UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

# Approches génétiques et moléculaires des pathologies du rythme cardiaque

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie de Nantes / Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé / Spécialité : Génétique Moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

Marie ALLOUIS

Le 20 Juin 2005, devant le jury ci-dessous

| | |
|---|---|
| Président : | M. Hervé LE MAREC, Professeur, Université de Nantes |
| Rapporteurs : | M. Hugues ABRIEL, Professeur, Université de Lausanne |
| | M. Patrice BOUVAGNET, Maître de conférence, Univ. de Lyon |
| Examinateurs : | Mme Françoise LE BOUFFANT, chargé de recherche CNRS, Institut du Thorax, Nantes |
| | M. Dominique BABUTY, Professeur, Université de Tours |
| Directeur de Thèse: | M. Jean-Jacques SCHOTT, chargé de recherche INSERM, Institut du Thorax, Nantes |

# SOMMAIRE

**AVANT-PROPOS** ..... **1**

**INTRODUCTION GENERALE : ACTIVITE ELECTRIQUE NORMALE DU CŒUR** ..... **3**

**I. L'activité électrique cardiaque** ..... **5**

**II. Hétérogénéité des cellules cardiaques.** ..... **6**

II.1. Cardiomyocytes contractiles. ..... 6

II.2. Cellules myoendocrines. ..... 6

II.3. Cellules du tissu de conduction. ..... 7

II.3.1. Cellules nodales ..... 7

II.3.2. Les cellules du faisceau de His et les fibres de Purkinje ..... 8

**III. Potentiel d'action cardiaque et courants ioniques** ..... **8**

III.1. Phase 0 : phase de dépolarisation rapide ..... 10

III.2. Phase 1 : phase de repolarisation courte ..... 11

III.3. Phase 2 : phase plateau ..... 11

III.4. Phase 3 : phase de repolarisation ..... 12

III.5. Le potentiel de repos et automatisme ..... 13

**IV. Propagation du potentiel d'action cardiaque** ..... **14**

IV.1. Communication électrique entre cellules ..... 14

IV.2. Excitabilité du tissu cardiaque ..... 15

IV.3. Genèse du potentiel d'action. ..... 16

**V. Electrocardiogramme.** ..... **16**

**PREMIERE PARTIE : ETUDES PHENOTYPIQUES ET GENETIQUES DE FAMILLES ATTEINTES DE PATHOLOGIES DU RYTHME CARDIAQUE** ..... **19**

**I. Syndrome du QT Long congénital** ..... **20**

I.1. Relations phénotype/génotype entre les différentes formes de QT long .... 21
I.1.1. Relation phénotype/génotype dans les syndromes du QT long de type 1 et 5 ..... 23
I.1.2. Relation phénotype/génotype dans les syndromes du QT long de type 2 et 6 ..... 24
I.1.3. Relation phénotype/génotype dans le syndrome du QT long de type 3 .. ..... 27
I.1.4. Relation entre l'ankyrineB et le syndrome du QT long de type 4..... 29
I.1.5. Relation entre KCNJ2 et le syndrome d'Andersen ..... 31
I.1.6. Relation entre CaCNA1C et le syndrome de Timothy ..... 33
I.2. Etude phénotypique et génétique d'une famille atteinte des Syndromes de Marfan et du QTLong ..... 34
I.2.1. Le syndrome de Marfan ..... 35
I.2.2. Etude phénotypique ..... 36
I.2.3. Etude génétique ..... 41
I.3. Discussion ..... 43

**II. Tachycardies ventriculaires catécholergiques ..... 45**

II.1. Relation gènes/fonction dans les tachycardies ventriculaire catécholergiques ..... 46
II.1.1. Relation entre le récepteur à la ryanodine de type 2 et les tachycardies ventriculaires catécholergiques ..... 46
II.1.2. Relation entre la calséquestrine 2 et les tachycardies ventriculaire catécholergiques ..... 49
II.2. Etude phénotypique et génétique d'une famille atteinte de tachycardies ventriculaires catécholergiques ..... 50
II.2.1. Etude phénotypique ..... 50
II.2.2. Etude génétique ..... 53
II.3. Discussion ..... 55

**III. La fibrillation auriculaire ..... 57**

III.1. Données génétiques ..... 58
III.1.1. Relation entre KCNQ1 et la fibrillation auriculaire ..... 58
III.1.2. Relation entre l'ankyrine B et la fibrillation auriculaire ..... 59

III.1.3. Relation entre KCNE1 et la fibrillation auriculaire ..... 59
III.1.4. Relation entre KCNE2 et la fibrillation auriculaire ..... 60
III.2. Etude phénotypique et génétique d'une famille atteinte de fibrillation auriculaire ..... 60
III.2.1. Etude Phénotypique. ..... 60
III.2.2. Etude génétique de la famille Bu. ..... 63
III.3. Discussion ..... 68

**IV. Syndrome de Brugada ..... 70**
IV.1. Description ..... 70
IV.1.1. Données cliniques ..... 71
IV.1.2. Données épidémiologiques ..... 74
IV.1.3. Données génétiques ..... 77
IV.1.3.1. Canal sodique cardiaque SCN5A ..... 77
IV.1.3.2. Hétérogénéité génétique ..... 78
IV.1.4. Hypothèses physiopathologiques ..... 78
IV.1.4.1. Théorie physiopathologique d'Antzelevitch ..... 78
IV.1.4.2. Rôle du système nerveux autonome ..... 82
IV.1.4.3. Autres hypothèses physiopathologiques ..... 83
IV.2. Etude Phénotypique et génétique de familles atteintes du syndrome de Brugada ..... 84
IV.2.1. Familles Ju., Wi., et Mo. ..... 85
IV.2.1.1. Etude phénotypique de la famille Ju. ..... 85
IV.2.1.2. Etude phénotypique la famille Wi. ..... 87
IV.2.1.3. Etude phénotypique de la famille Mo. ..... 88
IV.2.1.4. Etude génétique des familles Ju., Wi. et Mo. ..... 90
IV.2.2. Familles Ch., Me., Jo., Co., et M. ..... 93
IV.2.2.1. Etude phénotypique et génétique de la famille Ch. ..... 93
IV.2.2.2. Etude phénotypique et génétique de la famille Me. ..... 95
IV.2.2.3. Etude phénotypique et génétique du patient Jo. ..... 99
IV.2.2.4. Etude phénotypique et génétique de la famille Co. ..... 100
IV.2.2.5. Etude phénotypique et génétique de la famille M. ..... 101
IV.3. Etude généalogique ..... 102
IV.4. Discussion ..... 106

**DEUXIEME PARTIE : ETUDES PHENOTYPIQUES ET GENETIQUES DE FAMILLES ATTEINTES TROUBLES DE LA CONDUCTION CARDIAQUE PROGRESSIFS.....111**

**I. Description .....112**

I.1. Classification des troubles de la conduction cardiaque suivant leur étiologie .....114

I.1.1. BAV acquis ou secondaires .....114

I.1.2. Troubles de la conduction cardiaque idiopathiques .....114

I.1.3. Troubles de la conduction cardiaque héréditaires.....115

I.1.3.1. Troubles de la conduction cardiaque congénitaux .....115

I.1.3.2. Troubles de la conduction cardiaque héréditaires progressifs.....116

I.2. Troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés.....116

I.2.1. Caractéristiques physiopathologiques.....116

I.2.2. Etudes anatomopathologiques et histologiques.....118

I.2.3. Hypothèses physiopathologiques.....118

I.2.3.1. Anomalie des canaux ioniques et des connexines cardiaques.....119

I.2.3.2. Anomalie de développement du système de conduction cardiaque.... .....119

I.2.3.3. Changements de l'architecture du tissu cardiaque.....122

**II. Données génétiques des troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés.....123**

II.1. Canal sodique cardiaque SCN5A.....124

II.2. Hétérogénéité génétique .....125

**III. Etude Phénotypique et génétique de familles atteintes de troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés .....126**

III.1. Famille Ro. .....127

III.1.1. Etude phénotypique .....127

III.1.2. Etude génétique .....128

III.2. Famille Ch. .....129

III.2.1. Etude phénotypique .....129

III.2.2. Etude génétique .....131

III.3. Répartition géographique des patients implantés d'un stimulateur cardiaque pour bloc auriculo-ventriculaire. ....132
III.4. Famille Br. ....134
III.4.1. Etude phénotypique. ....134
III.4.2. Etude génétique. ....135

**IV. Discussion ....136**

**TROISIEME PARTIE : RECHERCHE DE PARTENAIRE PROTEIQUE DE SCN5A ....140**

**I. Introduction ....141**
I.1. Structure du canal sodique cardiaque ....141
I.2. Adressage du canal sodique ....142
I.3. Localisation du canal sodique cardiaque ....144
I.4. Les partenaires de SCN5A ....144
I.4.1. Ankyrine G ....145
I.4.2. Facteur de croissance fibroblastique FHF1B ....146
I.4.3. Calmoduline ....146
I.4.4. Ubiquitines ligases ....147
I.4.5. Syntrophines ....148

**II. Recherche de nouveaux partenaires protéiques. ....149**
II.1. Principe ....149
II.2. Crible double hybride. ....151
II.3. Caractérisation de l'interaction de SCN5A avec 14-3-3η. ....155
II.3.1. Immunoprécipitation. ....155
II.3.1.1. Immunoprécipitation à partir d'extrait de cellules COS-7 ....156
II.3.1.2. Immunoprécipitation à partir d'extrait de coeur de souris ....157
II.3.2. Immunocytochimie. ....158
II.3.3. Effet physiologique de l'interaction de SCN5A avec 14-3-3η. ....160
II.3.3.1. Patch clamp. ....161
II.3.3.2. Séquençage de propositus atteints de troubles de la conduction progressif ou du syndrome de Brugada. ....161

III. Discussion. ..... 162

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 166

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 184

## Index des illustrations

**Figures (voir thèse papier pour les figures manquantes)**

Figure 1 : Environnement et structure générale du coeur.

Figure 2 : Le coeur et le tissu de conduction

Figure 3 : Les différents potentiels d'action cellulaires cardiaques et leur résultante sur l'électrocardiogramme.

Figure 4 : Les principaux courants ioniques responsables du potentiel d'action ventriculaire cardiaque. La dépolarisation cellulaire vient du fait que les courant ioniques entrants deviennent plus intenses que les courants sortants et la repolarisation vient du déséquilibre inverse. Les 3 principaux courants entrants dépolarisants sont le courant sodique $I_{Na}$, le courant calcique $I_{Ca}$ et le courant dû à l'échangeur sodium-calcium $Na^+/Ca^{2+}$. La repolarisation se produit sous la double influence de la réduction des courants entrants (inactivation de $I_{Na}$ et de $I_{caL}$, décroissance de $I_{Na/Ca}$) et de l'activation des courants potassiques sortants. Cette activation peut-être rapide ($I_{to}$), assez rapide ($I_{Kr}$) ou lente ($I_{Ks}$).

Figure 5 : Structure d'une jonction communicante.

Figure 6 : Schéma des 12 dérivations sur l'ECG.

Figure 7 : Représentation d'un ECG normal et de ses différentes composantes.

Figure 8 : Différents aspects de la repolarisation ventriculaire chez les patients atteints d'un syndrome du QT long.

Figure 9 : La protéine KvLQT1 est composée d'un seul domaine constitué de 6 segments transmembranaires. La protéine mink est constituée d'un seul segment transmembranaire. En bas, l'électrocardiogramme montre une onde T avec une large base.

Figure 10 : La protéine HERG est composée d'un seul domaine constitué de 6 segments transmembranaires. La protéine MiRP1 est constituée d'un seul segment transmembranaire. En bas, l'électrocardiogramme montre une onde T de faible amplitude en double bosse.

Figure 11 : La protéine SCN5A est composée de 4 domaines constitués chacun de 6 segments transmembranaires. En bas, l'électrocardiogramme montre une onde T retardé avec un long segment isoélectrique ST. (D'après Dumaine et Antzelevitch).

Figure 12 : morphologie de l'onde T chez les patients atteints d'un syndrome du QT long de type 4
Figure 13 : topologie de la sous unité du canal Kir2.1.
Figure 14 : topologie de la protéine Cav1.2.
Figure 15: arbre généalogique de la famille No.
Figure 16 : échocardiographies de la patiente III-5 de la famille No.
Figure 17 : électrocardiogrammes de la patiente III-5 de la famille No.
Figure 18 : mutation A2847G dans l'exon 12 du gène KCNH2 de la famille No.
Figure 19 : électrocardiogramme basal du propositus (IV-12) de la famille Re.
Figure 20 : arbre généalogique de la famille Re.
Figure 21 : Résultats de l'analyse de liaison pour le gène RyR2 de la famille Re.
Figure 22 : mutation R4959Q du gène RyR2 retrouvée dans la famille Re.
Figure 23 : arbre généalogique de la famille Bu.
Figure 24 : ECG des patients IV-1 et III-9
Figure 25 : ECG haute amplification
Figure 26 : Résultats de l'analyse de liaison pour différents marqueurs de la région 20q12-13 de la famille Bu.
Figure 27 : intervalle de liaison obtenu à partir des résultats des marqueurs génétiques.
Figure 28 : locus de fibrillation auriculaire sur le chromosome 20.
Figure 29 : différents aspects de repolarisation compatibles avec un ECG de syndrome de Brugada.
Figure 30 : Représentation schématique des modifications du potentiel d'action du ventricule droit à l'origine des manifestations électrocardiographiques du syndrome de Brugada.
Figure 31 : Mécanisme de réentrées en phase 2.
Figure 32 : mécanisme physiopathologique d'une dysfonction du système nerveux autonome dans le syndrome de Brugada.
Figure 33 : arbre généalogique de la famille Ju.
Figure 34 : arbre généalogique de la famille Wi.
Figure 35 : Electrocardiogrammes du propositus de la famille Wi (III-9)
Figure 36 : ECG de base du propositus de la famille Mo.
Figure 37 : arbre généalogique de la famille Mo.
Figure 38 : résultats de l'analyse génétique de la famille Mo.

Figure 39 : ECG basal du propositus de la famille Ch.
Figure 40 : arbre généalogique de la Famille Ch.
Figure 41 : ECG basal de l'individu II-1 de la famille Ch.
Figure 42 : ECG du propositus de la famille Me présentant une tachycardie monomorphe avec des QRS larges, une déviation axiale gauche, et un aspect de bloc de branche gauche.
Figure 43 : ECG du propositus montrant un bloc de branche droit et un hémibloc postérieur gauche associé à un sus-décalage du segment ST en V1
Figure 44 : arbre généalogique de la famille Me.
Figure 45 : ECG de la mère du propositus de la famille Me.
Figure 46 : mutation SCN5A de la famille Me.
Figure 47 : analyse génétique de la famille Me.
Figure 48 : ECG de base de l'individu Jo.
Figure 49 : arbre généalogique famille Jo.
Figure 50 : arbre généalogique de la famille Co.
Figure 51. Analyse génétique de la famille Co.
Figure 52 : Arbre généalogique de la famille M.
Figure 53 : Analyse génétique de la famille M.
Figure 54 : les communes d'origine de ces 3 familles sont localisées par le cercle rouge.
Figure 55 : analyse génétique de la famille R.
Figure 56 : résultats de la généalogie ascendante des familles R., Ch., Me., Ju., et Jo.
Figure 57 : électrocardiogrammes associés aux différents types de blocs auriculo-ventriculaires. (D'après Mangrum et coll.)
Figure 58 : ECG du propositus de la famille Ro. Cette personne est en BAV complet avec un rythme d'échappement à 35 battements par minutes.
Figure 59 : arbre généalogique de la famille Ro
Figure 60 : ECG du propositus de la famille Ch. Réalisé en 1998.
Figure 61 : ECG du propositus de la famille Ch. réalisé en 2001.
Figure 62 : arbre de la famille Ch.
Figure 63 : pedigree utilisé pour la 2ème analyse génétique de la famille Ch.

Figure 64 : Répartition géographique de la fréquence des implantations de pacemaker pour BAV dégénératif dans la région Nantaise. Localisation géographique de la région R.
Figure 65 : arbre généalogique de la famille Br.
Figure 66: évolution des paramètres de conduction avec l'âge.
Figure 67 : structure de la sous-unité α du canal sodique cardiaque. En vert : le segment S4 ; en rouge : les segments S5 et S6 ; en gras : les boucles P
Figure 68 : la sous-unité α du canal sodique cardiaque associée à ses 2 sous unité β ainsi que les protéines interagissants.
Figure 69 : Stratégie de détection des interactions entre protéines par le système double hybride.
Figure 70 : appât utilisé pour le crible double hybride.
Figure 71 : 14-3-3η interagit avec IDI-II de SCN5A.
Figure 72 : Les appâts utilisés lors du double hybride pour réduire la zone d'interaction entre SCN5A et 14-3-3η.
Figure 73 : 14-3-3η interagit avec le fragment 1 de l'IDI-II SCN5A.
Figure 74 : Appâts utilisés pour réduire la zone d'interaction entre SCN5A et 14-3-3η.
Figure 75 : 14-3-3η interagit avec le fragment 11(acides aminés 417 à 466) de SCN5A.
Figure 76 : 14-3-3η interagit avec l'IDI-II de SCN5A.
Figure 77 : La protéine SCN5A entière interagit avec 14-3-3η dans un extrait de cellules COS-7.
Figure 78 : SCN5A interagit avec 14-3-3η dans de l'extrait de coeur de souris.
Figure 79 : Immunocytochimie sur cellule COS-7 transfectée par le plasmide pIRES-14-3-3η-HA-SCN5A-GFP.
Figure 80 : localisation de 14-3-3 dans les cardiomyocytes de lapin.
Figure 81 : localisation de SCN5A et de 14-3-3 dans des cardiomyocytes isolés de lapin.
Figure 82 : Schéma du principe de liaison génétique.
Figure 83 : Les 8 appâts utilisés pour le double hybride.

**Tableaux**

Tableau 1 : critères diagnostiques du syndrome de Marfan définis dans le Workshop du 7th International Congress of Human Genetics à Berlin

Tableau 2 : Récapitulatifs des caractéristiques cliniques de la famille Re.

Tableau 3 : caractéristiques cliniques de la famille Bu.

Tableau 4 : Liste des gènes à expression cardiaque situés dans le petit intervalle de liaison génétique de la famille Bu.

Tableau 5 : caractéristiques démographiques et cliniques des patients atteints de syndrome de Brugada d'après 7 études différentes.

Tableau 6 : comparaison des principaux fichiers de la littérature.

Tableau 7 : Lod-scores des familles Ju., Wi., et Mo.

Tableau 8 : tableau récapitulatif des polymorphismes retrouvés lors du séquencage de 14-3-3 ε et η

# Avant-propos

# Avant-propos

La majorité des morts subites cardiaques sont d'origine rythmique. La mort subite de l'adulte est définie comme un décès inattendu qui survient dans l'heure qui suit l'apparition des premiers symptômes. Son incidence est de l'ordre de 0,1% par an en France. Cette incidence, bien qu'inférieure à celle retrouvée dans la littérature internationale (0,2%), reflète un problème majeur de Santé publique, puisqu'elle correspond pour la France à 30 000 à 50 000 personnes victimes de mort subite par an. Peu de ces accidents surviennent en milieu hospitalier. En France, des études récentes retrouvent moins de 5% des patients présentant des symptômes de morts subites réanimés avec succès. Les chances de survie après une mort subite sont donc très faibles.

Bien qu'une politique de prise en charge de l'arrêt cardio-respiratoire soit en train de se mettre en place, le pourcentage de patients réanimés restera modeste. La prévention de la mort subite reste le moyen le plus efficace. Cependant, elle soulève un double problème :

- Celui de la prévention secondaire, qui consiste soit à optimiser les soins après l'arrêt cardiaque ou la survenue de l'arythmie, soit à prévenir la récidive.
- Celui de la prévention primaire, qui consiste à définir les patients à haut risque de mort subite par arythmie et à leur procurer un traitement efficace, de façon à prévenir l'accident avant qu'il survienne.

Sur le plan clinique et étiologique, les troubles de rythme cardiaque sont responsables de la grande majorité des morts subites, la fibrillation ventriculaire représentant l'anomalie rythmique principalement incriminée (80% des cas). Elle fait habituellement suite à une tachycardie ventriculaire qui s'accélère et se transforme en fibrillation. La maladie coronarienne représente la principale cause de fibrillation ventriculaire, mais d'autres étiologies sont rencontrées notamment l'insuffisance cardiaque, les cardiomyopathies, la dysplasie arythmogène du ventricule droit, le

syndrome de Brugada, le syndrome du QT long, ou les tachycardies ventriculaires catécholergiques.

La prévention de la mort subite passe aussi par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces pathologies. L'origine de ces pathologies peut être multiples, tabagisme, hypercholestérolémie, mais aussi génétique. La découverte de facteurs génétiques impliqués dans les arythmies a constitué un premier pas vers l'identification des mécanismes physiopathologiques de ces maladies apparemment hétérogènes et complexes. Cependant, aujourd'hui la physiopathologie de ces arythmies reste encore mal connue. Grâce à la structure de recherche clinique de recherche clinique sur les maladies cardiovasculaires du CHU de Nantes, il a été possible d'identifier des formes familiales dont le mode de transmission héréditaire était relativement simple. Nous avons choisi d'étudier dans la première et la deuxième partie de cette thèse, des formes familiales d'arythmies cardiaque, pour identifier de nouveaux gènes. Nous nous sommes intéressés à des formes familiales de pathologies du rythme cardiaque telles que le syndrome du QT long congénital, les tachycardies ventriculaires catécholergiques, les fibrillations auriculaires, le syndrome de Brugada ou les troubles de la conduction cardiaque et en particulier les troubles de la conduction cardiaque progressifs.

Devant la complexité des études génétiques des troubles de la conduction cardiaque dégénératifs et du syndrome de Brugada, 2 pathologies génétiquement hétérogènes liées au gène du canal sodique SCN5A, nous avons pensé que des défauts de ces protéines partenaires de SCN5A pourraient altérer la fonction du canal et être à l'origine de ces pathologies. Dans une troisième partie, nous avons recherché des partenaires protéiques du canal SCN5A et mis en évidence un nouveau partenaire de SCN5A interagissant directement avec lui, et nous discuterons du rôle de ce dernier sur le canal SCN5A.

