehman EB. Cardiac Arrests and Deaths Associated with Malignant Hyperthermia in North America from 1987 to 2006: A Report from The North American Malignant Hyperthermia Registry of the Malignant Hyperthermia Association of the United States. Anesthesiology. 1 avr 2008;108(4):603-11.

31. Hopkins PM, Girard T, Dalay S, Jenkins B, Thacker A, Patteril M, et al. Malignant hyperthermia 2020: Guideline from the Association of Anaesthetists. Anaesthesia. mai 2021;76(5):655-64.

32. Kraeva N, Riazi S, Loke J, Frodis W, Crossan ML, Nolan K, et al. Ryanodine receptor type 1 gene mutations found in the Canadian malignant hyperthermia population. Can J Anesth Can Anesth. juin 2011;58(6):504-13.

33. Wedel DJ, Gammel SA, Milde JH, laizzo PA. Delayed Onset of Malignant Hyperthermia Induced by Isoflurane and Desflurane Compared with Halothane in Susceptible Swine. Anesthesiology. 1 juin 1993;78(6):1138-44.

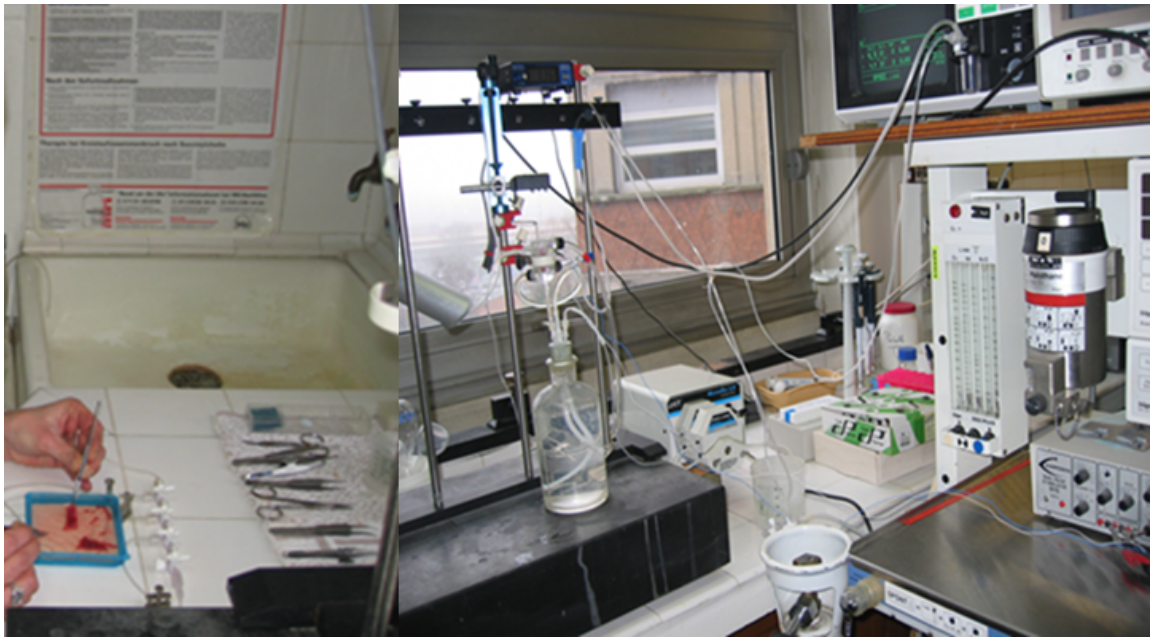
Annexe 1. Liste des centres français de diagnostic de l'hyperthermie maligne