# INTRODUCTION GENERALE : ACTIVITE ELECTRIQUE NORMALE DU CŒUR

Le cœur est un muscle strié creux, composé de quatre cavités: deux oreillettes et deux ventricules (Figure 1). Le sang non oxygéné arrive dans l'oreillette droite par la veine cave supérieure et la veine cave inférieure. Il passe ensuite dans le ventricule droit au moment de la contraction de l'oreillette. Les ventricules se contractent à leur tour et le sang non oxygéné se dirige vers les poumons par l'artère pulmonaire. Une fois oxygéné, le sang revient dans l'oreillette gauche par la veine pulmonaire, passe dans le ventricule gauche lors de la contraction de l'oreillette gauche, et est éjecté vers la circulation générale par l'aorte (Figure 1).

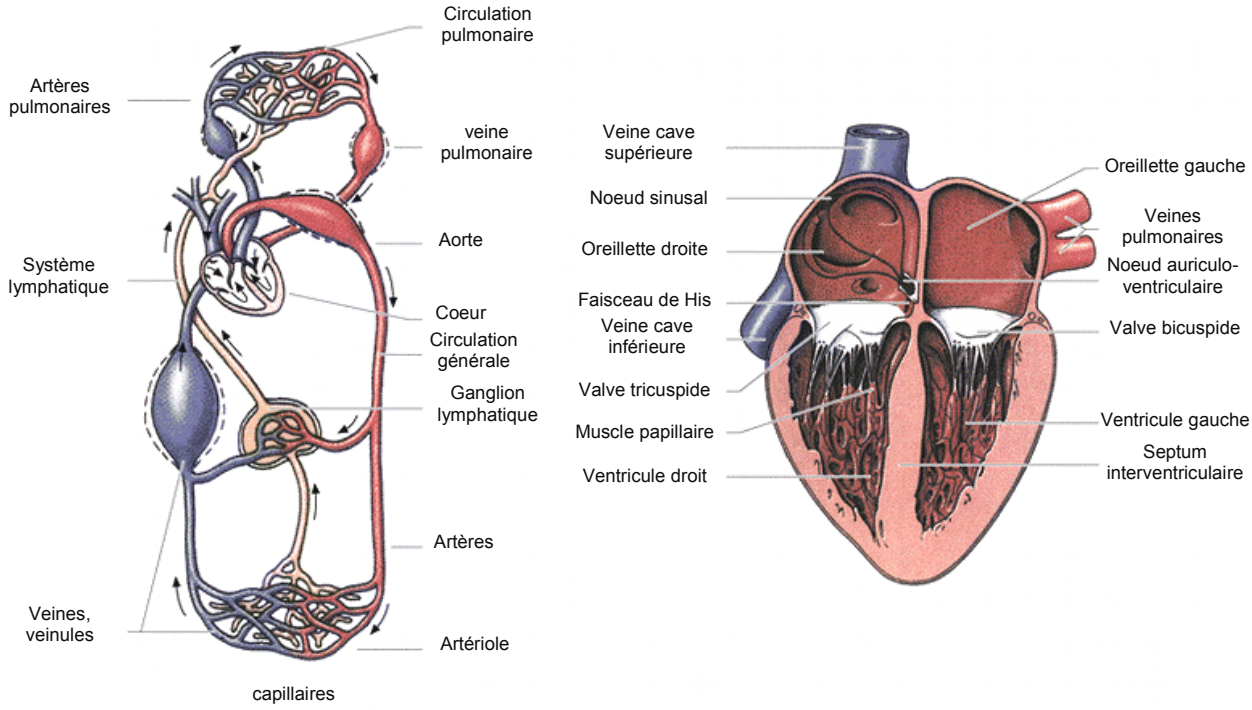



*Figure 1 : Environnement et structure générale du coeur.*

Le cycle cardiaque est composé de 2 phases : une phase de contraction du cœur (systole) et une phase de relaxation du cœur (diastole). Cette succession de systoles et diastoles se reproduit de façon autonome grâce à l'activité spontanée des cellules *pacemaker*, leur déclenchement ne relevant pas de l'action du système nerveux. Toutefois, la fréquence cardiaque peut être régulée par le système nerveux autonome: une activation du système parasympathique provoque une bradycardie et une activation du système sympathique provoque une tachycardie.

# *I. L'activité électrique cardiaque*

Dans le myocarde, l'activité électrique est générée spontanément par le noeud sinusal, centre de l'automatisme cardiaque. A partir de ce noeud, l'influx se propage au travers des oreillettes pour atteindre le noeud auriculo-ventriculaire et y être freiné, puis le système de conduction ventriculaire : le faisceau de His, et les fibres de Purkinje. Ces dernières s'insinuent dans les parois ventriculaires et transmettent la dépolarisation aux myocytes qui se contractent de l'apex vers la base des ventricules et de l'endocarde vers l'épicarde (Figure 2).

L'activité électrique du coeur est un phénomène complexe fortement lié à son architecture et aux différents types cellulaires qui le constituent.

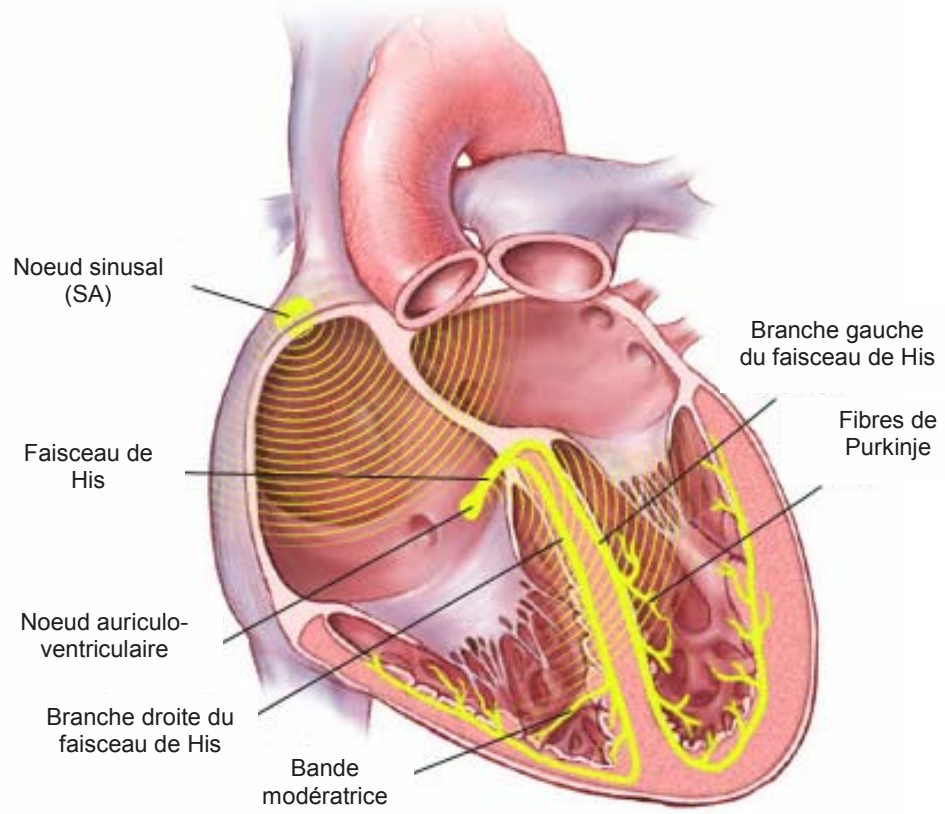



*Figure 2 : Le coeur et le tissu de conduction*

## *II. Hétérogénéité des cellules cardiaques.*

Le cœur est composé en dedans des fibroblastes, des cellules nerveuses et des cellules endothéliales, de 3 variétés de cellules :

- Les cardiomyocytes contractiles
- Les cellules myoendocrines
- Les cellules du tissu de conduction.

### II.1. Cardiomyocytes contractiles.

Dans le muscle cardiaque, les cardiomyocytes sont organisés en réseau de fibres ramifiées. Ils sont minces, fusiformes et ont une taille d'environ 100 à 150 µm. Leur cytoplasme est très riche en protéines contractiles organisées en myofibrilles et l'on retrouve la même striation transversale en sarcomère que dans le muscle strié squelettique. L'ancrage entre les cardiomyocytes se fait grâce aux disques intercalaires. Ce sont des structures qui mélangent 3 types de jonctions intercellulaires : les desmosomes, les jonctions communicantes (ou jonction gap) et les jonctions intermédiaires.

Dans le ventricule, les cardiomyocytes sont organisés en trois couches remarquables par leur orientation et leurs propriétés électriques différentes :

- L'épicarde. C'est la couche cellulaire la plus externe, elle ne mesure que quelques millimètres d'épaisseur.
- Le mid-myocarde. C'est la couche la plus épaisse et elle est constituée de cellules M.
- L'endocarde. C'est la couche la plus interne, elle ne mesure que quelques millimètres d'épaisseur.

### II.2. Cellules myoendocrines.

Ces cardiomyocytes, pauvres en myofibrilles ont une fonction endocrine. Ils ont la particularité de contenir des vésicules de sécrétion, dans lesquelles on retrouve par exemple, le précurseur de la famille du Facteur Auriculaire Natriurétique.

Ces hormones sont impliquées dans la régulation du volume sanguin et la composition électrolytique du liquide extracellulaire. Elles entraînent une vasodilatation, une baisse de la pression artérielle et une diminution du volume sanguin, avec une considérable augmentation de la diurèse et de l'élimination urinaire de sodium.

## II.3. Cellules du tissu de conduction.

Ce sont des cardiomyocytes modifiés qui constituent le système de conduction du myocarde. Ces cellules sont spécialisées dans l'initiation de l'excitation et dans la propagation de l'excitation. Il existe deux types cellules dans le tissu de conduction :

- Les cellules nodales
- Les cellules du faisceau et des fibres de Purkinje

### *II.3.1. Cellules nodales*

Chez l'homme, ce sont les cellules du noeud sinusal qui initient l'activité électrique spontanée. Le noeud sinusal est situé à la jonction du *crista terminalis* auriculaire et du tissu veineux. Il n'existe pas de frontière anatomique particulière entre le tissu nodal et le tissu auriculaire. Le noeud sinusal est constitué de cellules d'origine musculaire, entourées d'une grande quantité de collagène et de fibroblastes. Les cellules situées au centre du tissu nodal contiennent peu de myofilaments. Ceux-ci sont répartis dans toutes les directions et ne présentent pas d'organisation en myofibrilles. La structure cellulaire devient progressivement plus régulière du centre nodal vers le tissu auriculaire, avec des myofibrilles de plus en plus nombreuses et de mieux en mieux organisées[1].

Les cellules nodales sont retrouvées aussi au niveau du noeud auriculo-ventriculaire qui se prolonge par faisceau de His.

Le noeud auriculo-ventriculaire est situé à la jonction de l'oreillette droite, du septum inter-auriculaire et du ventricule droit. Il sert de relais électrique entre les oreillettes et les ventricules et ralentit la conduction. Le ralentissement de la conduction dans le noeud auriculo-ventriculaire permet à la systole auriculaire de s'achever et permet le remplissage des cavités ventriculaires avant la transmission de l'influx électrique aux ventricules. Les cellules du noeud auriculo-ventriculaire sont très peu différentes de celles du noeud sinusal.

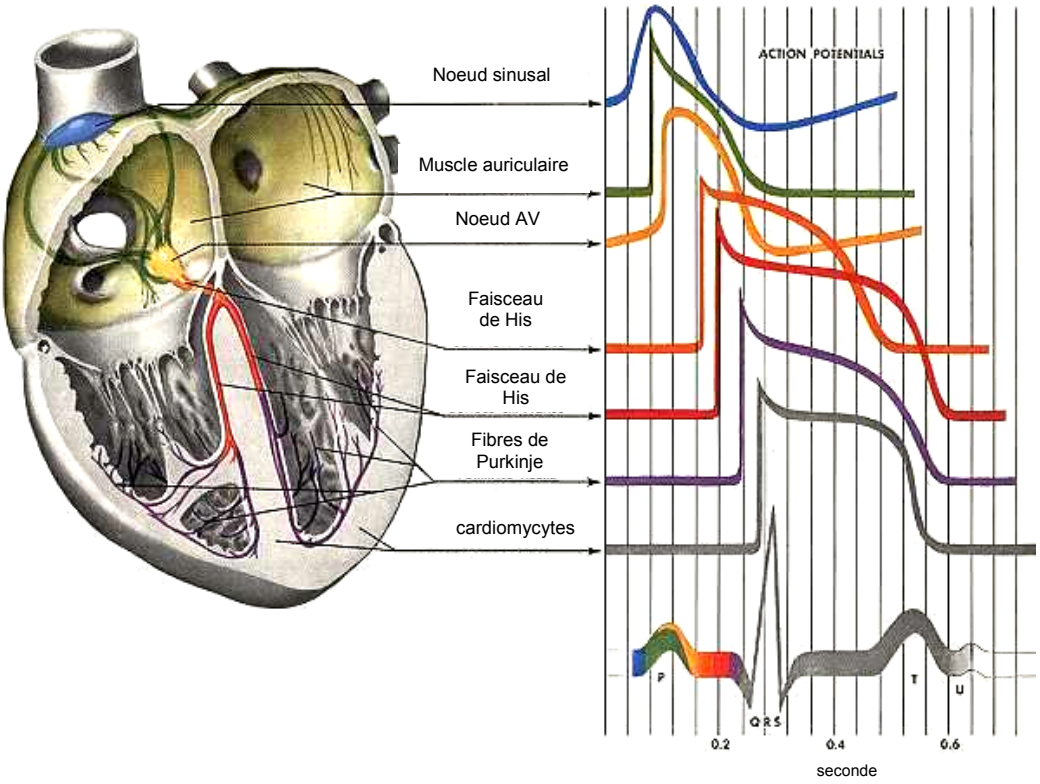
Le faisceau de His est la continuité du noeud auriculo-ventriculaire. Il entre dans le septum interventriculaire et se divise rapidement en 2 branches pour atteindre l'apex et se continuer en fibres de Purkinje.

### *II.3.2. Les cellules du faisceau de His et les fibres de Purkinje*

Le faisceau de His se divise rapidement en deux branches puis en un réseau formant les fibres de Purkinje qui s'insinuent dans les parois ventriculaires et transmettent la dépolarisation aux myocytes. Les cellules sont beaucoup plus volumineuses que les cardiomyocytes classiques. Leur cytoplasme est abondant, clair, riche en glycogène et en mitochondries, et pauvre en myofibrilles. La conduction de l'onde de dépolarisation se fait à une vitesse 4 à 5 fois plus élevée que dans les cardiomyocytes classiques.

## *III. Potentiel d'action cardiaque et courants ioniques*

Le potentiel d'action (PA) cardiaque est une onde de dépolarisation transitoire qui commence lorsque la membrane se dépolarise. Il est le résultat d'une cascade de transferts ioniques, dépendant en grande partie des variations de perméabilité des canaux ioniques. Chaque type cellulaire a une morphologie de PA différente (Figure 3).




*<u>Figure 3</u> : Les différents potentiels d'action cellulaires cardiaques et leur résultante sur l'électrocardiogramme.*

Le potentiel d'action ventriculaire cardiaque est constitué de 4 phases (Figure 4).

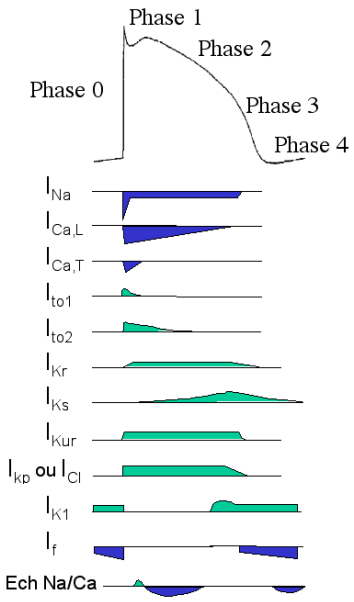



*Figure 4 : Les principaux courants ioniques responsables du potentiel d'action ventriculaire cardiaque. La dépolarisation cellulaire vient du fait que les courant ioniques entrants deviennent plus intenses que les courants sortants et la repolarisation vient du déséquilibre inverse. Les 3 principaux courants entrants dépolarisants sont le courant sodique $I_{Na}$, le courant calcique $I_{Ca}$ et le courant dû à l'échangeur sodium-calcium $Na^+/Ca^{2+}$. La repolarisation se produit sous la double influence de la réduction des courants entrants (inactivation de $I_{Na}$ et de $I_{caL}$, décroissance de $I_{Na/Ca}$) et de l'activation des courants potassiques sortants. Cette activation peut-être rapide ($I_{to}$), assez rapide ($I_{Kr}$) ou lente ($I_{Ks}$).*

## III.1. Phase 0 : phase de dépolarisation rapide

Au cours de cette phase, les canaux sodiques voltage-dépendants sont activés. L'ouverture de ces canaux donne naissance à un courant sodique $I_{Na}$ de courte durée et d'amplitude importante qui s'active vers -80mV. Le potentiel de membrane se déplace vers $E_{Na}$. La haute vitesse de dépolarisation de la phase 0 est obtenue grâce à un mécanisme de rétrocontrôle positif : l'entrée d'ions $Na^+$ dépolarise la cellule et cette dépolarisation augmente la probabilité d'ouverture des canaux $Na^+$, ce qui augmente d'avantage l'entrée de $Na^+$ et le niveau de dépolarisation (cycle de Hodgkin). La fermeture de ces canaux est rapide. Il faut alors atteindre un certain temps avant qu'ils puissent être à nouveau activables.

Cette période appelée période réfractaire, empêche la genèse de tout nouveau PA tant qu'elle n'est pas achevée. La phase 0 se termine quand le potentiel de membrane a atteint +30mV.

## III.2. Phase 1 : phase de repolarisation courte

L'inactivation d'$I_{Na}$ et l'activation du courant transitoire sortant $I_{to}$ sont responsables de la repolarisation précoce du ventricule et contrôlent la durée du potentiel d'action. Le courant $I_{to}$ est constitué de 2 composantes : l'une potassique $I_{to1}$ et l'autre chlorure $I_{to2}$. La composante potassique $I_{to1}$ est composée d'un courant d'inactivation rapide ($I_{to,\ fast}$) et d'un autre d'inactivation lente ($I_{to,\ slow}$). La composante chlorure $I_{to2}$ est non dépendante du voltage, de faible amplitude, et s'active en présence de calcium intracellulaire.

Dans les cellules du ventricule humain, une différence dans la densité de $I_{to}$ est associée à la variation dans la durée du PA entre l'épicarde et l'endocarde[2].

## III.3. Phase 2 : phase plateau

La phase plateau du potentiel d'action cardiaque est la résultante des courants entrants dépolarisants et des courants sortants repolarisants.
Les courants entrants dépolarisant comprennent :

- Le courant calcique de type L ($I_{Ca,L}$), est activé lentement pour des potentiels supérieurs à - 40mV et atteint une amplitude maximale entre - 10 et + 10 mV, c'est-à-dire aux valeurs de potentiel du plateau. Il s'inactive lentement, en fonction du potentiel et de la concentration en calcium intracellulaire. Son rôle essentiel est de déclencher l'entrée dans la cellule du calcium et la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique responsables du couplage excitation contraction[3 4].

- Le courant $I_{Na/Ca}$ dépend d'un transporteur qui assure l'échange d'ions $Na^+$ et $Ca^{2+}$ en fonction des gradients de concentrations de ces deux ions de part et

d'autre de la membrane. L'activité de cet échangeur est électrogénique puisque trois ions $Na^+$ sont transférés pour un ion $Ca^{2+}$. Cela se traduit par un bref courant net sortant repolarisant à la fin de la phase 0 et pendant la phase 1 du potentiel d'action, car l'échange se fait dans le sens d'une sortie d'ions $Na^+$ et d'une entrée d'ions $Ca^{2+}$. Pendant la phase de plateau du potentiel d'action, du fait de l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire, le sens de l'échange se fait sous la forme d'une entrée d'ions $Na^+$ et d'une sortie d'ions $Ca^{2+}$, et il en résulte un courant net entrant dépolarisant qui a tendance à ralentir la repolarisation cellulaire.

- Dans les cellules ventriculaires et les cellules de Purkinje, il subsisterait un petit courant sodique entrant persistant pendant la phase de plateau, appelé courant de fenêtre, qui présente une cinétique d'inactivation lente et contribue au plateau de potentiel d'action. Ce courant, sensible à la tétrodotoxine pourrait résulter d'une inactivation retardée ou incomplète des canaux sodiques responsables du courant $I_{Na}$ ou provenir de canaux sodiques différents s'ouvrant avec un certain temps de latence.

- Le courant $K^+$ rectifiant sortant retardé ($I_K$) est le courant sortant prédominant pendant la phase de plateau du potentiel d'action. Il est constitué de 2 composantes de cinétiques et de conductances différentes: $I_{Kr}$ est la composante d'activation rapide et $I_{Ks}$ est la composante d'activation lente. A ces deux composantes, s'ajoute une troisième, d'activation ultrarapide $I_{Kur}$, principalement au niveau auriculaire.

## III.4. Phase 3 : phase de repolarisation

La phase 3 est la résultante de la diminution progressive du courant $I_{Ca}$ et de l'augmentation des courants potassiques sortants, $I_K$ et $I_{K1}$. Le début de la phase 3 de repolarisation est dû essentiellement au courant $I_K$, puis, les canaux responsables d'$I_{K1}$, qui sont fermés pendant la phase de plateau sont progressivement réactivés et

participent à la fin de la repolarisation de la membrane puis au maintien du potentiel de repos.