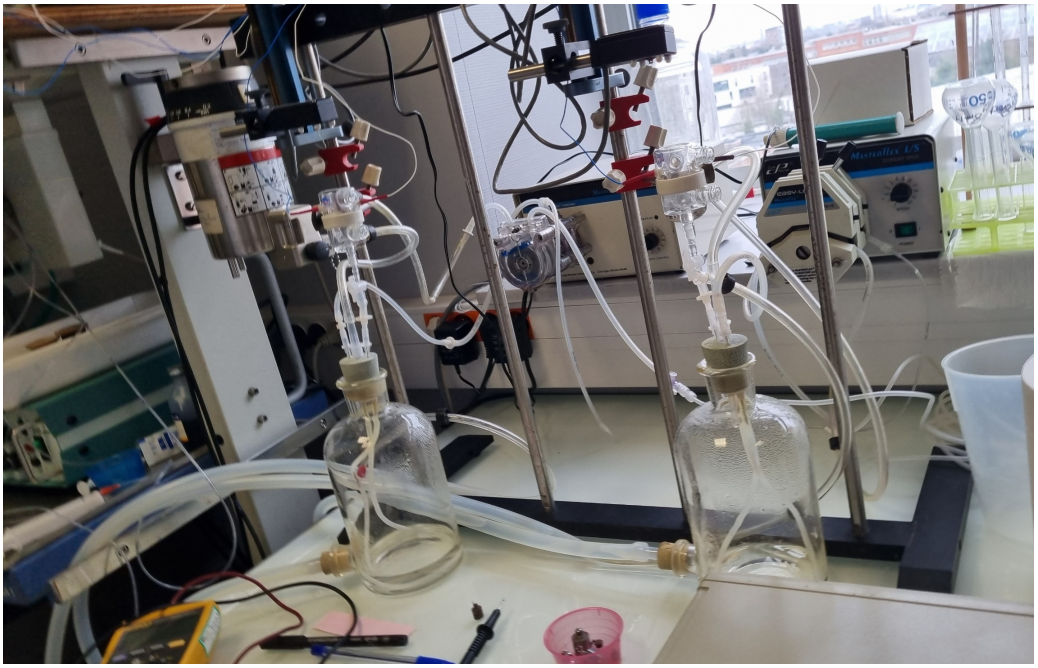


Annexe 2. Carte des centres européens de diagnostic de l'hyperthermie maligne

www.EMHG.org

Annexe 3. Tests IVCT. Laboratoire de Pharmacologie. Faculté de Recherche du CHU de Lille.





Annexe 4. Exemple de résultats de biologie moléculaire en 2011

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-PHARMACOLOGIE-TOXICOLOGIE
Pr Patrice Faure
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET GENETIQUE MOLECULAIRE
Pr Joël Lunardi

Nicole MONNIER
NMonnier@chu-grenoble.fr
Secrétariat : 04 76 76 55 73

Laboratoire agréé (arrêté 01-243)

CHU GRENOBLE
BP 217 X
38043 Grenoble Cedex
COURRIER ARRIVE LE
27 AVR. 2011
CLINIQUE
ANESTHESIE REANIMATION
ROGER SALENGRO

Pr Renée Krivosic-Horber
Anesthésie et Réanimation
CHU Lille
bd Pr J.Leclercq
59037 Lille

France

La Tronche, le 18/04/2011

Analyse moléculaire

- séquençage des exons du gène *RYR1* incluant les points chauds de mutations responsables de l'hyperthermie maligne :
  - MH1 : Cys35Arg, Arg163Cys, Arg163Leu, Gly248Arg, Arg328Trp, Gly341Arg, Ile403Met Tyr522Ser, Asp544Tyr, Arg552Trp, Arg614Cys, Arg614Leu
  - MH2 : Arg2163His, Arg2163Cys, Arg2163Pro, Val 2168Met, Thr2206Arg, Thr2206Met, Arg2336His, Ala2350Thr, Gly2375Ala, Gly2404Lys, Ala2428Thr, Gly2434Arg, Arg2435His, Arg2454His, Arg2454Cys, Arg2458Cys, Arg2458His.
  - domaine C-ter: Cys4664Arg, Tyr4796Cys, Leu4838Val, Arg4861His, Ile4898Thr

Résultats

Identification d'une mutation p.Ala2350Thr (c. 7048G>A) à l'état hétérozygote

Cette mutation est responsable de l'hyperthermie maligne de l'anesthésie.

N. Monnier Pr J. Lunardi

Annexe 5. Exemple résultat de biologie moléculaire en 2021

Laboratoire de Biologie Médicale du CHU Grenoble Alpes
Site de Grenoble - Responsable médical : Pr Hervé Pelloux
Unité Médicale de Génétique Moléculaire : Maladies Héréditaires et Oncologie
Responsable : Dr Julien Fauré Autorisation ARS : 2014-3358

Nom de naissance :
Prénom :
Sexe :
Date de naissance :

Dr DALMAS Anne Frederique
CHRU de Lille - Hôpital Roger Salengro
Clinique d'Anesthésie Réanimation
Avenue du Pr Emile Laine
59037 LILLE Cedex

Code prélèvement : Date de réception : 11/02/2021
Date de prélèvement : 09/02/2021 **Nature : Sang**
N° de famille :

Etude moléculaire : Hyperthermie Maligne peranesthésique / Hyperthermie d'Effort / Rhabdomyolyse d'Effort

Indication d'étude : Cas index, 1ère détermination
Crise clinique
Analyse moléculaire :
Séquençage nouvelle génération (NGS) des régions codantes et des bornes introniques des gènes impliqués dans la pathologie du patient. Séquençage Sanger des variants considérés pathogènes, probablement pathogènes ou de signification inconnue.