### III.5. Le potentiel de repos et automatisme

Pendant cette phase 4, les myocytes ventriculaires restent à un potentiel de membrane stable de –80 à –85 mV. Ce potentiel de membrane représente la différence de potentiel entre l'extérieur de la cellule chargé positivement et l'intérieur de la cellule chargé négativement. Il reflète la perméabilité sélective de la membrane aux ions potassium et le gradient de concentration en potassium de part et d'autre de la membrane, qui est maintenu activement grâce à une pompe $Na^+/K^+$ ATP-dépendante. A chaque cycle, cette pompe fait sortir trois ions $Na^+$ de la cellule en échange de deux ions $K^+$, ce qui génère un courant sortant hyperpolarisant ($I_p$) et maintient les gradients de concentrations en sodium et potassium de part et d'autre de la membrane. Le potassium intracellulaire diffuse constamment vers l'extérieur de la cellule selon son gradient de concentration, principalement par des canaux $K^+$ rectifiants entrants. Il existe aussi un petit courant entrant d'ions sodium par l'intermédiaire de canaux sodiques et de l'échangeur $Na^+/Ca^{2+}$. Le potentiel de repos est interrompu par le stimulus suivant qui vient à nouveau porter le potentiel de membrane à sa valeur seuil, déclenchant un nouveau potentiel d'action.

Les principales différences entre les ventricules et les oreillettes concernent les courants ioniques participant au potentiel de repos et à la phase de repolarisation du potentiel d'action. $I_{K1}$ est le principal courant potassique du potentiel de repos des cellules des oreillettes. Un autre courant potassique, activé par l'acétylcholine par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques M2 ($I_{K, Ach}$), permet aussi de stabiliser le potentiel de repos des cellules auriculaires et est responsable de l'hyperpolarisation du potentiel de repos observée lors d'une stimulation vagale. La phase de plateau des oreillettes est très brève, reflétant la prédominance d'un courant $I_{to}$ important sur un courant $I_{Ca}$ relativement petit. La phase terminale lente de la repolarisation est due principalement aux courants $I_K$ et $I_{K, Ach}$.

## *IV. Propagation du potentiel d'action cardiaque*

La propagation de l'excitation dans le coeur nécessite un potentiel qui est généré par des cellules cardiaques et sa propagation au travers de tissus multicellulaires.

### IV.1. Communication électrique entre cellules

La propagation de l'activité électrique dans le myocarde nécessite un type particulier de jonctions intercellulaires : les jonctions gap ou les jonctions communicantes[5]. Ces structures (Figure 5) sont constituées de connexines[6]. Ces connexines sont des protéines composées de 4 segments transmembranaires, qui s'associent en hexamères pour former des canaux transmembranaires appelés connexons comportant en leur centre un pore aqueux. Deux connexons de deux cellules adjacentes s'alignent et s'arriment pour former un canal jonctionnel. Ces canaux jonctionnels ainsi formés se rassemblent pour former des jonctions communicantes.

Cinq connexines ont été identifiées dans le coeur : les connexines 37, 40, 43, 45 et 46[7]. Les connexons peuvent être constitués d'un ou plusieurs types de connexines différentes. Les propriétés des jonctions gap sont variables suivant leur composition en connexines.

Ces jonctions gap assurent entre les cellules la diffusion passive, directe, de cytoplasme à cytoplasme, des ions et des métabolites ayant une masse inférieure ou égale à 900-1000 daltons. Ces canaux permettent aux cellules d'uniformiser leur potentiel électrique et chimique. Ils ne sont pas ou peu sélectif vis à vis des ions, n'ont pas de ligand connu et ont une forte probabilité d'ouverture[8].

Ces connexines ne seraient pas seulement impliquées dans la conduction cardiaque mais aussi dans la morphogenèse cardiaque[9].

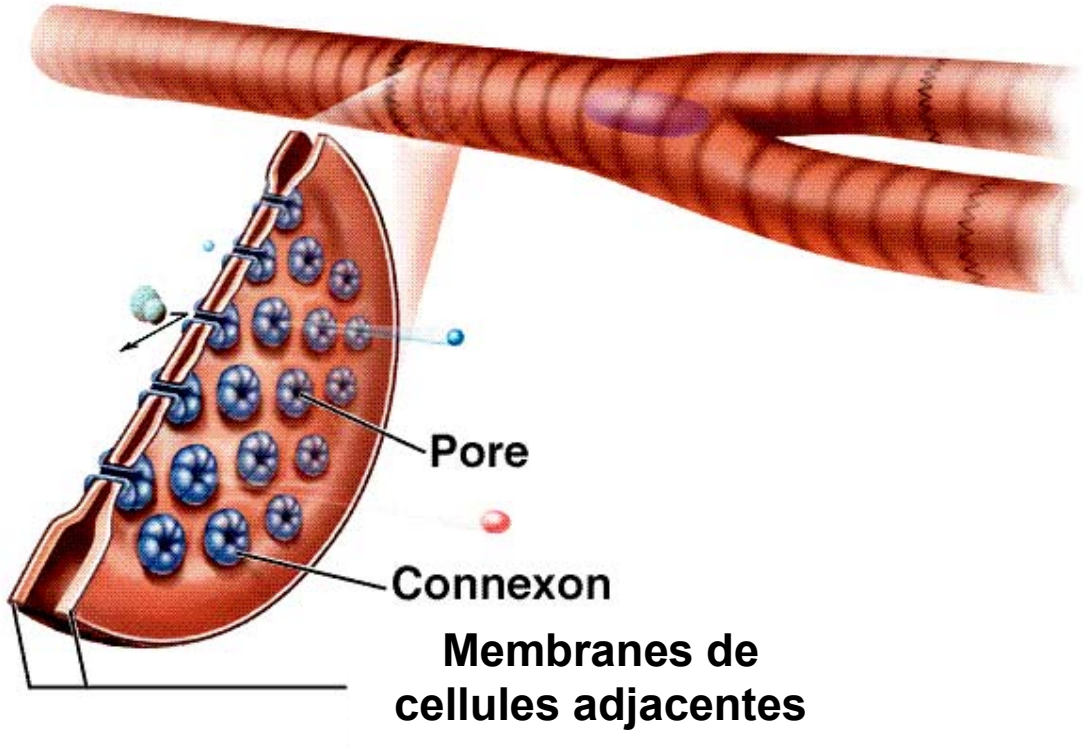



*Figure 5 : Structure d'une jonction communicante.*
*Une jonction communicante est un groupe de canaux entre 2 membranes plasmiques espacées d'environ 2 à 3 nm, qui mettent en contact les cytoplasmes de 2 cellules adjacentes. Chaque hémi-canal transmembranaire, appelé connexon, est un cylindre formé de 6 connexines.*

Dans les systèmes excitables, les communications jonctionnelles sont indispensables à la transmission et à la synchronisation des signaux électriques et mécaniques. Dans les systèmes en remodelage, comme les tissus embryonnaires, les changements d'expression des connexines lors des étapes déterminantes de la différenciation cellulaire suggèrent que les communications jonctionnelles participent aux mécanismes de différenciation, de migration et de croissance cellulaires dont dépend la morphogenèse des tissus et des organes.

## IV.2. Excitabilité du tissu cardiaque

L'excitabilité correspond à l'initiation et à la propagation du potentiel d'action. L'excitabilité dépend de l'amplitude et des cinétiques des courants ioniques responsables de la dépolarisation rapide du potentiel d'action ($I_{Na}$ dans le ventricule),

du potentiel seuil d'activation de $I_{Na}$ et $I_{Ca}$, de la différence entre le potentiel de repos et le potentiel seuil, et des propriétés des myocytes.

### IV.3. Genèse du potentiel d'action.

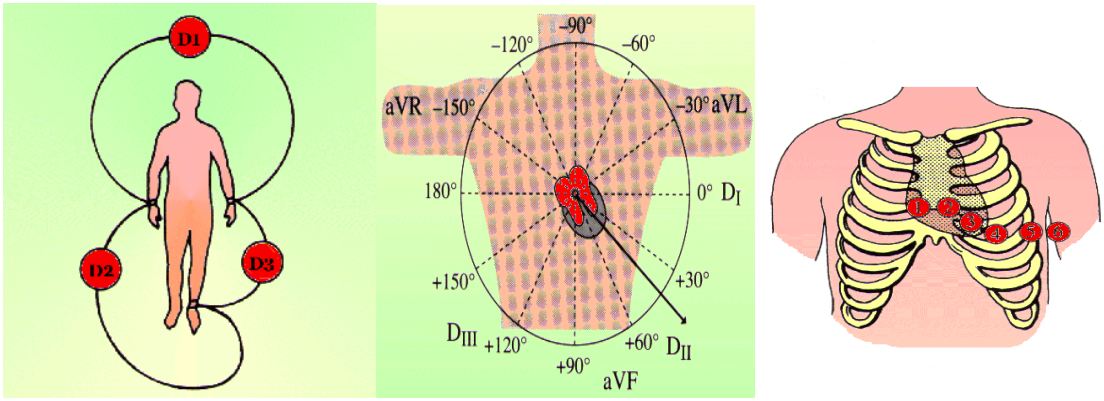
Lors du potentiel d'action de la cellule myocardique excitée, l'ouverture des canaux $Na^+$ rend le potentiel de membrane des cellules adjacentes positif par rapport aux autres cellules au repos. Ceci entraîne des courants ioniques à l'intérieur de la cellule et au travers des jonctions gap. Des courants $Na^+$ et $Cl^-$ locaux circulent à l'extérieur de la cellule dans le sens opposé. Ces derniers tendent à dépolariser la membrane cellulaire au repos jusqu'au potentiel seuil du potentiel d'action. Ce potentiel seuil correspond au moment où l'augmentation des conductances dépolarisantes (ouverture des canaux $Na^+$ et $Ca^{2+}$) dépassent les conductances hyperpolarisantes (canaux $K^+$ et $Cl^-$).

Les cellules cardiaques possèdent un répertoire très sophistiqué de canaux ioniques pour engendrer le potentiel d'action et le propager aux cellules voisines. Ce potentiel d'action est la résultante de l'activité de canaux et d'échangeurs membranaires. C'est l'équilibre de l'activité de tout cet arsenal de canaux qui permet au coeur non seulement d'engendrer et de propager son activité électrique mais aussi de la moduler en fonction de ses besoins. Toute rupture de cet équilibre risque de déclencher des anomalies du potentiel d'action ou de sa propagation, à l'origine de pathologies du rythme cardiaque.

## *V. Electrocardiogramme.*

Le principe de l'ECG est simple: la conduction des influx électriques à travers le cœur produit des courants électriques que l'on peut détecter à la surface du corps. Pour cela, des électrodes sont placées à la surface du thorax de part et d'autre du cœur et les différences de potentiel générées par ces courants électriques peuvent être enregistrées. Ces enregistrements peuvent être effectués selon différentes positions des électrodes, ce sont les dérivations. Ces dérivations sont disposées de

façon à explorer l'activité électrique du cœur dans les deux plans: le plan frontal, observé sur les dérivations dites périphériques (dérivations DI, DII, DII, et aVL, aVR, AVF) (Figure 6A et B), et sur le plan horizontal, observé sur les dérivations dites précordiales ou thoraciques (dérivations V1 à V6) (Figure 6C). Ainsi, les dérivations DI, aVL et V6 explorent la paroi latérale du ventricule gauche, tandis que les dérivations V1 à V6 explorent l'ensemble de la paroi antérieure du ventricule gauche.




(A) (B) (C)

*Figure 6 : Schéma des 12 dérivations sur l'ECG.*
*(A) et (B) dérivations périphériques; (C) dérivations précordiales*

Sur l'ECG (Figure 7), l'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes, l'intervalle PR, au temps de conduction dans le noeud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et le tissu de Purkinje, le complexe QRS représente la dépolarisation ventriculaire, et l'onde T la repolarisation. La durée QT correspond à la durée de repolarisation. La phase de repolarisation auriculaire survient environ 0,15 seconde après l'onde P et se superpose à l'enregistrement du complexe QRS. Elle n'est donc pas visible sur l'ECG de surface. L'intervalle RR correspond à un cycle cardiaque et est utilisé pour déterminer la fréquence cardiaque et le nombre de battements par minute.

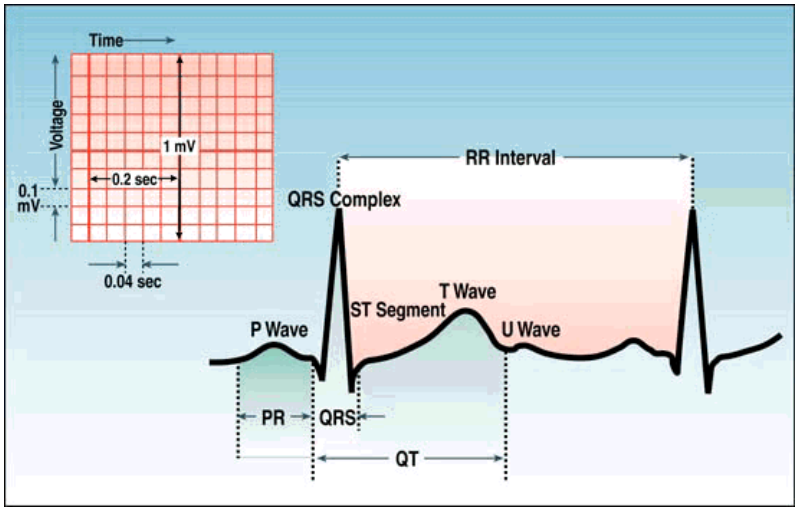



*Figure 7 : Représentation d'un ECG normal et de ses différentes composantes.*

# PREMIERE PARTIE : ETUDES PHENOTYPIQUES ET GENETIQUES DE FAMILLES ATTEINTES DE PATHOLOGIES DU RYTHME CARDIAQUE

## *I. Syndrome du QT Long congénital.*

Le syndrome du QT Long congénital est une pathologie héréditaire caractérisée par un allongement anormal de la repolarisation ventriculaire, associée à un risque élevé de tachycardies ventriculaires polymorphes (torsades de pointes). Ces torsades de pointes sont déclenchées le plus souvent par l'activation du système adrénergique lors d'un stress physique ou émotionnel[10], peuvent provoquer des syncopes et dégénérer en fibrillation ventriculaire responsable d'une mort subite.

La première description détaillée du syndrome du QT long congénital est attribuée à Jervell et Lange-Nielsen[11] qui décrivent en 1957 une famille dans laquelle quatre enfants sourds porteurs d'un QT long présentent des syncopes et où trois d'entre eux mourront subitement. Ensuite, Romano et coll.[12], en 1963, puis Ward[13], en 1964, décrivent successivement des familles dont les membres présentent un syndrome du QT long, mais sans surdité, et font des syncopes et parfois des morts subites. Ce nouveau syndrome portera le nom de Romano-Ward. Outre la présence ou l'absence de surdité congénitale, la grande différence entre les syndromes de Jervell et Lange-Nielsen et de Romano-Ward réside dans le mode de transmission de l'anomalie génétique. En effet, le syndrome de Romano-Ward, de loin le plus fréquent (il représente plus de 90% des cas) se transmet selon le mode autosomique dominant, alors que le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen semble se transmettre sous un mode autosomique récessif.

Le syndrome du QT Long congénital est à différencier du syndrome du QT long acquis. Dans ce cas, l'allongement anormal du QT s'observe dans certaines situations pathologiques telles que l'hypokaliémie, l'hypothermie, l'acidose hypoxique, une bradycardie sévère associée à des blocs auriculo-ventriculaires et lors de l'administration de certains médicaments qui prolongent la repolarisation et notamment les antiarythmiques de classes Ia et III. (http://www.arizonacert.org/medical-pros/drug-lists/drug-lists.htm#).
Le syndrome du QT long acquis peut survenir chez des individus ayant une anomalie à expression mineure qui altère les courants de repolarisation mais pas de façon

suffisante pour allonger l'intervalle QT au repos. Cependant elles peuvent être révélées en cas de situation pathologique notamment lors de l'administration de certains médicaments qui modifient les courants potassiques[14].

## I.1. Relations phénotype/génotype entre les différentes formes de QT long

Avant l'identification des gènes impliqués dans le syndrome du QT long, Moss et coll.[15] avaient déjà remarqué une hétérogénéité de la morphologie de l'onde T chez les patients atteints d'un syndrome du QT long. Les différences portaient sur la morphologie de l'onde T, la régulation de la repolarisation et finalement sur les circonstances de survenue des troubles du rythme et des accidents syncopaux ou des morts subites (Figure 8).

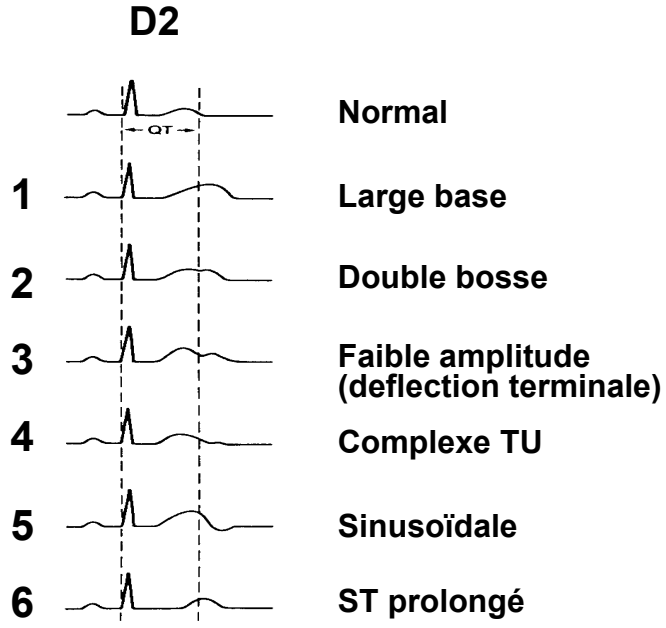



*Figure 8 : Différents aspects de la repolarisation ventriculaire chez les patients atteints d'un syndrome du QT long.*
*La classification des différents phénotypes retrouvés par Moss et coll.[15] et leurs représentations schématiques.*

Cette hétérogénéité de la morphologie de l'onde T chez des patients atteints d'un syndrome du QT long préfigurait l'hétérogénéité génétique de ce syndrome.

L'identification des gènes responsables du syndrome du QT long a été facilitée grâce aux connaissances accumulées en physiologie cardiaque. Un allongement de l'intervalle QT à l'ECG traduit au niveau du coeur un allongement de la durée du potentiel d'action des cellules du myocarde. Le syndrome du QT long est l'archétype du trouble de la repolarisation. En effet, si le courant net repolarisant est diminué, la repolarisation cellulaire est retardée et l'intervalle QT allongé. Ceci est le résultat soit d'une augmentation du courant entrant soit d'une diminution du courant sortant. Ces observations font penser qu'une modification d'un canal potassique, sodique ou calcique ou d'une protéine régulatrice pourrait être à l'origine du syndrome du QT long.

A ce jour, 8 gènes ont été identifiés dans le syndrome du QT Long congénital (les numéros des différentes formes de ce syndrome ont été attribués suivant l'ordre de découverte des gènes ou des locus) :

- *KCNQ1* sur le chromosome 11[16 17] (LQT1)
- *KCNH2* sur le chromosome 7[18 19] (LQT2)
- *SCN5A* sur le chromosome 3 [20] (LQT3)
- *Ankyrine B* sur le chromosome 4[21 22] (LQT4)
- *KCNE1* sur le chromosome 21[23 24 25] (LQT5)
- *KCNE2* sur le chromosome 21[26] (LQT6)
- *KCNJ2* sur le chromosome 17[27 28] (syndrome d'Andersen)
- *CaCNA1C* sur le chromosome 12[29] (syndrome de Timothy)

Splawski et coll.[30] ont étudié l'implication de 5 gènes (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, et *KCNE2*), dans le syndrome du QT long congénital. Chez 262 patients non apparentés 177 mutations ont été détectées, dont 42% (n=75) ont été retrouvées sur le gène *KCNQ1*, 45% (n=80) sur *KCNH2*, 8% (n=14) sur *SCN5A*, 3% (n=5) sur *KCNE1* et 2% (n=3) sur *KCNE2*.

En fonction des gènes mutés dans ce syndrome, l'onde T de l'électrocardiogramme a un aspect différent et les circonstances de survenue des malaises diffèrent[15 34].

### *I.1.1. Relation phénotype/génotype dans les syndromes du QT long de type 1 et 5*

L'étude de la forme de l'onde T chez les patients atteints d'un syndrome du QT long de type 1 ou 5 a montré dans les 2 cas une onde T à large base (Figure 9) et une repolarisation qui ne se normalise pas à l'effort. Les accidents syncopaux et les morts subites surviennent principalement lors d'un stress physique[31]. Dans le cadre des syndromes du QT long de type 1 et 5, des mutations ont été identifiées respectivement sur les gènes *KCNQ1*, et *KCNE1.*

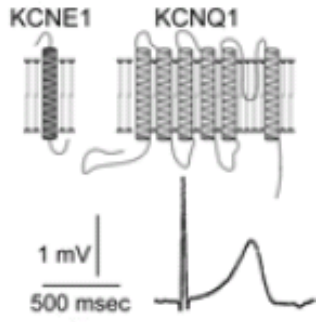



*Figure 9 : La protéine KvLQT1 est composée d'un seul domaine constitué de 6 segments transmembranaires. La protéine mink est constituée d'un seul segment transmembranaire. En bas, l'électrocardiogramme montre une onde T avec une large base.*
*(D'après Dumaine et Antzelevitch[34]).*

Le gène *KCNQ1* code pour la protéine KvLQT1 qui est constituée de 6 segments transmembranaires[17] (Figure 9). KvLQT1 est une sous-unité α d'un canal potassique voltage dépendent de type shaker qui nécessite le co-assemblage avec une sous-unité β (minK) pour fonctionner normalement[32]. Le courant $I_{Ks}$ généré par ce canal a un rôle essentiel dans la phase de repolarisation du potentiel d'action.

Il existe plus de 90 mutations sur le gène *KCNQ1* associées au syndrome du QT long de type 1. Les mutations de cette sous-unité semblent agir sur le canal de deux manières [33 34] :

- Soit par un effet dominant négatif. La sous-unité mutée est exprimée et empêche le canal de fonctionner[35]. En effet, les sous-unités sauvages

s'associent avec les sous-unités mutées pour former un canal qui n'est pas fonctionnel.

- Soit par une perte de fonction de la sous-unité. Les sous-unités mutées sont incapables de s'associer entre elles pour former un canal.

Le gène *KCNE1* code pour la protéine minK qui est constituée de 1 segment transmembranaire (Figure 9)

Les études électrophysiologiques des mutations de *KCNE1* montrent qu'elles sont à l'origine du syndrome du QT long congénital de type 5 via la protéine KvLQT1 par plusieurs mécanismes :

- Soit par une perte de fonction. Les mutations de *KCNE1* S74L[23 36], V47F[37] et W87R[37] altèrent les propriétés cinétiques de KvLQT1.
- Soit par un effet dominant négatif sur le complexe canalaire KvLQT1/minK [23 36 38].
- Soit en empêchant la formation du complexe canalaire[37].

Ces trois mécanismes vont provoquer une réduction du courant $I_{Ks}$ à l'origine de l'allongement du potentiel d'action.

### *I.1.2. Relation phénotype/génotype dans les syndromes du QT long de type 2 et 6*

L'étude de la forme de l'onde T chez les patients atteints d'un syndrome du QT long de type 2 ou 6 a montré dans les 2 cas une onde T de faible amplitude en DII et un aspect en double bosses (Figure 10), et une repolarisation qui ne se normalise pas à l'effort. Les accidents syncopaux et les morts subites surviennent principalement lors d'un stress sonore. Dans le cadre des syndromes du QT long de type 2 et 6, des mutations ont été identifiées respectivement sur les gènes *KCNH2*, et *KCNE2* codant pour les protéines HERG et MiRP1.

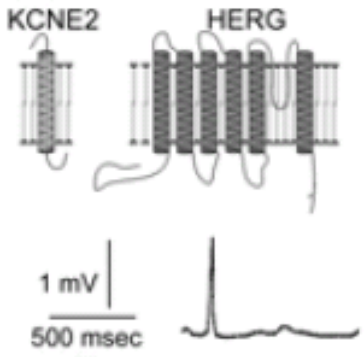



*Figure 10 : La protéine HERG est composée d'un seul domaine constitué de 6 segments transmembranaires. La protéine MiRP1 est constituée d'un seul segment transmembranaire. En bas, l'électrocardiogramme montre une onde T de faible amplitude en double bosse. (D'après Dumaine et Antzelevitch[34]).*

La structure de la protéine HERG codée par le gène *KCNH2* est similaire à celle de KvLQT1 (Figure 10). La caractérisation électrophysiologique et biophysique montre que *KCNH2* code pour une sous-unité α d'un canal potassique responsable du courant $I_{Kr}$[39].

Les études électrophysiologiques des mutations de *KCNH2* montrent qu'elles sont à l'origine du syndrome du QT long congénital de type 2 par plusieurs mécanismes :

- Soit par une perte de fonction de la protéine[40 41]. La protéine mutée possède des propriétés biophysiques altérées qui vont se traduire par une diminution du courant $I_{Kr}$, ralentissant la repolarisation de la cellule.
- Soit par un effet dominant négatif de celle-ci. Les sous-unités mutées exercent sur les sous-unités sauvages une dominance négative[42 43]. Kagan et coll. ont montré que dans le cas de la mutation A561V, l'effet dominant négatif se manifeste par la diminution de la synthèse et l'augmentation de la dégradation du canal HERG sauvage[44].
- Soit un défaut d'adressage. Les canaux mutés sont synthétisés, non glycosylés et retenus dans le réticulum endoplasmique, puis ils sont rapidement dégradés. Ils ne peuvent pas donc atteindre la membrane plasmique, entraînant une diminution du courant $I_{Kr}$ responsable de l'allongement du potentiel d'action[45 46].

- Soit par un gain de fonction de la protéine. La mutation N629D[47] altère l'inactivation et diminue la sélectivité du canal aux ions $K^+$ en faveur des ions $Na^+$. Cela devrait provoquer une augmentation du courant $I_{Kr}$. Mais en réalité, il y a une diminution du courant $I_{Kr}$ au profit d'un courant sodique repolarisant ce qui retarde la repolarisation et allonge l'espace QT du potentiel d'action[40].

Il semblerait que minK et la protéine HERG soient capables d'interagir. Mink agirait comme protéine chaperonne de HERG pour augmenter l'expression de la protéine HERG et donc du courant $I_{Kr}$[48].

La protéine HERG est la cible privilégiée des substances qui allongent l'espace QT telles que les anti-histaminiques, les anti-psychotiques, les antibiotiques et les anti-arythmiques. Si bien qu'aujourd'hui, toute nouvelle molécule est testée sur le canal avant d'envisager son développement clinique.

La structure de la protéine MiRP1 codée par le gène *KCNE2* est similaire à celle de minK (Figure 10).
Les études électrophysiologiques des mutations de *KCNE2* montrent qu'elles sont à l'origine du syndrome du QT long congénital de type 6 par plusieurs mécanismes :

- Les mutations décrites par Abbott et coll.[26], Q9E, M54T et I57T en s'associant avec HERG génèrent un courant qui s'active lentement et qui se désactive rapidement. La mutation V65M décrite par Isbrandt et coll.[49] en s'associant avec HERG génère un courant dont l'inactivation est accélérée. Dans les deux cas, on aboutit à une réduction du courant $I_{Kr}$ allongeant le potentiel d'action.
- Les mutants Q9E et I57T[26] réexprimés dans des cellules COS-7 sont capables de s'associer avec KvLQT1, et d'altérer ses propriétés cinétiques, diminuant ainsi le courant $I_{KS}$[50].

Jusqu'à présent, les mutations décrites seraient responsables de cas sporadiques de syndrome du QT long, mais aucune mutation n'a été retrouvée dans une famille. C'est la raison pour laquelle le rôle du gène *KCNE2* dans le syndrome du QT long congénital est encore discuté.

### *I.1.3. Relation phénotype/génotype dans le syndrome du QT long de type 3*

L'étude de la forme de l'onde T chez les patients atteints d'un syndrome du QT long de type 3 a montré une onde T retardée avec un long segment isoélectrique ST (Figure 11). La repolarisation de LQT3 est très anormale au repos et à tendance à se normaliser à l'effort. Les syncopes ou morts subites surviennent le plus souvent au repos voir pendant le sommeil. Dans le cadre du syndrome du QT long de type 3, des mutations ont été identifiées dans le gène *SCN5A*

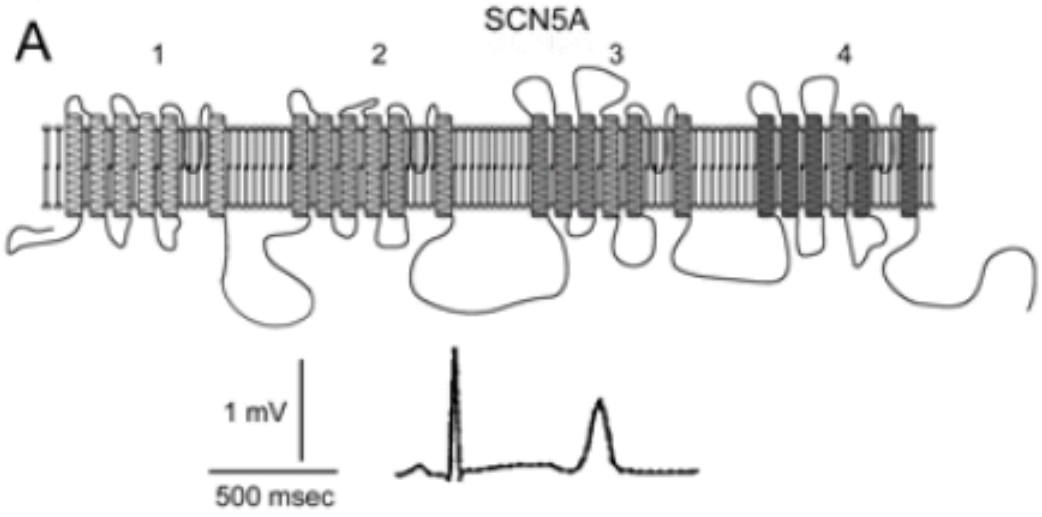



*Figure 11 : La protéine SCN5A est composée de 4 domaines constitués chacun de 6 segments transmembranaires. En bas, l'électrocardiogramme montre une onde T retardé avec un long segment isoélectrique ST. (D'après Dumaine et Antzelevitch[34]).*

Le gène *SCN5A* code la sous-unité α du canal sodique cardiaque voltage dépendant. Cette protéine est constituée de 4 domaines comprenant chacun 6 segments transmembranaires (Figure 11). Ce canal est responsable du courant $I_{Na}$ de la phase 0 du potentiel d'action.

Les études électrophysiologiques des mutations du gène *SCN5A* montrent que ces dernières sont à l'origine du syndrome du QT long congénital de type 3 par 3 mécanismes :

- Soit par un gain de fonction de la protéine :
  i. Un certain nombre de mutations sont à l'origine de ce gain de fonction[20 51 52]. Les études électrophysiologiques [53 54 55] ont montré que ce gain de fonction se manifeste par une inactivation incomplète des canaux. Ils ont une probabilité d'ouverture augmentée ce qui provoque un courant sodique résiduel qui annule le courant potassique entrant, prolongeant ainsi le potentiel d'action.
  ii. La mutation R1623Q décrite par Makita et coll.[56] provoque une inactivation incomplète des canaux. Ils ont un temps d'ouverture augmenté ce qui provoque un courant sodique résiduel qui annule le courant potassique entrant, prolongeant ainsi le potentiel d'action.

- Soit par une perte de fonction. La mutation D1790G décrite par An et coll.[57] en 1998 provoque un shift vers les potentiels négatifs de l'inactivation. En 2000, à partir de la modélisation du potentiel d'action d'après les paramètres et la technique décrits par Luo et Rudy[58], Wehrens et coll.[59] ont montré que l'allongement du potentiel d'action est dépendent du $Ca^{2+}$. Le nombre moins important de canaux sodiques pouvant s'ouvrir durant la dépolarisation (dû au déplacement de la courbe d'inactivation et à la cinétique d'inactivation plus rapide) a pour conséquence une phase 0 du potentiel d'action moins marquée. Ceci induit une plus grande entrée de $Ca^{2+}$ dans la cellule à travers les canaux calciques de type L ce qui entraîne une altération de tous les processus dépendant du potentiel aboutissant à l'allongement du potentiel d'action.

- La mutation E1295K décrite par Abriel et coll.[60] provoque un shift vers les potentiels positifs de l'activation et de l'inactivation, ce qui a pour résultat de prolonger le courant fenêtre de la phase 2 du potentiel d'action. Les courants potassiques entrants $I_K$ et $I_{K1}$ de la phase 3 ne sont alors plus capables de compenser ce courant sodique, ce qui prolonge le potentiel d'action. De

manière similaire, la même équipe a identifié une mutation du gène *SCN5A* (I1768V) qui augmente la disponibilité du canal en déplaçant la courbe d'inactivation vers les potentiels plus positifs et retarder ainsi la repolarisation[61].

Dans le cadre du syndrome du QT long de type 3, la mort subite semble avoir lieu préférentiellement lors de bradycardie (pendant le sommeil ou au repos) à l'inverse de tous les autres types de QT long qui semblent être dépendants de la stimulation adrénergique (lors d'un effort physique). En cas de bradycardie, l'allongement du potentiel d'action est tel qu'il y a réactivation des canaux $Ca^{2+}$ de type L. Ils vont alors pouvoir s'ouvrir et dépolariser la membrane générant une post-dépolarisation précose (ou EAD : Early After Depolarisation) qui va être à l'origine de l'épisode arythmogène.

### *I.1.4. Relation entre l'ankyrineB et le syndrome du QT long de type 4*

En 1995, Schott et coll. ont décrit une famille atteinte de troubles de la repolarisation cardiaque provoquant un allongement QT. L'étude de la morphologie de l'onde T chez les patients de cette famille a montré une onde T sinusoïdale (Figure 12). Outre l'allongement de l'intervalle QT, une bradycardie sinusale ou un rythme d'échappement jonctionnel ont été observés chez les 21 patients atteints de la famille. Chez les sujets âgés, des fibrillations auriculaires ont été diagnostiquées. Cette famille a permis l'identification d'un locus en 4q25-27. En 1995, il a été montré que *KCNH2*[19] et *SCN5A*[20] étaient responsables respectivement de LQT2 et LQT3. Compte tenu de ce qu'il était connu sur le syndrome du QT long, les canaux ioniques ou des protéines impliquées dans la repolarisation et l'automatisme cardiaque, pouvaient être de bons candidats. Cependant, aucun canal ionique n'était situé dans la zone de liaison. Différents gènes de la zone de liaison ont été exclus : le récepteur à l'endothéline A qui joue un rôle dans la régulation de la repolarisation et de l'automatisme cardiaque et la calmoduline kinase II qui est impliquée dans l'activation des canaux potassiques retardés entrants et dans la phosphorylation des canaux chlores[21].

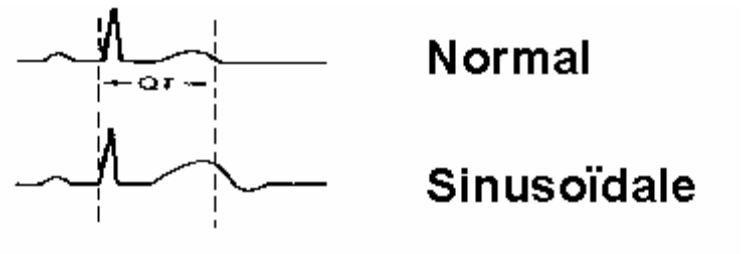



*Figure 12 : morphologie de l'onde T chez les patients atteints d'un syndrome du QT long de type 4*

L'ankyrine B fait partie de la famille des protéines d'ancrage de diverses protéines dans des domaines membranaires spécifiques[62 63]. Des études réalisées sur les souris invalidées pour le gène de l'*ankyrine B*[64 65 66], ont permis de montrer que l'ankyrine B étaient impliquées dans l'ancrage des protéines associées à l'homéostasie du calcium intracellulaire. Les souris *ankyrine B* (-/-) présentent une myopathie squelettique sans cardiopathie apparente cependant 80% d'entres elles meurent quelques jours après la naissance. Les souris *ankyrine B* (+/-) présentent sur l'ECG : une bradycardie sinusale comparable à celle observée chez l'homme. Les études électrophysiologiques des myocytes ventriculaires des souris *ankyrine B* (-/-) 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 ainsi que l'existence d'un courant sodique résiduel augmentant ainsi la durée du potentiel d'action à des rythmes lents. 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.

Compte tenu de ces données l'*ankyrine B* est devenu un bon candidat dans le cadre du syndrome du QT long de type 4. La mutation (E1425G) a été mise en évidence chez les patients atteints de ce syndrome. L'étude électrophysiologique de cette mutation de l'*ankyrine B* a été effectuée sur des cardiomyocytes de souris *ankyrine B* +/- et montrent que cette mutation est à l'origine d'anomalies dans le courant transitoire calcique, d'une perturbation et d'une diminution de l'expression de l'échangeur Na/Ca, de la pompe Na/K ATPase et du récepteur InsP(3)R. La signalisation calcique est aussi perturbée et provoquent des extrasystoles chez ces souris.

En 2004, Mohler et coll.[67] ont mis en évidence 4 autres mutations sur le gène de l'*ankyrine B* chez des individus atteints de différents types d'arythmies telles qu'une bradycardie, des tachycardies ventriculaires catécholergiques polymorphes et des fibrillations ventriculaires idiopathiques.

Toutes les mutations connues provoquent toutes une perte de fonction de la protéine. Ces résultats suggèrent que l'ankyrine B joue un rôle important dans la régulation des courants ioniques cardiaques et des transporteurs membranaires et est responsable de morts subites.

### *I.1.5. Relation entre KCNJ2 et le syndrome d'Andersen*

Le syndrome d'Andersen est une pathologie rare qui n'est pas une forme classique de QT long congénital, car il est caractérisé par un allongement de l'intervalle QT associé à une paralysie périodique sensible au potassium, ainsi qu'à un syndrome polymalformatif[68 69], mais le phénotype est très variable d'un individu à l'autre.

En 2001, Plaster et coll.[27] ont mis en évidence 7 mutations sur le gène *KCNJ2* (chromosome 17 : 17q23) responsables du syndrome d'Andersen.

Le gène *KCNJ2* code pour une sous-unité protéique du canal potassique Kir2.1. Cette sous-unité est caractérisée par une structure ne comprenant que 2 segments transmembranaires encadrant une boucle intramembranaire participant à la formation du pore (Figure 13). Ces protéines s'associent en tétramères pour former un canal à rectification entrante Kir. Kir2.1 présente une expression cardiaque marquée. Ces canaux sont responsables d'une composante du courant $I_{K1}$ essentiel au maintient du potentiel de repos et participent également à la fin de la phase de repolarisation des potentiels d'action.

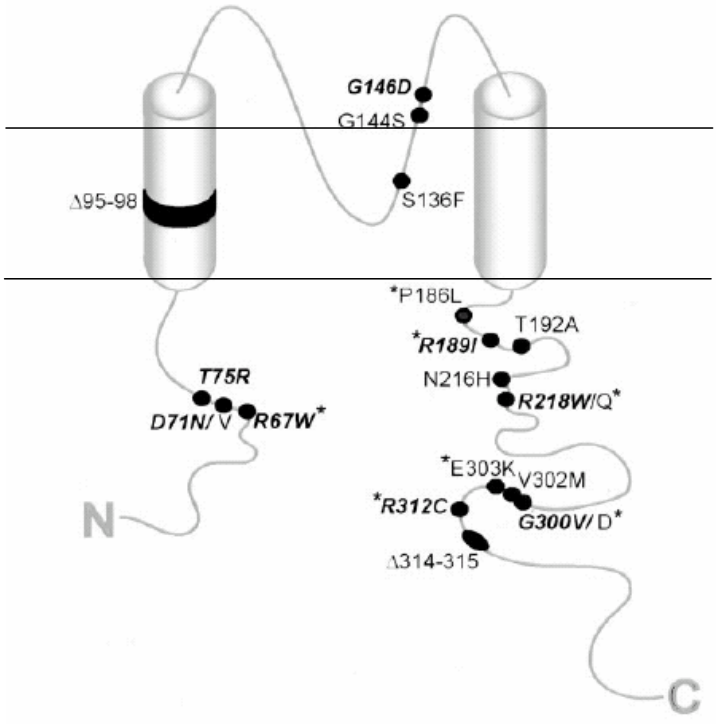



*Figure 13 : topologie de la sous unité du canal Kir2.1.*
*Cette protéine Kir2.1 est constituée de 2 segments transmembranaires. En noir, sont représentées les mutations responsables du syndrome d'Andersen.*
*(D'après Donaldson et coll.[70])*

Les études électrophysiologiques des mutations de *KCNJ2* montrent qu'elles sont à l'origine du syndrome d'Andersen. Elles provoquent toutes une perte de fonction de la protéine mais elles agissent à plusieurs niveaux :

- Soit par un effet dominant négatif. Les sous-unités mutées[71 72 73] exercent sur les sous-unités sauvages une dominance négative[27].
- Soit par une diminution de la probabilité d'ouverture. En effet, une diminution de l'interaction entre Kir2.1 et PIP2 est à l'origine d'une diminution de la probabilité d'ouverture du canal Kir2.1[74 70].
- Soit par un défaut d'assemblage du canal[75].
- Soit par l'effet conjugué d'un défaut d'assemblage du canal et un défaut d'adressage à la membrane[75].

Ces mutations perturbent le courant potassique rectifiant entrant $I_{K1}$ prolongeant la phase terminale du potentiel d'action.

Il existe cependant une hétérogénéité génétique du syndrome d'Andersen car dans certaines familles aucune mutation sur le gène *KCNJ2* n'a été mise en évidence.

Une mutation sur ce gène vient d'être identifiée comme responsable d'un syndrome du QT court dans une famille[76]. Le syndrome du QT court est une pathologie héréditaire. Les individus atteints par ce syndrome ont un coeur structurellement normal, mais ont un risque élevé d'arythmie et de mort subite dus à une repolarisation accélérée des myocytes. Cette repolarisation accélérée se traduit sur l'électrocardiogramme par un intervalle QT raccourci.

### *I.1.6. Relation entre CaCNA1C et le syndrome de Timothy*

Marks et coll.[77] avaient déjà décrit en 1995, un syndrome du QT long associé à une syndactylie. En 2004, Splawski et coll.[29] ont mis en évidence 1 mutation (G406R) chez 13 individus non apparentés sur le gène *CaCNA1C* (chromosome 12 : 12p23) responsables du syndrome de Timothy.

Le gène *CaCNA1C* code pour une sous-unité α (Cav1.2) d'un canal $Ca^{2+}$ de type L, caractérisée par une structure à 4 domaines comprenant chacun 6 segments transmembranaires (Figure 14). Cette sous-unité constitue seule, le pore. Les canaux calciques de type L sont responsables de l'entrée d'ions et du maintient du plateau du potentiel d'action ; ils initient aussi la contraction cellulaire. Ces canaux sont activés par une dépolarisation tandis que leur inactivation dépend du potentiel et du $Ca^{2+}$.

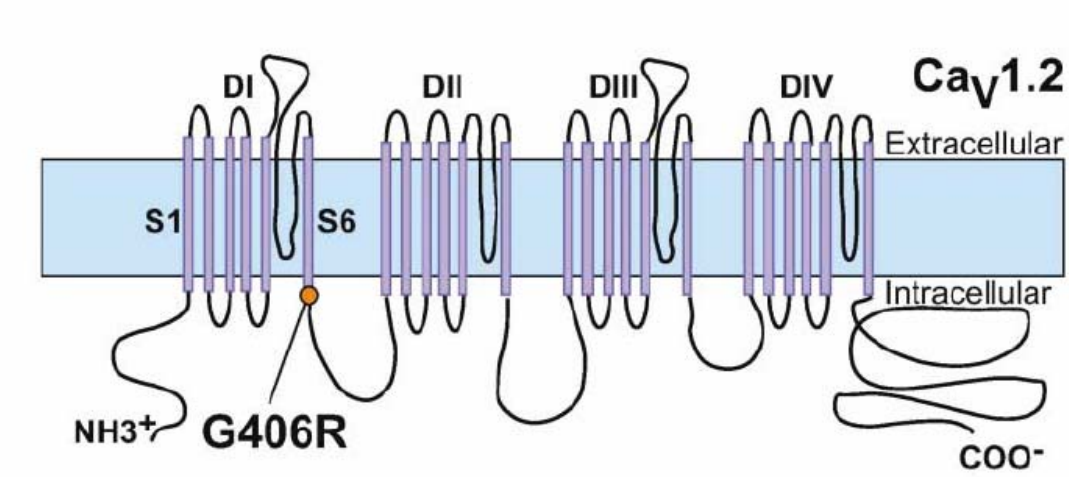



*Figure 14 : topologie de la protéine Cav1.2.*
*Cette protéine Cav1.2 est constituée de 4 domaines comprenant chacun 6 segments transmembranaires.*
*(D'après Splawski et coll.[29])*

L'étude électrophysiologique de la mutation G406R de *CaCNA1C* montre que cette dernière est à l'origine du syndrome de Timothy car elle provoque une altération de l'inactivation du canal. Ce dernier reste ouvert et maintient donc un courant entrant $Ca^{2+}$, allongeant ainsi le potentiel d'action[29].