Résultats :

Gène(s) / analyse(s)	Résultat(s)	
RYR1 NM_000540	c.7007G>A p.Arg2336His	Hétérozygote

Commentaires :

Nous avons identifié dans l'ADN du patient le variant pathogène (classe 5 ACMG) cité ci-dessus.
Ce variant est reconnu comme responsable d'Hyperthermie Maligne peranesthésique par le Groupe Européen de l'Hyperthermie Maligne.
Il convient d'informer le patient du risque d'hyperthermie maligne associé. Le patient doit bénéficier d'une prise en charge adaptée vis-à-vis du risque d'hyperthermie maligne. Les apparentés doivent être informés de la possibilité d'un dépistage (mode de transmission autosomique dominant).

Vous devez contacter un centre expert de l'Hyperthermie Maligne pour la suite de la prise en charge de ce patient
Contact : https://sfar.org/wp-content/uploads/2015/10/2_SFAR_HyperthermieMaligne.pdf page 8.

Ce résultat est rendu sous réserve d'une validation sur un second prélèvement indépendant.
Ce résultat est rendu dans la limite des techniques utilisées et des connaissances actuelles.
Nous restons à votre disposition pour tout complément d'information.

Validé le : 11/05/21 Dr ROUX BUISSON Nathalie
Nrouxbuisson@chu-grenoble.fr

Edité le: May 11, 2021 3:40 PM - Edition Finale

CHU GRENOBLE ALPES - Institut de Biologie et de Pathologie - CS 10 217 38043 Grenoble Cedex
Secrétariat : Tél. +33 (0)4 76 76 55 73 Fax. +33 (0)4 76 76 56 64

1 / 2

Laboratoire de Biologie Médicale du CHU Grenoble Alpes
Site de Grenoble - Responsable médical : Pr Hervé Pelloux
Unité Médicale de Génétique Moléculaire : Maladies Héréditaires et Oncologie
Responsable : Dr Julien Fauré Autorisation ARS : 2014-3358

Nom de naissance :
Prénom :
Sexe :
Date de naissance :

Dr DALMAS Anne Frederique
CHRU de Lille - Hôpital Roger Salengro
Clinique d'Anesthésie Réanimation
Avenue du Pr Emile Laine
59037 LILLE Cedex

Données techniques de l'analyse génétique

- Méthodologie :
Préparation de la banque : kit d'enrichissement SureselectXT2 Custom (Agilent®) panel à façon Myogr_V2018
Séquençage haut débit sur NextSeq 500 (Illumina®)
Alignement et appel de variants : BWA MEME v0.7.14 et GATK, fonction haplotype caller v 4.0.12
Annotation maison et filtre bioinformatique sur les gènes : CACNA1S (NM_000069), RYR1 (NM_000540), STAC3 (NM_145064), TRPV1 (NM_018727), CAV3 (NM_001234, NM_033337), LPIN1 (NM_145693)
Confirmation par séquençage Sanger des variations considérées comme pathogènes, probablement pathogènes ou de signification inconnue (classifications ACMG 3, 4 et 5).
- Données techniques : Couverture à 20x des gènes cibles (régions codantes et bornes introniques) : 100%

Les mutations responsables d'Hyperthermie Maligne validées par le Groupe Européen de l'Hyperthermie Maligne au moment de l'analyse sont couvertes et sont disponibles sur le site https://www.emhg.org/diagnostic-mutations
La détection de variants est faite dans la limite de sensibilité et spécificité de la technique. Les insertions – délétions de plus de 15pb sont mal détectées. Les grandes délétions ou réarrangements ne sont pas détectés.