Dans le cadre de l'étude du syndrome du QT long, j'ai été amenée à étudier une famille caractérisée par l'association d'un syndrome du QT long et d'un syndrome de Marfan qui semblaient coségreger.

## I.2. Etude phénotypique et génétique d'une famille atteinte des Syndromes de Marfan et du QTLong

Cette étude a fait l'objet d'une publication : Probst,V., Allouis,M., Kyndt,F., Lande,G., Trochu,J.N., Schott,J.J., and Le Marec,H. (2003). Cosegregation of the Marfan syndrome and the long QT syndrome in the same family leads to a severe cardiac phenotype. *Am. J Cardiol.,* 91, 635-637.

### *I.2.1. Le syndrome de Marfan*

Le syndrome de Marfan est une maladie génétique résultant dans la grande majorité des cas d'une mutation dans le gène de la *fibrilline 1*[80] (locus : 15q15-q21.3[81 82]). La fibrilline 1 est une protéine ubiquitaire qui se trouve associée avec les fibres d'élastine notamment dans la paroi vasculaire et les tissus valvulaires. Une anomalie de la *fibrilline 1* provoque une dysfonction des fibres élastiques qui se traduit par une diminution de la résistance des tissus de soutien. Un second gène *TGFBR2*[83] a été identifié dans une autre forme de Marfan liée au locus 3p24.2-p25[84]. Ce gène code pour le récepteur au TGF-β, qui est une cytokine, régulant divers processus cellulaires dont la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la formation de la matrice extracellulaire.

La transmission de la maladie se fait selon un mode autosomique dominant. Du fait de la grande variabilité de l'expression de la maladie responsable de la méconnaissance de nombreux cas la fréquence du syndrome de Marfan est difficile à apprécier: elle est estimé à 3-5/10 000, sans prédominance d'origine géographique ni de sexe, ce qui en fait une maladie rare[78].

Le diagnostic repose sur l'association de différents signes cliniques : il est de difficulté variable et il nécessite donc souvent la confrontation de l'avis de divers spécialistes.

L'atteinte est principalement musculosquelettique, oculaire, et cardio-vasculaire ; celle-ci conditionne le pronostique vitale.

Sur le plan cardiovasculaire, elle se traduit par une fragilité de la paroi aortique qui se dilate (principalement au niveau de la racine de l'aorte) progressivement au cours de la vie et risque de se disséquer. Avant que la chirurgie de remplacement de la racine de l'aorte ne soit réalisée environ 80% des patients mourraient des conséquences de la dilatation de l'aorte[78]. La deuxième complication cardiovasculaire classique du syndrome de Marfan est le prolapsus valvulaire mitrale qui peut aussi nécessiter une intervention chirurgicale.

### *I.2.2. Etude phénotypique*

Nous avons identifié une famille de 4 générations dans laquelle le syndrome de Marfan ségrége suivant un mode de transmission autosomique dominant chez 6 patients. Les patients remplissant tous les critères de Berlin décrits par Beighton et coll.[79], ont été considérés comme atteints d'un syndrome de Marfan.

En 1986, lors du Workshop du 7th International Congress of Human Genetics à Berlin, les critères diagnostiques pour le syndrome de Marfan ont été définis. Tous les systèmes susceptibles d'être atteints dans ce syndrome ont été recensés puis, des signes cliniques majeurs et mineurs selon le type d'atteinte ont été définis, enfin la présence d'un certain nombre de signes cliniques dans un système a permis de définir si celui-ci est atteint ou pas (Tableau 1).

Pour poser le diagnostique du syndrome de Marfan selon les critères de Berlin, il faut retrouver chez le patient les signes suivants :

- En l'absence d'un parent direct porteur d'un syndrome de Marfan, il faut une atteinte du squelette et d'au moins 2 autres systèmes, avec la présence d'au moins un signe majeur.
- Si un parent direct est porteur du syndrome de Marfan, une atteinte d'au moins 2 systèmes doit être retrouvée. La présence d'une manifestation majeure est souhaitée, mais ce dernier point est à moduler en fonction du morphotype de la famille.

| Système | Signes cliniques majeurs | Signes cliniques mineurs |
|---|---|---|
| Squelette | | ▪ Déformation thoracique telle pectus excavatum ou carinatum<br>▪ Dolichosténomélie qui n'est pas la conséquence d'une scoliose<br>▪ Pied plat<br>▪ Arachnodactylie<br>▪ Anomalie de la colonne vertébrale (Scoliose, lordose thoracique ou diminution de la cyphose thoracique, cyphose thoracique ou thoraco-lombaire, spondylolisthésis)<br>▪ Grande taille, surtout en comparaison de parents non atteints<br>▪ Palais ogival<br>▪ Chevauchement des dents<br>▪ Protusion acétabulaire<br>▪ Hyperlaxité ligamentaire (contracture congénitales en flexion – Hypermobilité) |

| | | |
|---|---|---|
| Oculaire | Ectopie du cristallin | ▪ Cornée plate<br>▪ Globe oculaire allongé<br>▪ Décollement rétinien<br>▪ Myopie |
| Cardio-vasculaire | ▪ Dilatation de l'aorte ascendante<br>▪ Dissection aortique | ▪ Insuffisance aortique<br>▪ Insuffisance mitrale due à un prolapsus valvulaire sur valves myxoïdes<br>▪ Prolapsus valvulaire mitrale sur valves mixoïdes<br>▪ Calcifications de l'anneau mitral<br>▪ Anévrisme de l'aorte abdominale<br>▪ Troubles du rythme<br>▪ Endocardite<br>▪ Prolapsus valvulaire mitrale sans évidence d'anomalie tissulaire mitrale |
| Poumons | | ▪ Pneumothorax spontané<br>▪ Bulle apicale<br>▪ Syndrome restrictif dû à une déformation thoracique<br>▪ Emphysème pulmonaire |
| Peau et téguments | | ▪ Vergetures sans causes évidentes (grossesse, perte de poids, exercice intense)<br>▪ Hernies récidivantes, Hernie inguinale, Hernie sur cicatrice<br>▪ Autres hernies (ombilicale ou hiatale) |
| Système nerveux central | | ▪ Ectasie de la dure mère<br>▪ Méningocèle lombo-sacré<br>▪ Elargissement du canal lombaire et spina bifida<br>▪ Troubles de l'apprentissage<br>▪ Hyperactivité |

*Tableau 1 : critères diagnostiques du syndrome de Marfan définis dans le Workshop du 7th International Congress of Human Genetics à Berlin*

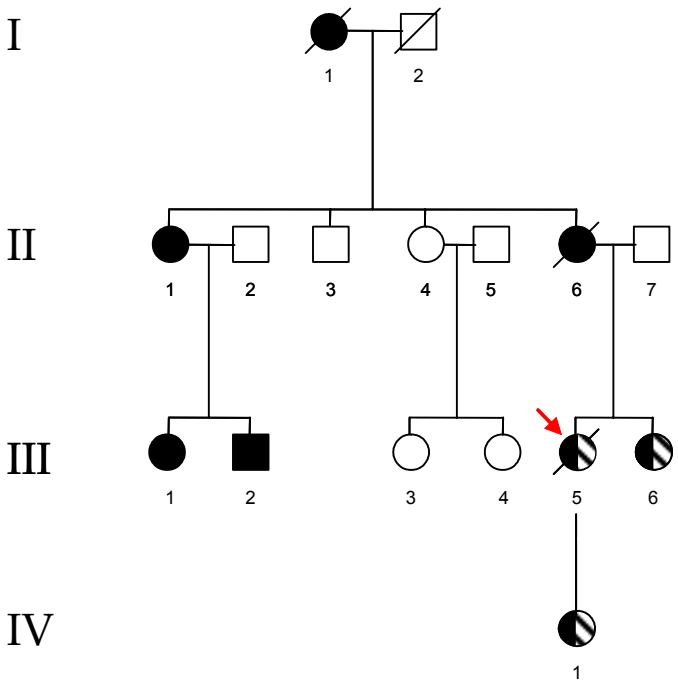



*Figure 15: arbre généalogique de la famille No.*
*Les cercles représentent les femmes, les carrés, les hommes, les symboles vides, les individus sains, les symboles barrés, les individus décédés,les symboles noirs, les individus atteints du syndrome de Marfan et les symboles hachurés, les individus atteints d'un syndrome du QT long. Le propositus est désigné par la flèche rouge.*

Parmi ces 6 patients atteints d'un syndrome de Marfan typique, 3 sujets appartenant à la même branche familiale présentent un syndrome du QT long (Figure 15).

Le propositus (III-5) est une jeune femme née en 1978. A 10 ans, elle a été diagnostiquée comme atteinte à la fois d'un syndrome du QT long et d'un syndrome de Marfan. A cet âge, elle avait une grande taille et une silhouette gracile (1,40m pour 27 kg) et une hyper-laxité ligamentaire. L'échocardiographie montrait un prolapsus bivalvulaire avec une insuffisance mitrale nette et une dilatation de l'aorte initiale. L'ECG montrait un allongement du segment QT ($QT_c$ à 600ms) avec des ESV et des salves de tachycardies ventriculaires. Bien qu'elle fût asymptomatique, un traitement β-bloquant avait été mis en place. Elle est restée asymptomatique, jusqu'à l'âge de 20 ans. En 1998, l'examen clinique montre une taille normale (1,70 m), une hyper-laxité ligamentaire, une lordose thoracique ainsi que des vergetures. L'échocardiographie montre une dilatation du ventricule gauche (dimension télédiastolique du ventricule gauche 67 mm), un prolapsus et une fuite mitrale. Il n'a pas de dilatation du sinus aortique (Figure 16).

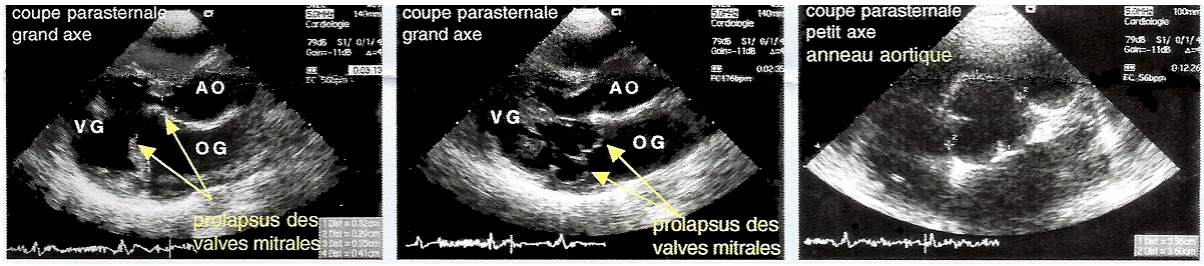



*Figure 16 : échocardiographies de la patiente III-5 de la famille No.*
*VG=ventricule gauche, AO= aorte, OG=oreillette gauche.*

L'ECG montre une bradycardie sinusale (50 bpm), un allongement du segment QT (QTc à 500 ms), avec une onde négative T anormale en V3, V4, V5 et V6 mais sans arythmie (Figure 17 A). Durant son 3$^{ème}$ mois de grossesse, elle a été hospitalisée pour cerclage utérin. Pendant l'anesthésie, l'ECG montrait des extrasystoles ventriculaires (ESV) et des salves de torsades de pointes qui débutaient après un intervalle RR long (Figure 17 B). Compte tenu d'une kaliémie basse ($K^+$ sanguin 3,5 mmol/l), de l'impossibilité de l'augmenter par supplémentation et de la bradycardie qui serait à l'origine des arythmies, il a été décidé de lui implanter un pacemaker AAI (biotronik) réglé à 80/minute Les arythmies ventriculaires ont totalement disparu jusqu'à la fin de la grossesse, concomitantes d'une normalisation partielle du QT.

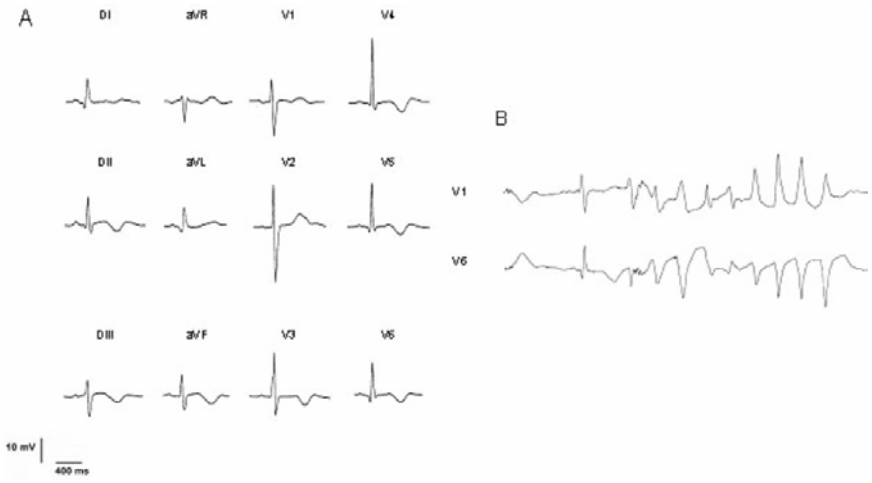



*Figure 17 : électrocardiogrammes de la patiente III-5 de la famille No.*
*A : électrocardiogramme de base. B : torsades de pointes.*

L'individu (IV-1), l'enfant du propositus est né par césarienne 1 mois avant terme. Quelques jours après la naissance, l'examen clinique du bébé a montré qu'il présentait les signes cliniques du syndrome de Marfan notamment l'hyperlaxité ligamentaire. L'échocardiographie a montré un prolapsus des valves mitrales associé à une fuite mitrale, une dilatation du sinus aortique (13 mm) et une dilatation modérée du ventricule gauche (dimension télédiastolique du ventricule gauche 34 mm). Son électrocardiogramme a permis de mettre en évidence un allongement du QT ($QT_c$ 450ms) avec une onde T anormale en D1, D2, V5 et V6.

Deux semaines après son accouchement, la patiente III-5 a fait plusieurs syncopes et a refusé de se faire hospitaliser pour évaluer son risque d'arythmie. Un mois après, elle décédait subitement.

La soeur du propositus (III-6) a été diagnostiquée à l'âge de 6 ans comme atteinte à la fois d'un syndrome du QT long et d'un syndrome de Marfan. L'échocardiographie montrait un prolapsus des valves mitrales associé à un prolapsus des valves tricuspides et aortiques sans fuite et une légère dilatation du sinus aortique (22 mm). L'ECG montrait un allongement du QT ($QT_c$ 500ms). En 1998, l'échocardiographie montre une dilatation du ventricule gauche (dimension télédiastolique du ventricule gauche 60 mm), un prolapsus des valves mitrales mais pas de dilatation du sinus aortique. Tout comme sa soeur, elle a commencé à faire des syncopes, son ECG montrait des tachycardies qui débutent après un long intervalle RR. Compte tenu de sa bradycardie, il a été décidé de lui implanter un pacemaker. Après le décès de sa soeur, un défibrillateur automatique lui a été implanté même si elle était asymptomatique.

La mère (II-6) et la grand-mère (I-1) du propositus sont toutes les deux mortes subitement à l'âge de 40 ans. Elles étaient atteintes toutes deux d'un syndrome de Marfan.

Les patients II-1, III-1 et III-2 ont typiquement un phénotype de Marfan sans dilatation cardiaque, mais ne présentent pas d'allongement du segment QT caractéristique d'un syndrome du QT long.

Le patient II-7 n'a pas le phénotype d'une personne atteinte d'un syndrome de Marfan et son échocardiographie et son ECG sont normaux.

### *I.2.3. Etude génétique*

Au début de l'analyse génétique de la famille, nous savions que la mère du propositus était atteinte d'un syndrome de Marfan et qu'elle était morte subitement, probablement de troubles du rythme car il n'y avait pas eu de douleurs thoraciques caractéristiques de dissection avant le décès survenu dans le cabinet du médecin. Le père du propositus étant apparemment sain mais n'avait pas été vu, nous avions alors émis l'hypothèse que la mère souffrait d'un syndrome du QT long associé à un syndrome Marfan et qu'elle avait transmis ces deux atteintes à sa descendance. Nous étions donc en présence d'une famille qui possédait 2 gènes morbides à priori proches puisque la coségrégation était complète sur trois générations, dans l'autre branche familiale, du fait de probables recombinaisons génétiques, nous n'avions plus qu'un seul syndrome. A l'époque, en l'absence de séquençage systématique, et en présence d'une famille informative sur le plan haplotypique, nous avons utilisé le syndrome de Marfan comme marqueur génétique pour identifier gène responsable du QT long.

En première approche, j'ai testé, par analyse de liaison, les locus et les gènes déjà connus pour être liés au syndrome de Marfan :

- le gène de *la fibrilline 1*[80] (15q15-q21.3[81 82])
- le gène du *TGFBR2*[83] (3p24.2-p25[84])
- 5q23-31[85]

Aucun de ces locus n'était lié au syndrome de Marfan de cette famille. Nous étions donc en présence d'une famille dont le syndrome de Marfan n'était lié à aucun des gènes déjà connus.

J'ai ensuite testé par analyse de liaison, les locus et les gènes déjà connus pour être liés au syndrome du QT long. L'haplotype correspondant au locus du gène *KCNH2* (HERG) présent chez les patients III-5 et III-6 provient de leur père et non de leur mère. Ce locus n'était pas lié au syndrome du QT long, dans cette famille. J'ai ensuite testé l'informativité statistique de cette famille en calculant le lod score théorique (3,3 à .0% de recombinaison). Bien que ce lod score théorique soit à la limite de l'informativité, j'ai décidé de réaliser une analyse de liaison sur génome

entier. Cette étude ne m'a pas permis de mettre en évidence de locus pour le syndrome de Marfan.

Compte tenu de l'aspect de l'onde T en double bosse, typique d'un syndrome du QT long de type 2, j'ai testé le gène *KCNH2* uniquement dans la branche familiale atteinte des 2 syndromes. Le locus de *KCNH2* coségrègait chez les 3 patients atteints du syndrome du QT long et du syndrome de Marfan mais pas chez les membres de la branche atteinte isolément du syndrome de Marfan. C'est pourquoi, j'ai décidé de séquencer le gène *KCNH2*. J'ai identifié la mutation A2847G dans l'exon 12 responsable de l'apparition d'un codon stop prématuré en position 927 de la protéine Herg (Figure 18).

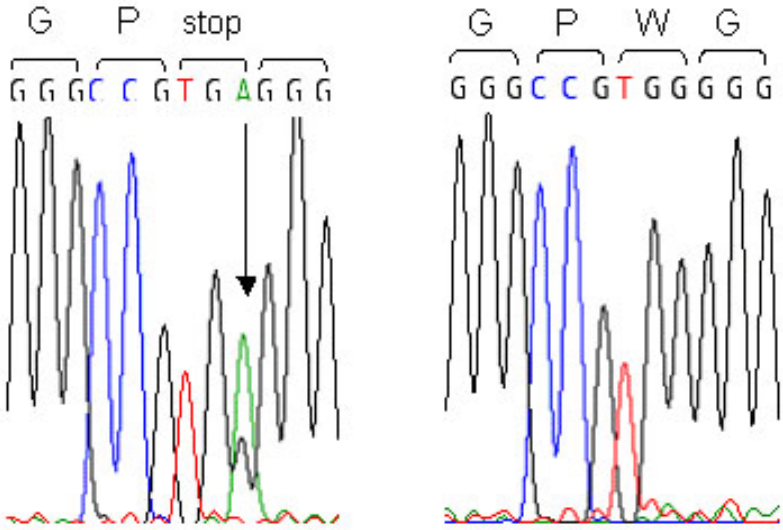



*Figure 18 : mutation A2847G dans l'exon 12 du gène KCNH2 de la famille No.*
*A droite la séquence mutée et à gauche la séquence normale.*

La recherche de cette mutation chez toute la branche familiale atteinte du QT long, a montré que le père du propositus, bien qu'asymptomatique, était le transmetteur de la pathologie. Par la suite, nous avons appris que le frère de ce dernier avait fait une mort subite. Le syndrome de Marfan et le syndrome du QT long dans cette branche de la famille coségrège donc de façon fortuite.

## I.3. Discussion

Dans cette famille, le syndrome de Marfan se retrouve coségrégeant chez 3 individus avec le syndrome du QT long. Mais cette coségrégation est fortuite. En effet, il n'y a que chez ces 3 patients que la mutation W927ter du gène KCNH2 a été retrouvée.

L'histoire clinique de cette famille montre que l'association de ces 2 syndromes aggrave probablement le phénotype de ces patients. En effet, nous avons pu observer une dilatation ventriculaire inhabituelle chez les patients atteints de ces 2 syndromes et une récurrence des syncopes, nécessitant l'implantation d'un défibrillateur chez 1 de ces 3 patientes. Ces dernières semblent avoir un risque rythmique plus élevé qu'habituellement admis pour des patients atteints d'un syndrome du QT long. Ce risque pourrait être notamment augmenté par la dilatation ventriculaire observée uniquement ces patientes et qui faciliterait la survenue de tachycardie ventriculaire.

Normalement dans le cadre du syndrome de Marfan, la grossesse n'augmente que très faiblement le risque de dissection aortique[78]. En revanche, dans le cadre du syndrome du QT long, un étude chez la femme enceinte[86] a montré que 10% des femmes avaient leurs premiers évènement rythmique lors de la période post-partum. Les auteurs de cette étude proposent plusieurs raisons à l'augmentation du risque rythmique :

- L'augmentation de l'activité sympathique peut favoriser la survenue de tachycardie ventriculaire.
- Les taux élevés d'oestrogènes et de progestérones pourraient amplifier les réponses adrénergiques et aussi influencer le nombre et la fonction du canal muté.
- Au cours de la grossesse et notamment au premier trimestre, le rythme cardiaque est accéléré ce qui a un effet protecteur dans le cadre du syndrome du QT long. En effet, les patients atteints de ce syndrome ont un allongement de l'intervalle QT à un rythme cardiaque lent. Lors de la période post-partum, le rythme cardiaque diminue et l'intervalle QT augmente à nouveau, risquant ainsi de déclencher des arythmies.

- Le stress psychologique et la fatigue peuvent aussi contribuer à l'augmentation de survenue d'évènement d'origine adrénergique.

Cependant dans cette étude, aucune analyse génétique n'a été effectuée. Les auteurs n'ont donc pas pu déterminer l'influence des gènes mutés sur la survenue d'évènement rythmique lors de la période post-partum.

Dans cette famille, le syndrome de Marfan n'est pas lié aux locus déjà identifiés dans cette pathologie, ce qui nous laisse suggérer que ce syndrome possède une hétérogénéité génétique plus importante que ce qu'il est admis. Ceci est confirmé par l'existence de d'autres familles atteintes du syndrome de Marfan où aucune mutation sur le gène de la *fibrilline 1* ni sur celui du *TGFBR2* n'a été retrouvée[83].

L'analyse du génome entier n'ayant pas permis de mettre en évidence un nouveau locus, cela nous a suggéré que nous étions peut-être face à une forme de maladie de Marfan moins pénétrante que ce qui est connu dans le cas de mutation sur les gènes de la *fibrilline 1* ou du *TGFBR2*[78]. Nous avons tenté d'agrandir la famille, mais aucun autre individu avec un phénotype typique Marfan n'a été identifié.

L'analyse phénotypique nous a montré que l'association de ces 2 syndromes aggravait le phénotype, et augmentait le risque d'évènement rythmique avec des pics lors de la grossesse et de la période post-partum.

L'analyse génétique de cette famille nous a, quant à elle montré qu'il était possible que 2 pathologies rares telles que le syndrome du QT long et la maladie de Marfan puissent coségréger, le syndrome de Marfan étant ici le résultat d'un gène défectueux non encore identifié. La mise en commun de nos données avec celles des autres équipes pourra peut-être permettre de mettre en évidence un nouveau gène impliqué dans le syndrome de Marfan.

## *II. Tachycardies ventriculaires catécholergiques*

Une nouvelle entité clinique de tachycardies ventriculaires graves chez l'enfant a été décrite par l'équipe de Lariboisière et un suivi sur 7 ans de 21 patients a été publié en 1995 par Leenhardt et coll.[87]. Ces patients présentaient des tachycardies ventriculaires induites par un stress physique ou émotionnel, en l'absence d'anomalie structurelle du coeur et de pathologies responsables de tachycardie ventriculaire telles que le syndrome du QT long congénital ou du syndrome de Brugada.

Les tachycardies ventriculaires catécholergiques sont des troubles du rythme souvent découvert dès le jeune âge mais qui affectent aussi l'adulte sans cardiopathie provoquant des syncopes prolongées ou des équivalents convulsifs déclenchés de façon répétitive et reproductible par l'effort ou l'émotion.

L'électrocardiogramme standard est normal mais une bradycardie sinusale est fréquente au repos, parfois un léger allongement du QT peut être noté.

Au début de l'effort des extrasystoles ventriculaires apparaissent d'abord isolées et monomorphes puis polymorphes et en salves. L'aspect le plus caractéristique de l'arythmie est la tachycardie ventriculaire bidirectionnelle qui peut évoluer vers une tachycardie ventriculaire polymorphe régressive pouvant, à tout moment, dégénérer en fibrillation ventriculaire. Cette tachycardie ventriculaire bidirectionnelle est identique à celle retrouvée lors des intoxications digitaliques sévères.

Il s'agit d'un trouble du rythme rare, souvent méconnu, beaucoup moins fréquent que le syndrome du QT long. Ce trouble du rythme n'est pas observé chez le nourrisson. Les extrasystoles ventriculaires d'effort et les syncopes peuvent apparaître dans la grande enfance. Une étude sur 49 cas de morts subites inexpliquées chez des sujets jeunes a montré que parmi eux 7 individus (14%) étaient porteurs d'une mutation sur le gène du récepteur à la ryanodine qui est responsable d'une des formes de cette maladie[88].

Ces descriptions ont été réalisées à partir de cas isolés et il est fort possible qu'elles ne décrivent que les formes majeures de la maladie. Avec l'identification des gènes morbides il devenait important d'identifier de grandes familles pour réaliser

l'analyse des relations phénotype/génotype et étudier plus particulièrement la variabilité de l'expression de cette maladie.

## II.1. Relation gènes/fonction dans les tachycardies ventriculaire catécholergiques

Le caractère héréditaire de ce trouble du rythme a été démontré, mais ce n'est qu'en 1999 que Swan et coll.[89] ont décrit les premières grandes familles de tachycardies ventriculaires polymorphes, permettant une approche de génétique inverse. Depuis cette description, 2 gènes ont été mis en évidence:

- Le gène du récepteur à la ryanodine de type 2 ou cardiaque[90] (*RyR2*)
- Le gène de la calséquestrine 2 [91] (*CASQ2*)

### *II.1.1. Relation entre le récepteur à la ryanodine de type 2 et les tachycardies ventriculaires catécholergiques*

En 1999, Swan et coll.[89] ont décrit deux familles atteintes de tachycardies ventriculaires catécholergiques ségrégant selon un mode autosomique dominant. C'est dans ce contexte qu'un locus en 1q42-43 sur le chromosome 1 a été identifié. Le récepteur à la ryanodine 2[92] (*RyR2*) qui avait déjà été cloné chez le lapin[93] était un bon candidat positionnel et fonctionnel.

Il existe 3 isoformes du récepteur à la ryanodine. RyR1 est l'isoforme majoritaire dans le muscle squelettique et RyR3 est l'isoforme ubiquitaire. La protéine RyR2 est quant à elle l'isoforme majoritaire du coeur, et forme un canal du réticulum sarcoplasmique responsable du relarguage de $Ca^{2+}$ intracellulaire des cardiomyocytes. Le complexe canalaire RyR2 est composé de 4 sous-unités et de nombreuses protéines accessoires dont FKBP12.6 et la PKA qui sont des protéines importantes dans la régulation du canal RyR2. En effet chaque monomère RyR2 est associé à une protéine FKBP12.6 ou calstabine2 qui stabilise le canal dans son état fermé. Lors d'une activation par le système sympathique la PKA phosphoryle un site

d'un des monomères RyR2, le dissociant partiellement de la protéine FKBP12.6, ce qui augmente sa probabilité d'ouverture et son activation[94].

La contraction cardiaque résulte de la dépolarisation membranaire et de l'entrée de $Ca^{2+}$ par les canaux calciques de type L. La quantité de $Ca^{2+}$ qui entre dans la cellule n'est pas suffisante pour déclencher directement la contraction, mais elle entraîne une libération des stocks intracellulaires via les canaux de relarguage (RyR2) présents sur la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ces canaux sont situés dans une zone appelée triades, en face des canaux L dans les invaginations de la membrane plasmique (tubule T). L'augmentation de $Ca^{2+}$ libre dans le cytoplasme déclenche la contraction.

Compte tenu de ces données, *RyR2* est devenu un candidat pour les tachycardies ventriculaires catécholergiques. Trois mutations (P2328S, Q4201R et V4653F) ont été mises en évidence dans 3 grandes familles Finlandaises[90] et 4 autres mutations (S2246L, R2474S, N4104K et R4497C) ont été identifiées dans des familles Italiennes[95].

Bien que le mécanisme précis de déclenchement des tachycardies ventriculaires catécholergiques ne soit pas complètement élucidé, les mutations du gène *RyR2* agiraient à plusieurs niveaux :

- Elles pourraient intervenir au niveau de la liaison entre RyR2 et FKBP12.6. Pendant la phase de repos, la liaison entre FKBP12.6 et RyR2 permet à ce dernier de maintenir le canal fermé et d'empêcher toute libération du $Ca^{2+}$ sarcoplasmique[96]. Cependant si la liaison entre ces deux protéines est altérée, le complexe canalaire RyR2 devient perméable au $Ca^{2+}$ pendant la diastole. Cette surcharge calcique serait à l'origine de post-dépolarisations tardives (post-dépolarisation retardée ou DAD, Delayed After Depolarisation : oscillation du potentiel membranaire de repos du potentiel d'action) pouvant déclencher des tachycardies ventriculaires[97 98].

- Les protéines RyR2 mutées (S2246L, N4104K et R4497C[95]) étudiées par Georges et coll.[99] ont des caractéristiques identiques à la protéine sauvage mais lorsque le cardiomyocyte est activé, les protéines RyR2 mutantes libèrent davantage de $Ca^{2+}$ et cela sans l'intervention de FKBP12.6 ni de la PKA.

- La protéine RyR2 mutée (R4497C[95]) étudiée par Jiang et coll.[100] a une activité basale et une sensibilité au $Ca^{2+}$ augmentées par rapport à la protéine sauvage.

- Thomas et coll.[101] ont étudié 4 mutations (L433P, N2386I, R176Q et T2504M[102]). Les protéines mutées N2386I, R176Q et T2504M sont activables par la caféine rendant ces protéines hypersensibles au $Ca^{2+}$ provoquant une libération très importante de $Ca^{2+}$. En revanche, la protéine mutée L433P a perdu cette sensibilité à la caféine, mais quand la cellule est activée, elle libère davantage de $Ca^{2+}$ que la protéine sauvage.

Ces études montrent que toutes les mutations provoquent par différents moyens une augmentation de $Ca^{2+}$ cytoplasmique pendant la phase diastolique qui va être à l'origine du déclenchement de la tachycardie ventriculaire.

Des mutations sur le gène *RyR2* sont responsables de tachycardies ventriculaires catécholergiques mais aussi de dysplasie arythmogène du ventricule droit (ARVD2)[102 103 104]. Cette pathologie est également responsable de tachycardies ventriculaires mais le coeur des patients atteints présente des infiltrats fibro-adipeux. D'après Bauce et coll.[105], l'ARVD2 pourrait être une évolution des tachycardies ventriculaires catécholergiques. En effet les mutations du gène *RyR2* perturberaient le métabolisme du $Ca^{2+}$, provoquant ainsi la mort cellulaire par nécrose ou apoptose menant avec le temps à une ARVD2.

### *II.1.2. Relation entre la calséquestrine 2 et les tachycardies ventriculaire catécholergiques*

En 2001, Lahat et coll.[106] décrivent 7 familles bédouines où les tachycardies ventriculaires catécholergiques ségrégent selon le mode autosomique récessif. Grâce à ces 7 familles, ils mettent en évidence un locus en 1p13-21. Cette même équipe découvre une mutation (D307H) dans le gène de la calséquestrine 2 (CASQ2) responsable des tachycardies ventriculaires catécholergiques dans ces familles Bédouines[91]. L'implication de la *CASQ2* dans les tachycardies ventriculaires catécholergiques a été confirmée par la découverte de 3 autres mutations[107]. Il est à noter que l'une d'entre elles a été retrouvée à l'état hétérozygote chez une patiente présentant des tachycardies ventriculaires catécholergiques.

Le gène de la calséquestrine 2 (*CASQ2*) code pour une protéine du réticulum sarcoplasmique, qui joue un rôle majeur dans la rétention du calcium lors de la phase diastolique des cellules cardiaques. La CASQ2 s'associe au calcium et le retient dans le réticulum sarcoplasmique. Elle est aussi impliquée dans la libération du calcium avec RyR2, la junctine et la triadine via des interactions protéines-protéines[108].

Viatchenko-Karpinski et coll.[109] ont réexprimé la mutation D307H dans des myocytes de rat. Cette mutation réduit la capacité de stockage de calcium de la CASQ2, et perturbe son mécanisme de libération dans le cytoplasme. En effet, lors d'une stimulation adrénergique, la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique SERCA augmente son activité pour recharger les stocks de calcium sarcoplasmique tandis que RyR2 est plus facilement activable et peut donc s'ouvrir avant la fin de la diastole. Ce phénomène est responsable d'une surcharge calcique du cytoplasme à l'origine de post-dépolarisation retardée[110].

## II.2. Etude phénotypique et génétique d'une famille atteinte de tachycardies ventriculaires catécholergiques

Cette étude a fait l'objet d'une publication : Allouis,M., Probst,V., Jaafar,P., Schott,J.J., and Le Marec,H. (2005). Unusual clinical presentation in a family with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia due to a G14876A ryanodine receptor gene mutation. *Am. J Cardiol.,* 95, 700-702.

### *II.2.1. Etude phénotypique*

Après de multiples syncopes, le propositus, une jeune fille âgée de 15 ans (IV-12) est adressée par le SAMU à l'unité de soins intensifs de cardiologie du CHU de Nantes pour arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire. Malgré deux heures de réanimation et une récupération transitoire d'un rythme cardiaque anarchique, elle décèdera. Auparavant, elle avait consulté un cardiologue pour ses multiples syncopes. Ce dernier après avoir effectué un électrocardiogramme et une échocardiographie qui se sont avérés normaux (Figure 19), a conclut à des syncopes d'origine vagale.

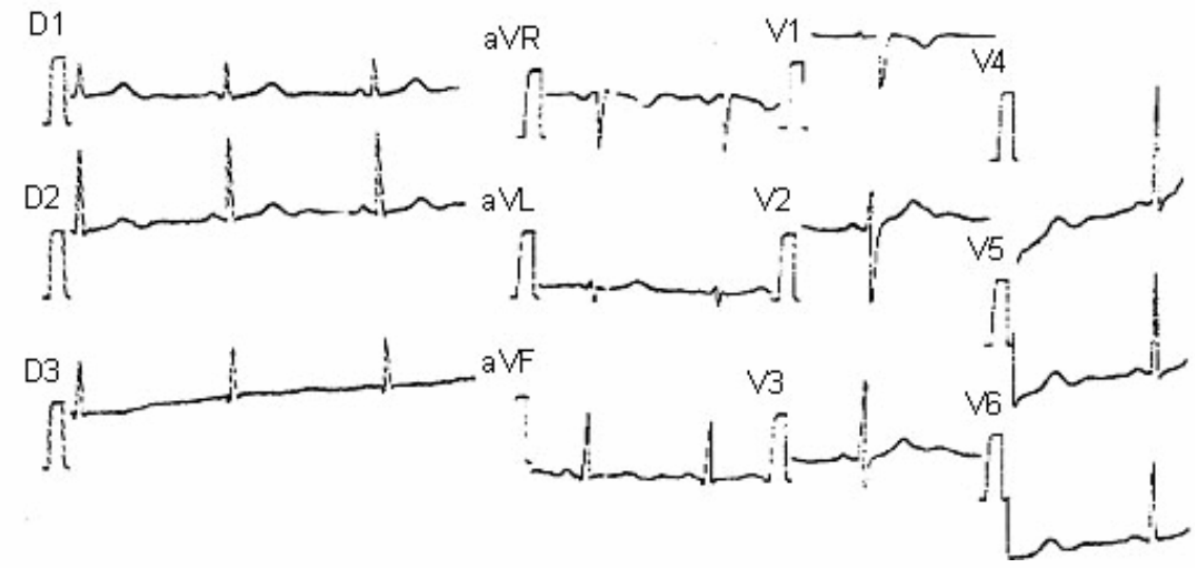



*Figure 19 : électrocardiogramme basal du propositus (IV-12) de la famille Re. QTc=460ms*

L'enquête familiale a montré que 5 personnes étaient décédées de mort subite et que la soeur du propositus avait fait des malaises. En effet, cette dernière, âgée de 11 ans (IV-11), faisait des pertes de connaissance liées au stress. Tout comme sa soeur, ses examens électrocardiographiques et échocardiographiques étaient normaux. Compte tenu des symptômes, de la mort subite de sa soeur et de la suspicion d'un syndrome de QT long de type 2, elle a été mise sous traitement β-bloquant. Depuis son traitement sous β-bloquant, elle n'a fait aucune syncope. Son Holter montre de rares extrasystoles ventriculaires (ESV) monomorphes. La mère du propositus (III-10) âgée de 39 ans, a eu sa première syncope à 27 ans. Elle est restée complètement asymptomatique jusqu'à l'enquête familiale. Son ECG au repos était normal. Au cours de l'épreuve d'effort, elle n'a fait aucune ESV, ni à l'effort, ni pendant la période de récupération. Lors du Holter, elle a présentée des ESV isolées ainsi que 3 salves d'ESV monomorphes. La tante du propositus (III-14), âgée de 32 ans avait une histoire de syncopes à l'effort depuis l'âge de 20 ans. L'enregistrement du Holter, tout comme le test à l'effort a montré des ESV monomorphes.
L'individu IV-13, un garçon de 12 ans, sans histoire syncopale est décédé en cours d'étude. Son examen clinique et son ECG étaient normaux. L'autopsie n'a rien révélé d'anormal. La patiente III-16 est décédée à 32 ans. Elle était connue pour avoir des syncopes notamment à l'effort. Sa fille (IV-15) âgée de 13 ans a eu sa première syncope à l'âge de 12 ans pendant un effort. Son ECG était normal, l'enregistrement du Holter montre des ESV polymorphes et le test d'effort montre des triplets d'ESV avec une morphologie typique d'arythmie ventriculaire bidirectionnelle.

Le diagnostic de tachycardie ventriculaire catécholergique de cette famille a été confortée par l'identification d'une nouvelle branche familiale grâce au patient IV-1. En effet ce dernier, un garçon de 10 ans, qui était asymptomatique jusqu'à l'âge de 7 ans, a été réanimé après une mort subite en piscine. Le test d'effort montrait des triplets d'ESV polymorphes et des doublets bidirectionnels.

Les tests d'effort réalisés chez les patients III-2, III-6, IV-5, et IV-6 ont montré des tachycardies ventriculaires polymorphes ou bidirectionnelles. L'individu III-6 malgré son traitement β-bloquant a fait une syncope à l'effort. On lui a implanté un défibrillateur cardiaque. La patiente IV-3, âgée de 5 ans présentait des ESV monomorphes pendant le test d'effort.

Dans cette famille (Figure 20), il y a eu 4 morts subites suspectes à l'occasion d'effort ou de stress émotionnel, 13 personnes atteintes de tachycardies ventriculaires catécholergiques dont 2 ont fait des morts subites (Tableau 2).

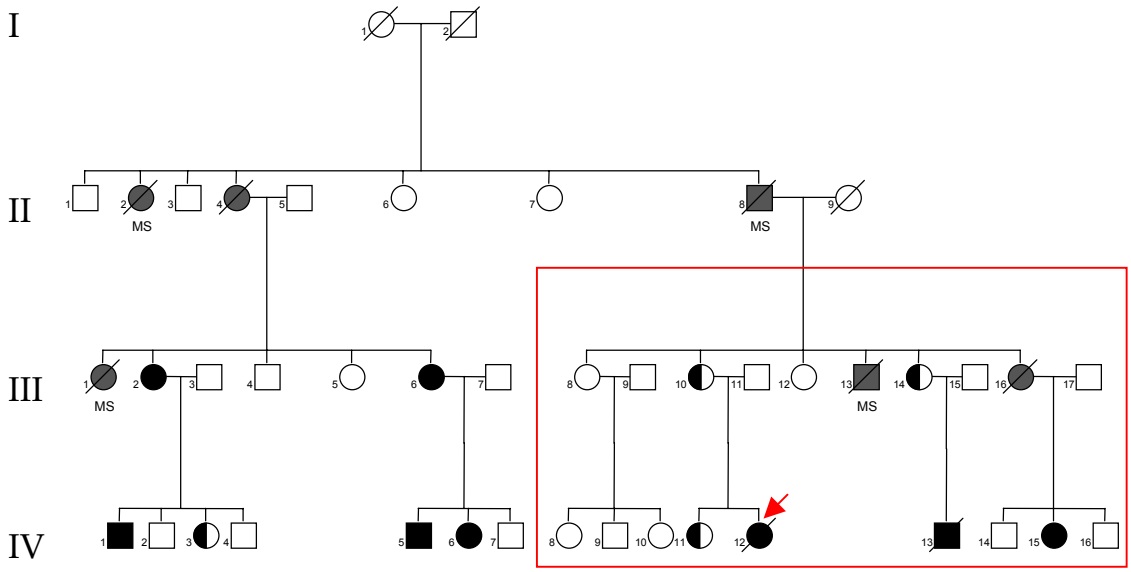



*Figure 20 : arbre généalogique de la famille Re.*
*Les symboles pleins représentent les individus présentant des tachycardies ventriculaires polymorphes à l'effort et les symboles à moitié pleins, les individus présentant des tachycardies ventriculaires monomorphes à l'effort. Le carré rouge indique la première branche familiale identifiée.*

| Family Member | Age at First Symptoms (yrs) | Age at Diagnosis (yrs) | Syncope | Arrythmias | Symptoms During the 6 Months Before Diagnosis | Heart Rate at Which Arrhythmias Occurred (beats/min) | Evolution Under BB Therapy |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| III.2 | 8 | 38 | Stress | Bidirectional doublets | No | 140 | Asymptomatic |
| III.5 | 17 | 35 | Effort | Polymorphic VT | Yes | 125 | Asymptomatic |
| III.7 | 27 | 39 | Effort | Monomorphic triplets | Yes | | Asymptomatic |
| III.10 | 20 | 32 | Effort | Monomorphic doublets | Yes | 160 | Asymptomatic |
| IV.1 | 7 | 10 | Effort | Monomorphic triplets | Yes | 160 | Asymptomatic |
| IV.3 | | 5 | | Monomorphic premature beats | No | 140 | Asymptomatic |
| IV.6 | 6 | 6 | Effort | Bidirectional VT | Yes | 160 | Asymptomatic |
| IV.11 | 10 | 11 | Effort | Monomorphic quadruplets | Yes | 110 | Asymptomatic |
| IV.13 | 12 | 12 | At rest | | No | | |
| IV.12 | 13 | 15 | Stress | Ventricular fibrillation | Yes | | |
| IV.15 | 12 | 13 | Effort | Bidirectionnal VT | Yes | 110 | Asymptomatic |

BB = β-blocker; VT = ventricular tachycardia.