- Gènes inclus dans le panel Myogr_V2018 :
ACTA1 ADAMTS2 ADCY6 AGRN ALG14 ALG2 ANO5 ASCC1 ATP2A1 BAG3 BICD2 BIN1 CACNA1S CASQ1 CAV3 CCDC78 CFL2 CHAT CHRNA1 CHRNB1 CHRND CHRNE CHRNG CLCN1 CNTN1 CNTNAP1 COL12A1 COL13A1 COL1A1 COL1A2 COL3A1 COL5A1 COL5A2 COL5A3 COL6A1 COL6A2 COL6A3 COL6A6 COLQ CRYAB DES DNAJB6 DNM2 DOK7 DPAGT1 DYNC1H1 DYSF ECEL1 EMD ERBB3 FBLN5 FBN2 FHL1 FKBP14 FLNC GFPT1 GLE1 GMPPB GNE GPR126 ADGRG6 HSPG2 IGFN1 ITGA7 KBTBD13 KCNA1 KCNJ2 KCNQ2 KLHL40 KLHL41 KY LAMA2 LAMB2 LDB3 LMNA LMOD3 LPIN1 LRP4 MAGEL2 MATR3 MEGF10 MTM1 MUSK MYBPC1 MYBPC3 MYH2 MYH3 MYH7 MYH8 MYO18B MYO9A MYOD1 MYOT NALCN NEB ORAI1 PIEZO2 PIP5K1C PLEC PLOD1 PNPLA2 PREPL PTPLA HACD1 PYROXD1 RAPSN RYR1 SCN4A SEPN1 SLC25A1 SLC5A7SNAP25 SPEG SQSTM1 STAC3 STIM1 SYT2 TCAP TIA1 TNNI2 TNNT1 TNNT3 TNXB TPM2 TPM3 TRDN TRIM32 TRIP4 TRPV1 TRPV4 TTN VCP ZASP ZBTB42 ZC4H2

Validé le : 11/05/21

Dr ROUX BUISSON Nathalie
Nrouxbuisson@chu-grenoble.fr

Edité le: May 11, 2021 3:40 PM - Edition Finale

AUTEUR : Nom : FOURNIER **Prénom :** Marie
Date de Soutenance : 08/09/2022
Titre de la Thèse : Tests halothane caféine (IVCT) et biologie moléculaire : évolution de la méthode diagnostique de la sensibilité à l'hyperthermie maligne dans le temps et intérêt de la génétique
Thèse - Médecine – Poitiers 2022
Cadre de classement : Médecine spécialiste
DES + spécialité : DES d'Anesthésie-Réanimation
Mots-clés : « hyperthermie maligne », « diagnostic », « IVCT », « génétique »

Résumé : Contexte : L'hyperthermie maligne de l'anesthésie (HMA) est une myopathie pharmacogénétique de transmission autosomique dominante, rare mais potentiellement létale, survenant au décours d'une anesthésie générale. Il a été évoqué une prévalence de la prédisposition génétique allant de 1/8500 à 1/3000 individus. L'objectif de cette étude était d'étudier l'évolution de la méthode diagnostique de la sensibilité HM en fonction du temps et d'évaluer l'apport qualitatif de la biologie moléculaire par rapport aux IVCT chez les probands et leurs apparentés. **Matériel et Méthodes :** Il s'agissait d'une étude rétrospective observationnelle à visée descriptive à partir de la base de données lilloise, centre principal de référence en France de diagnostic et de traitement HM. Les données ont été collectées de 1951 à 2022. Tous les patients suspects d'une crise HM ainsi que leurs apparentés quel que soit le degré de parenté étaient inclus. Les patients suspects d'hyperthermie maligne d'effort, de rhabdomyolyse d'effort, les patients atteints de myopathie, d'élévation chronique des CPK ont été exclus. Les performances diagnostiques de la sensibilité à l'HM des IVCT et de la biologie moléculaire ont été évaluées chez les probands et leurs apparentés ainsi que l'évolution de leur utilisation au cours du temps : IVCT en 1ère intention avant 2008, génétique en 1ère intention après 2008.
Résultats : 363 probands ont été étudiés. Avant 2008, chez les probands ayant bénéficié d'IVCT en 1ère intention, 50,9% sont revenus positifs, classant ces probands HMS. La génétique réalisée en deuxième intention retrouvait une mutation causale dans 42,2% des cas. Après 2008, la biologie moléculaire réalisée en 1ère intention retrouvait une mutation causale dans 33,8% des cas. Chez les probands pour lesquels aucune mutation n'avait été retrouvée, un IVCT réalisé en deuxième intention était positif dans 21,4% des cas. 768 apparentés ont été étudiés. Dans cette population, 43,3% des IVCT sont revenus positifs et la génétique a retrouvé une mutation familiale dans 46,9% des cas. Le tableau de contingence comparant la biologie moléculaire aux IVCT, tests de référence, a retrouvé une sensibilité de 56% pour la génétique dans le diagnostic de la sensibilité HM. **Conclusion :** Le dépistage des patients à risque HM reste indispensable par des centres experts HM. La sensibilité de 56% du test génétique dans le diagnostic de la sensibilité HM retrouvé dans cette étude est similaire à d'autres résultats retrouvés dans la littérature. Les IVCT restent indispensables et sont le test diagnostique de référence. Leur pratique en France doit être maintenue.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Denis FRASCA

Assesseurs : Monsieur le Professeur Benoît TAVERNIER
Madame le Docteur Karin DHOSTE
Madame le Docteur Anne-Frédérique DALMAS-LAURENT