*Tableau 2 : Récapitulatifs des caractéristiques cliniques de la famille Re.*

### *II.2.2. Etude génétique*

Au début de l'enquête familiale, une seule branche familiale avait été identifiée (carré rouge Figure 20). Le syndrome du QT long de type 2 avait été suspecté dans cette branche familiale. Le gène *KCNH2* a été séquencé, par le service de génétique moléculaire du CHU de Nantes. Mais aucune mutation n'a été mise en évidence.
Avec l'avancée de l'enquête familiale et l'identification d'une nouvelle branche, le diagnostic de tachycardies ventriculaires catécholergiques a été confirmé.

Pour l'étude génétique, tous les sujets présentant des troubles du rythme ventriculaire à l'effort ont été considérés atteints de l'anomalie génétique. En première intention, nous avons décidé de tester par analyse de liaison les gènes déjà décrits comme responsables de tachycardies ventriculaires catécholergiques, le *récepteur à la ryanodine 2 (RyR2*) et la *calséquestrine 2* (*CASQ2*). Grâce à l'analyse des marqueurs D1S2850, et AFMa044xc9 et le marqueur intra-génique de RyR2, D1S2567, nous avons retrouvé une coségrégation parfaite de la maladie avec le locus du gène *RyR2* (Figure 21). Le lod score du marqueur AFMa044xc9 est de 3,52 à 0% de recombinaison et avec une pénétrance de la pathologie de 100%.
A l'inverse, le locus du gène de la *CASQ2* ne coségrégait pas avec la pathologie.

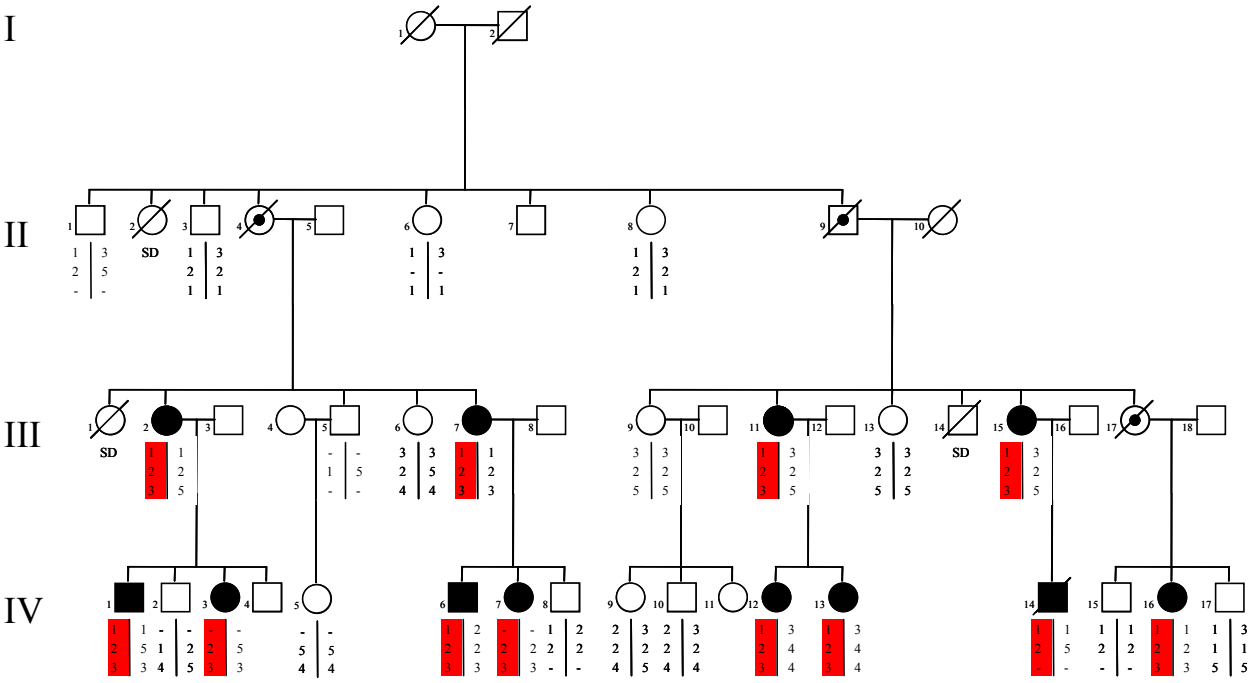



*Figure 21 : Résultats de l'analyse de liaison pour le gène RyR2 de la famille Re.*
*Les haplotypes des sujets de cette famille sont représentés sous chaque symbole. Les marqueurs testés sont dans l'ordre (du haut vers le bas) : D1S2850, D1S2567 et AFMa044xc9. L'haplotype morbide est surligné en rouge.*

Dans l'exon 105 du gène de RyR2, nous avons trouvé un variant (G14876A) qui remplace un résidu arginine en un résidu en acide glutamique en position 4959 de la protéine (Figure 22). Ce variant coségrègeait parfaitement avec la pathologie et n'a pas été retrouvé chez 188 individus sains. Nous avons donc mis en évidence une mutation R4959Q responsable de tachycardies ventriculaires catécholergiques dans cette famille de tachycardies ventriculaires catécholergiques.

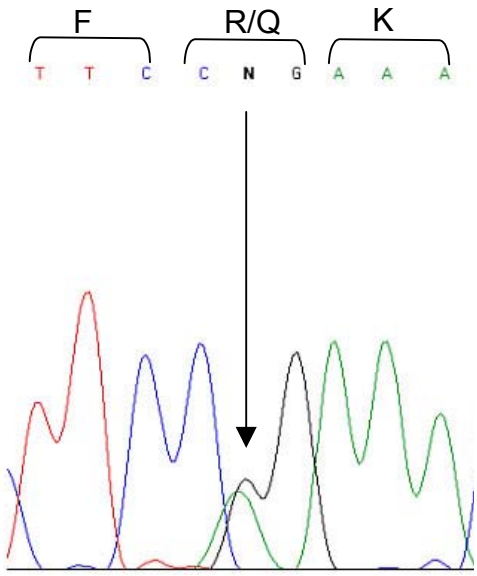



*Figure 22 : mutation R4959Q du gène RyR2 retrouvée dans la famille Re.*

## II.3. Discussion

Dans le contexte de la description initiale des tachycardies ventriculaires catécholergiques, la présentation clinique de cette famille était atypique. En effet, la mort subite du propositus avait eu lieu dans son sommeil et les épreuves d'effort réalisées chez les membres de la famille proche, ne montraient que des arythmies ventriculaires monomorphes rares. Le cousin du propositus qui était asymptomatique, avait des résultats électrocardiographiques à la limite de la normal et est mort en cours d'étude pendant son sommeil. Le diagnostic de tachycardie ventriculaire a pu être posé par l'identification d'une branche familiale qui présentait des tachycardies ventriculaires catécholergiques typiques.

Ce diagnostic a été confirmé par l'étude génétique et la mise en évidence d'une liaison entre le locus du gène de RyR2 et la pathologie. Cet exemple montre l'intérêt de la génétique dans l'étude phénotypique de certaines familles dont le diagnostic est sujet à caution.

La mutation que nous avons identifiée R4959Q dans l'exon 105 du gène du *récepteur à la ryanodine 2* ségrège parfaitement dans la famille et n'a pas été retrouvée chez les 188 individus contrôles que nous avons testés. Elle a une

pénétrance complète et est responsable dans cette famille de tachycardies ventriculaires catécholergiques. Cette mutation R4959Q a déjà été décrite chez une femme atteinte de tachycardies ventriculaires catécholergiques[111] qui avait eu 2 épisodes syncopaux vers l'âge de 40 ans. Mais aucune étude génétique familiale n'a été effectuée car ses parents étaient décédés et ses enfants étaient non porteurs de la mutation.

L'histoire clinique particulière de cette famille montre que la description classique des tachycardies ventriculaires catécholergiques n'est pas toujours celle qui est rencontrée. En effet, dans cette famille, certains individus présentent un tableau clinique classique : ECG normal au repos, apparition d'extrasystoles ventriculaires à l'effort qui peuvent évoluer jusqu'à la fibrillation ventriculaire avec l'augmentation de la fréquence cardiaque. Tandis que d'autres n'ont pas de symptômes à l'effort. Cependant même si les sujets atteints ne présentent pas le tableau clinique classique, le phénotype n'en est pas moins sévère. Dans cette famille, 3 individus porteurs de la mutation et 4 autres dont l'origine de la mort subite n'est pas connue, sont décédés subitement. C'est pour cette raison qu'une grande étude familiale doit être menée pour identifier d'autres membres de la famille porteurs de la mutation. L'analyse génétique, est d'un apport considérable pour détecter les patients porteurs de la mutation, asymptomatiques ou faiblement pénétrants.

## *III. La fibrillation auriculaire*

La fibrillation auriculaire (FA) est caractérisée par une activité électrique rapide et anarchique des oreillettes.

La fibrillation auriculaire est responsable de l'absence de contraction de l'oreillette dans laquelle le sang va stagner. Cette stagnation du sang peut être responsable de l'apparition d'un thrombus pouvant être éjecté dans les artères en particuliers celles du cerveau. La migration de ce thrombus sera responsable d'un accident vasculaire cérébral ischémique, complication redoutée de cette atteinte rythmique. Le risque est d'autant plus élevé que l'oreillette est dilatée, qu'il existe une atteinte valvulaire et que le sujet est âgé. L'autre complication est liée à l'altération de la fonction contractile pouvant évoluer vers une insuffisance cardiaque et être responsable d'un oedème aigu pulmonaire.

La fibrillation auriculaire est le trouble du rythme cardiaque le plus fréquent. Son incidence augmente avec l'âge : vers 50 ans, elle est de 0,5% et passe à 10% pour des personnes de 80 ans[112]. On estime qu'elle est responsable d'environ 30% des accidents vasculaires ischémiques. Il s'agit surtout d'accidents vasculaires cérébraux qui s'accompagnent d'une mortalité de 20% et d'une morbidité (séquelles handicapantes) importantes, avec un coût élevé de santé publique. La mortalité des sujets qui ont une fibrillation auriculaire est presque multipliée par 2 par rapport aux sujets qui n'en ont pas, et cela indépendamment de la mortalité liée aux cardiopathies et aux facteurs de risques associés[113].

Deux types de causes peuvent être mises en évidence. La fibrillation auriculaire est secondaire à une maladie cardiaque (une hypertrophie myocardique, un infarctus du myocarde, une hypertension ou une péricardite et une atteinte valvulaire (rétrécissement ou insuffisance mitrale), constituant alors un signe parmi d'autres, elle peut-être induite par une maladie non cardiaque (hyperthyroïdie par exemple), mais parfois aucune cause n'est retrouvée, elle est alors dite idiopathique. Parmi ces formes idiopathiques, des familles atteintes de fibrillation auriculaire ont

été identifiées, et ont permis de réaliser les premières études génétiques sur cette pathologie.

## III.1. Données génétiques

La première étude génétique sur la fibrillation auriculaire a été réalisée à partir d'une famille Espagnole. Elle a permis de mettre en évidence le premier locus de la FA autosomique dominante sur le chromosome 10 en 10q22-24[114]. Le gène en cause n'est pas encore connu. Depuis cette description initiale, un locus (6q14-16[115]) et 4 gènes ont ensuite été identifiés :

- *KCNQ1*[116]
- *Ankyrine B*[21]
- *KCNE1*[117]
- *KCNE2*[118]

Il existe une forme familiale de fibrillation auriculaire qui se transmet selon un mode autosomique récessif. Dans cette famille un locus en 5p13 a été mis en évidence[119], mais aucun gène n'a encore été identifié.

Dans le cadre des familles atteintes de cardiomyopathie dilatée, des mutations sur le gène *SCN5A* favoriseraient la survenue de FA[120 121 122].

### *III.1.1. Relation entre KCNQ1 et la fibrillation auriculaire*

En 2003, Chen et coll.[116] ont retrouvé une mutation (S140G) sur le gène *KCNQ1* dans une famille atteinte de FA idiopathique. Il est à noter que la moitié des patients atteints de FA dans cette famille présente un intervalle QT allongé. Cette mutation a été retrouvée chez les 16 membres atteints de FA de la famille et chez aucun des individus sains ni chez aucun patient atteint du syndrome du QT long congénital.

L'étude électrophysiologique de cette mutation a montré que cette dernière avait un effet gain de fonction sur le canal. En effet, quand on exprime la protéine mutée avec la sous-unité KCNE1 dans des cellules COS-7, il y a une augmentation de la densité du courant $I_{Ks}$ due à des modifications des propriétés cinétiques et d'ouverture du canal. Le courant $I_{Ks}$ généré par KCNQ1 a un rôle essentiel dans la phase de repolarisation du potentiel d'action. Une augmentation de ce courant sortant repolarisant provoque un raccourcissement et une réduction de la période réfractaire du potentiel d'action favorisant de multiples circuits de réentrée au niveau des oreillettes à l'origine des épisodes de FA.

### *III.1.2. Relation entre l'ankyrine B et la fibrillation auriculaire*

Dans la famille atteinte d'un syndrome du QT long de type 4 décrite par Schott et coll.[21], tous les adultes atteints présentent une FA. Les mutations sur le gène de l'ankyrine B sont à l'origine d'anomalies dans la dynamique du calcium, d'une perturbation et d'une diminution de l'expression de l'échangeur Na/Ca, de la pompe Na/K ATPase[22].

D'après Stanley Nattel[112], les canaux ioniques auriculaires jouent un rôle majeur dans la survenue et l'entretien de la FA. En effet, une baisse du courant calcique $I_{Ca,L}$ et une augmentation des courants potassique $I_{K1}$ et $I_{Kach}$ ont été décrits comme des facteurs déclenchant et d'entretien de la FA.

### *III.1.3. Relation entre KCNE1 et la fibrillation auriculaire*

En 2002, Lai et coll.[117] ont effectué une étude cas-témoin dans le cadre de la FA. Ils ont remarqué une prédominance de l'allèle 38G du gène *KCNE1* dans le groupe atteint de FA, ainsi qu'une distribution des génotypes différents entre les 2 groupes. En effet, environ 60% des individus du groupe atteint de FA sont homozygotes pour ce polymorphisme alors que seulement 43% le sont dans le groupe témoin. Ce polymorphisme pourrait être un facteur de risque dans le cadre de la FA.

### *III.1.4. Relation entre KCNE2 et la fibrillation auriculaire*

En 2004, Yang et coll.[118] ont retrouvé une mutation (R27C) dans le gène *KCNE2* dans une famille atteinte de FA idiopathique.

L'étude électrophysiologique de cette mutation a montré que cette dernière entraînait un gain de fonction du canal KCNQ1. En effet, quand on exprime la protéine mutée avec le canal KCNQ1 dans des cellules COS-7, il y a une augmentation de la densité du courant $I_{Ks}$. Une augmentation de ce courant sortant repolarisant provoque un raccourcissement favorisant de multiples circuits de réentrée au niveau des oreillettes à l'origine des épisodes de FA.

Comme KCNE2 est capable d'interagir avec HERG[36 49 50 30], et les canaux de la famille des HCN[123], Yang et coll.[118] ont testé l'effet de la mutation R27C de *KCNE2* sur ces canaux. Ils ont montré que cette mutation n'a un effet que sur le canal KCNQ1.

## III.2. Etude phénotypique et génétique d'une famille atteinte de fibrillation auriculaire

Cette étude fait l'objet d'une publication soumis pour publication : Vincent Probst, MD ; Marie Allouis ; Philipe Mabo, MD, PhD ; Estelle Roy ; Frank Dudbridge, PhD ; Hervé Le Marec, MD, PhD and Jean-Jacques Schott, PhD. Familial Atrial Fibrillation with Specific Clinical Phenotype Maps to Chromosome 20q12-13.

### *III.2.1. Etude Phénotypique.*

Nous avons identifié une famille de 4 générations où la fibrillation auriculaire (FA) ségrége suivant un mode autosomique dominant chez 7 patients (Figure 23).
Le propositus (III-7), une femme âgée de 56 ans présente à l'ECG une fibrillation chronique qui est apparue à l'âge de 30 ans et présente aussi à l'échocardiographie une légère dilatation de l'oreillette gauche.

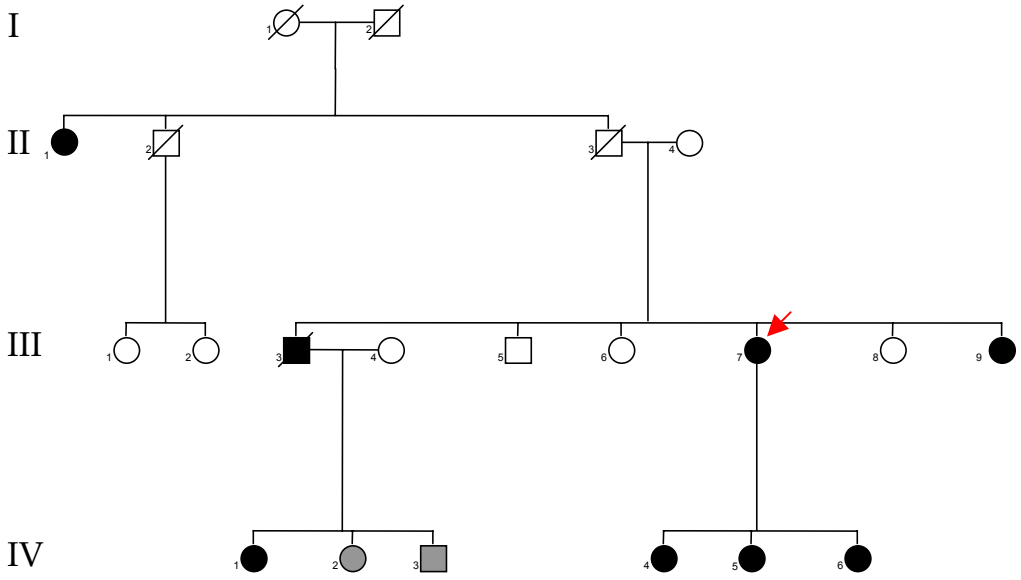



*Figure 23 : arbre généalogique de la famille Bu.*

L'enquête familiale a dépisté 6 autres personnes atteintes dont les 3 enfants du propositus IV-4, IV-5 et IV-6 qui ont respectivement 30, 31 et 34 ans et qui présentent soit une FA chronique, soit une FA paroxystique soit des salves d'extrasystoles auriculaires, une soeur (III-9) de 40 ans qui présente une FA chronique et une tante (II-1) de 85 ans qui présente en plus d'une FA chronique apparue à 41 ans, une fuite de la valve mitrale.

Le frère du propositus III-3 est décédé d'un cancer, cependant il souffrait de FA chronique depuis l'âge de 16 ans.

Dans cette famille (Figure 23), il y avait 7 personnes atteintes de FA dont 4 ont une FA permanente, et 3 ont une FA paroxystique.

La FA apparaît dans cette famille entre 16 et 41 (moyenne 27 ± 10 ans).

Tous les patients atteints de FA présentaient des signes de dilation de l'oreillette gauche (moyenne en $cm^2$ 26,5 ± 6 chez les atteints contre 17,8 ± 1 chez les sains ; $p<0,01$) (Tableau 3). Chez les 3 patients IV-1, IV-5 et IV-6 connus pour souffrir de FA paroxystique, l'échographie révèle une dilatation mineur des oreillettes (20,5 ± 0,5 chez les atteints contre 17,8 ± 1 $cm^2$) et une onde A de faible amplitude (18 ± 3 cm/s contre 48 ± 7 cm/s chez les patients phénotypiquement sains). Aucune anomalie valvulaire n'a été retrouvée sauf chez le patient II-1. Aucun patient ne

présente ni de troubles de la conduction cardiaque ni d'allongement du QT (Figure 24).

| No. | Age of onset y | Current age y | Phenotype | Electrocardiogram | P wave integral (µVs) | P wave duration (ms) | Left atrium area (cm2) | A wave (cm/s) | Ejection Fraction |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **II.1** | **41** | **85** | **Chronic AF** | **AF** | **…** | **…** | **36** | **…** | **0,75** |
| **III.3** | **16** | **NA** | **Chronic AF** | **AF** | **…** | **…** | **…** | **…** | **0,6** |
| **III.7** | **30** | **56** | **Chronic AF** | **AF** | **…** | **…** | **32** | **…** | **0,55** |
| **III.9** | **39** | **40** | **Chronic AF** | **AF** | **…** | **…** | **28** | **…** | **0,6** |
| **IV.1** | **21** | **22** | **Paroxysmal AF** | **Sinus rythm** | **110** | **123** | **21** | **14** | **0,6** |
| **IV.4** | **16** | **30** | **Chronic AF** | **AF** | **…** | **…** | **28** | **…** | **0,6** |
| **IV.5** | **20** | **31** | **Paroxysmal AF** | **Sinus rythm** | **101** | **208** | **20** | **20** | **0,6** |
| **IV.6** | | **34** | **Salve of APB** | **Sinus rythm** | **103** | **100** | **21** | **20** | **0,6** |
| III.1 | | 46 | | Sinus rythm | … | … | … | … | … |
| III.2 | | 49 | | Sinus rythm | … | … | … | … | … |
| III.5 | | 52 | | Sinus rythm | 615 | 120 | 18 | 59 | 0,6 |
| III.6 | | 50 | | Sinus rythm | 756 | 123 | 17 | 47 | 0,6 |
| III.8 | | 54 | | Sinus rythm | 850 | 157 | 19 | 50 | 0,6 |
| IV.2 | | 27 | | Sinus rythm | 536 | 131 | 16 | 40 | 0,68 |
| IV.3 | | 24 | | Sinus rythm | … | … | 19 | 44 | 0,6 |

*Tableau 3 : caractéristiques cliniques de la famille Bu.*

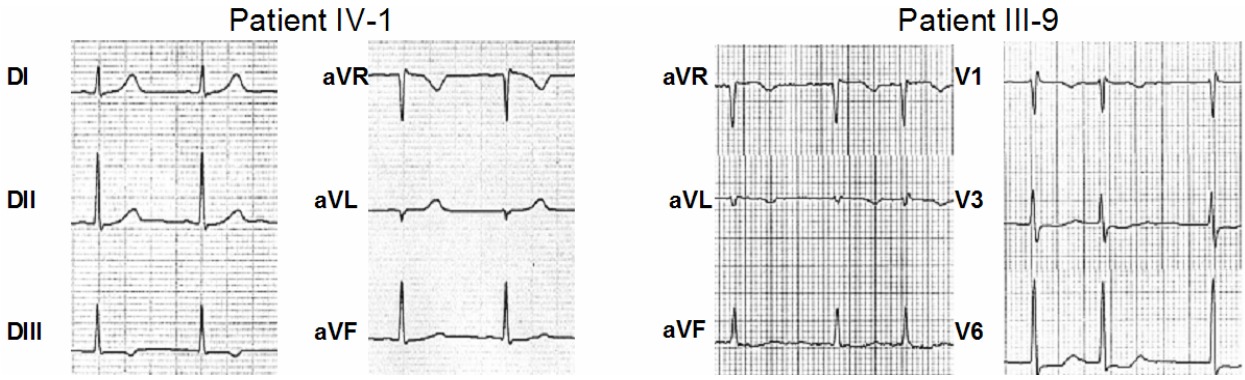



*Figure 24 : ECG des patients IV-1 et III-9*

Les ECG au repos des patients présentant des FA paroxystiques présentent des ondes P de petite taille. Pour confirmer cela, des ECG haute amplification ont été réalisés. Chez 3 patients atteints de FA paroxystique, l'intégrale de l'onde P est de 104 ± 4 µVs tandis que chez les patients sans antécédents de FA connus, elle est de 671 ± 128 µVs.

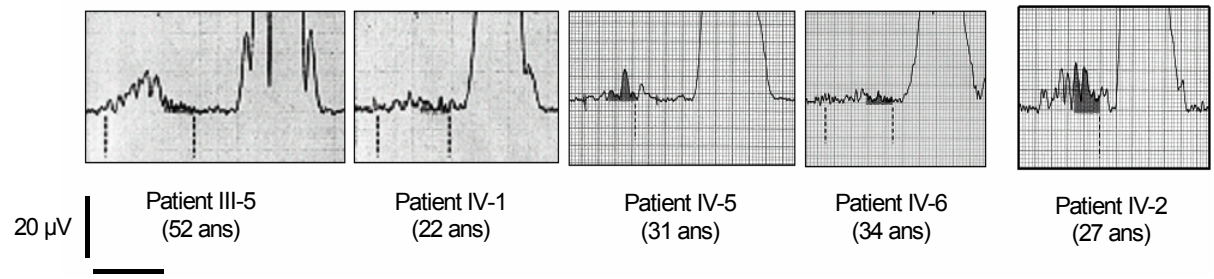



*Figure 25 : ECG haute amplification*

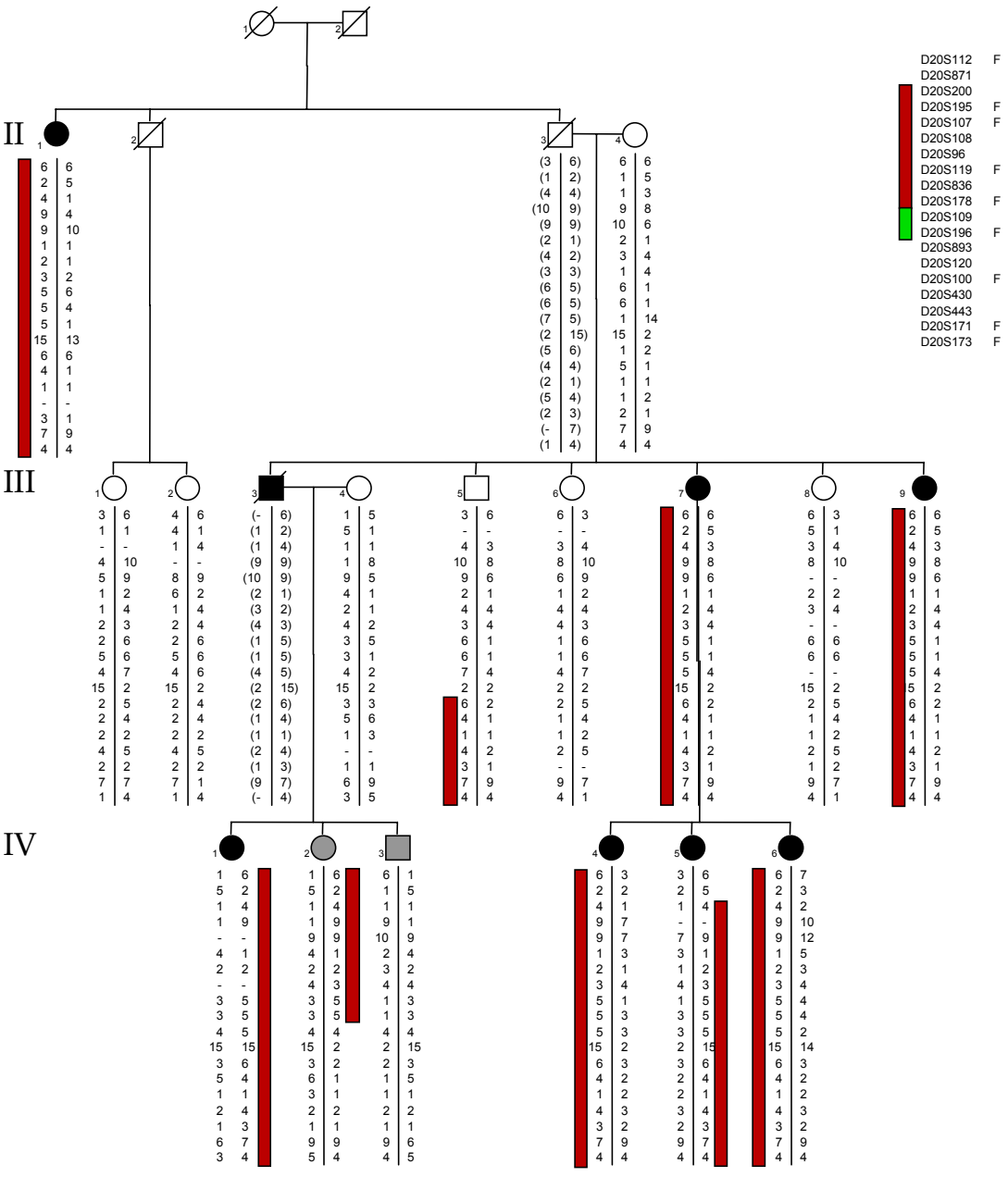
Les patients IV-2 et IV-3 ont un ECG normal sans FA, mais compte tenu de leur jeune âge, ils ont été considérés comme phénotypiquement douteux.

### *III.2.2. Etude génétique de la famille Bu.*

A partir des membres de la famille Bu. (Figure 23), pour lesquels la fibrillation auriculaire ségrégeait selon un mode autosomique dominant, nous avons testé les différents locus connus de la FA par génotypage. Nous avons exclu les locus 10q22-24[114] et 6q14-16[115] et les gènes *KCNQ1*[116] et *KCNE2*[118], déjà décrits comme responsables de FA. Nous avons testé d'autres gènes candidats soit par analyse de liaison soit par séquençage du gène. La FA est une pathologie que l'on retrouve aussi associée à des canalopathies comme le syndrome du QT long de type 4, le syndrome de Brugada, le syndrome du QT court et des cardiomyopathies. Nous avons par conséquent testé les gènes décrits dans ces pathologies, *AnkB*[22], *SCN5A*[138] [124] et *KCNH2*[125] ainsi que les sous-unités régulatrices des canaux potassiques *KCNE1*[126], *KCNE3* et *KCNE4*. Tous ces gènes ont été exclus.

Aucun de ces locus n'était lié à la FA, dans cette famille. Nous étions donc en présence d'une famille dont la fibrillation auriculaire n'était liée à aucun des gènes déjà connus. Nous avons ensuite testé l'informativité statistique de cette famille en calculant le lod score (3,22 à 0% de recombinaison et 90% de pénétrance de la pathologie pour un marqueur bi-allélique), et nous avons ensuite réalisé une analyse de liaison sur génome entier. Le génotypage chez l'ensemble des membres de la

famille nous a permis de trouver une liaison génétique pour le marqueur D20S109. Le calcul du Lod Score de ce marqueur a été réalisé en utilisant les fréquences réelles de chaque allèle de ce marqueur génétique. Le lod Score du marqueur D20S109 est de 2,84 en fréquence réelle, à 0% de recombinaison et 90% de pénétrance.




*<u>Figure 26</u> : Résultats de l'analyse de liaison pour différents marqueurs de la région 20q12-13 de la famille Bu.*
*Les haplotypes des sujets de cette famille sont représentés sous chaque symbole. Les marqueurs testés sont listés du centromère vers le télomère. L'haplotype morbide est indiqué par la barre rouge + verte. Si on considère l'individu IV-2 comme saine malgré son jeune âge, le locus morbide se résume à la barre verte.*

Le génotypage des marqueurs génétiques flanquants (Figure 26) nous a permis de définir un intervalle de liaison de 28 mégabases (barre rouge + barre verte Figure 27). Cependant, si on considère les individus IV-2 et IV-3 comme sains, compte tenu de la taille normale de leur onde P sur l'ECG haute amplification (Figure 25) et malgré leur jeune âge, la taille de l'intervalle de liaison se réduit alors à 6 mégabases (barre verte Figure 27).

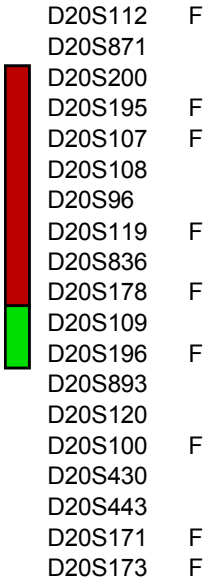



*Figure 27 : intervalle de liaison obtenu à partir des résultats des marqueurs génétiques. grande zone de 28cM=barre rouge + verte et petite zone de 6 cM=barre verte.*

Nous avons effectué une analyse de liaison multipoint pour comparer la ségrégation de la pathologie et 4 marqueurs génétiques (D20S178, D20S109, D20S196 et D20S893 grâce à l'algorithme VITESSE[127 128]. Nous avons obtenu un Lod Score maximal de 3,1 pour le marqueur génétique D20S109 (Figure 28). Si on considère que les individus IV-2 et IV-3 comme sains, le Lod Score maximal du marqueur génétique D20S109 est de 3,6.

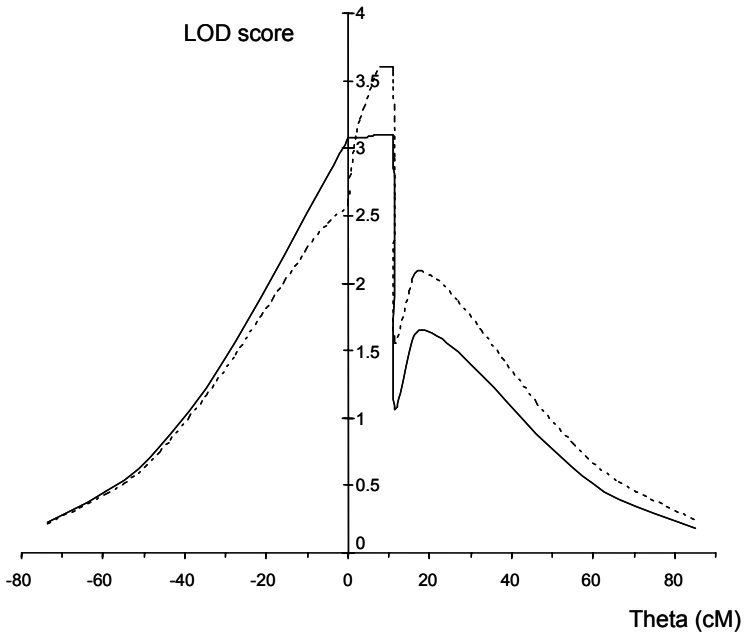



*Figure 28 : locus de fibrillation auriculaire sur le chromosome 20.*
*Une analyse multipoint a été réalisée en comparant la ségrégation de la pathologie avec 4 marqueurs génétiques (D20S178, D20S109, D20S196 et D20S893).En abscisse est indiquée la distance génétique en cM, en ordonnée les valeurs de lod score, l'origine correspond au marqueur D20S109. La ligne correspond aux résultats de l'analyse multipoint quand les individus IV-2 et IV-3 dont considérés comme phénotypiquement douteux et la ligne en pointillés quand les individus IV-2 et IV-3 dont considérés comme phénotypiquement sains.*

Cette zone de 6 Mb comprend 40 gènes dont 25 sont à expression cardiaque (Tableau 4).

Tous sont des candidats potentiels car ils se situent dans la zone de liaison. Cependant, nous avons choisi de séquencer un certain nombre d'entres eux dont les fonctions ou caractéristiques sont cohérentes avec les hypothèses physiopathologiques de la fibrillation auriculaire.

Dans cette zone, nous avons séquencé un certain nombre de gènes dont :

- *KCNB1* : gène codant pour le canal potassique Kv2.1 qui participe au courant $I_{Kslow}$. Compte tenu du fait que déjà deux gènes codant pour des canaux potassiques sont impliqués dans la FA, nous avons pensé que *KCNB1* pouvait être un bon candidat.

- *KCNG1* : gène codant pour la sous-unité Kv6.1. Les sous-unités Kv6 ou sous-unités silencieuses des canaux Kv sont des sous-unités régulatrices. Elles ne génèrent pas de courant 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 sous-unités.

Le séquençage de ces 2 gènes ainsi que des autres n'a pas permis à ce jour de trouver de mutation.

| Symbole | Description | Gènes séquencés |
|---|---|---|
| *SULF2* | *sulfatase 2* | |
| *PREX1* | *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent RAC exchanger 1* | |
| *ARFGEF2* | *ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)* | X |
| *CSE1L* | *CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)* | |
| *STAU* | *staufen, RNA binding protein (Drosophila)* | |
| *DDX27* | *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27* | |
| *KIAA1404* | *KIAA1404 protein* | |
| *KCNB1* | *potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1* | X |
| *B4GALT5* | *UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5* | |
| *SLC9A8* | *solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 8* | X |
| *SPATA2* | *spermatogenesis associated 2* | |
| *ZNF313* | *zinc finger protein 313* | |
| *Kua-UEV* | *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1* | |
| *UBE2V1* | *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1* | |
| *Kua* | *ubiquitin-conjugating enzyme variant Kua* | |
| *CEBPB* | *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta* | |
| *PTPN1* | *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1* | X |
| *BCAS4* | *breast carcinoma amplified sequence 4* | |
| *TMSL6* | *thymosin-like 6* | X |
| *ADNP* | *activity-dependent neuroprotector* | |
| *DPM1* | *dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit* | |
| *KCNG1* | *potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1* | X |
| *NFATC2* | *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2* | X |
| *ATP9A* | *ATPase, Class II, type 9A* | X |
| *ZFP64* | *zinc finger protein 64 homolog (mouse)* | |

*Tableau 4 : Liste des gènes à expression cardiaque situés dans le petit intervalle de liaison génétique de la famille Bu.*

Dans la grande zone nous avons aussi séquencé 5 gènes dont :

- *JPH2* : La junctophiline-2 appartient à la famille des jonctophilines qui sont des protéines conservées du complexe jonctionnel membranaire. Dans le coeur, le complexe jonctionnel membranaire qui fait le lien entre les invaginations de la

membrane plasmique ou tubule T et le réticulum sarcoplasmique est appelé diade. Cette structure est importante dans le couplage des censeurs de la dépolarisation membranaire et les canaux de relargage calcique présents sur le réticulum sarcoplasmique (couplage excitation contraction). La junctophiline-2 est exprimée dans le coeur. Les souris KO *JPH2* meurent *in utero*. Les cardiomyocytes de ces souris présentent des diades anormales et des courants $Ca^{2+}$ anormaux[129]. La junctophiline-2 est présente au niveau des oreillettes et du ventricule et son expression est augmentée au cours du développement. Dans le cadre de cardiopathie hypertrophique ou dilatée son expression est diminuée[130].

- *MYL9* : Compte tenu du fait que chez un certain nombre de patients on retrouve associé à une FA une cardiopathie hypertrophique, nous avons pensé que les gènes codant pour des protéines du cytosquelette pouvaient être de bons candidats.

Le séquençage de ces 2 gènes ainsi que des 3 autres n'a pas permis de trouver de mutation à ce jour.

## III.3. Discussion

Dans la population générale, la fibrillation auriculaire est considérée comme une pathologie multigénique et l'identification de facteurs impliqués dans sa physiopathologie nécéssite de grandes études. En revanche, l'identification d'une forme de FA idiopathique et familiale, nous a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes responsables de la pathologie et de mieux comprendre sa physiopathologie. La famille Bu. présente une FA à apparition précoce avec des ondes P de faible amplitude ce qui n'avait jamais été observé auparavant. Les patients atteints de cette famille présentent des traits phénotypiques particuliers : l'échocardiographie montre des signes de dilatation de l'oreillette gauche et des ondes A de faible amplitude, et l'ECG montre des ondes P de faible amplitude.

L'étude génétique de cette famille nous a permis de mettre en évidence un nouveau locus de fibrillation auriculaire sur le chromosome 20 en 20q12-13.

L'identification de ce nouveau locus montre que la fibrillation auriculaire a une hétérogénéité génétique plus importante que celle décrite jusqu'à présent. Le locus que nous avons identifié mesure 28cM ou 6cM selon que l'on considère comme les individus IV-2 et IV-3 comme sains, compte tenu de la taille normale de leur onde P sur l'ECG haute amplification. Cette zone de 6cM contient 45 gènes. Compte tenu des gènes (*KCNQ1, Ankyrine B, KCNE1 et KCNE2*) que nous savions déjà impliqués dans la FA, nous avons pensé que les gènes codants des protéines de structure de l'oreillette, des canaux ioniques ou des protéines intervenants dans le système nerveux autonome pourraient être de bons candidats.

Nous avons séquencé les gènes codants pour des canaux potassiques Kv2.1 (*KCNB1*) et Kv6.1 (*KCNG1*), pour une échangeur sodium/hydrogène (*SLC9A8*), une kinase régulée par les glucocorticoïdes (*SGK2*), la junctophiline 2 (*JPH2*) et une ATPase de classe 2 (*ATP9A*). Nous n'avons retrouvé aucun variant dans les gènes codants pour une thymosine-like (*TMSL6*), une kinase des chaînes légères de la myosine (*MYLK2*), une isoforme de la chaîne légère de la myosine (*MYL9*) et un facteur d'échange de guanine (*ARFGEF2*).

Cependant, parmi l'un des gènes que nous avons séquencé, nous avons retrouvé sur le gène *PTP1B* codant pour une phosphatase, une insertion (1483 insG) d'une guanine en 3'UTR. Ce variant confère une augmentation de la stabilité à l'ARNm dans les cellules transfectées HEK293 et est associé à une résistance à l'insuline[131]. D'autres études d'association n'ont pas confirmé le lien entre ce variant et la résistance à l'insuline[132]. Ce variant coségrège dans la famille Bu. et a été retrouvé chez 7% de la population générale. Aucun membre de la famille, ne présente de signes de diabète. Le séquencage du gène *PTP1B* chez 9 propositus atteints de FA idiopathique à apparition précoce n'a pas permis de mettre en évidence d'autres variants de ce gène. Des mutations sur ce gène *PTP1B* ne semblent pas être à l'origine de la FA dans cette famille.

L'agrandissement de la famille Bu. et l'identification d'autres familles atteintes de fibrillation auriculaire devraient nous permettre de redéfinir l'intervalle de liaison et peut-être de mettre en évidence un nouveau gène impliqué dans une forme de FA à apparition précoce.

# *IV. Syndrome de Brugada*

## IV.1. Description

Le syndrome de Brugada a été décrit par les frères Brugada[133], en 1992. A partir d'un sous groupe de patients atteints de fibrillations ventriculaires idiopathiques, 8 d'entre eux présentaient des épisodes de syncopes ou de mort subite récupérée secondaire à des arythmies ventriculaires polymorphes rapides. Ils avaient un profil électrocardiographique particulier comprenant un aspect de bloc de branche droit et une élévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites (V1, V2 et V3), un intervalle QT normal et aucune maladie structurale apparente[157 158 134].
Ce syndrome est appelé syndrome de Brugada.

Les fibrillations ventriculaires idiopathiques sont responsables d'environ 5 à 10 % des morts subites[135 136]. Le syndrome de Brugada représente 40 à 60% de ces fibrillations ventriculaires idiopathiques[137 138].

Les anomalies électriques caractéristiques du syndrome de Brugada avaient déjà été décrites par Osher et coll.[139]. Ils rapportaient le cas d'un homme de 39 ans hospitalisé pour une gêne rétrosternale, dont la description électrocardiographique et l'évolution étaient compatibles avec le syndrome de Brugada. En 1989, Martini et coll.[140] ont publié 6 cas de morts subites récupérées après une fibrillation ventriculaire idiopathique, l'un des patients avait un ECG évocateur d'un syndrome de Brugada. Chez ces patients, une forme subclinique ou frustre de cardiomyopathie du ventricule droit avait été diagnostiquée à partir des résultats de biopsie de ventricule droit chez un patient et de l'échocardiographie chez deux patients. Plusieurs auteurs avaient conclu que des anomalies structurales étaient responsables de ce profil électrocardiographique particulier[141 142].

Le caractère apparemment héréditaire de cette entité pathologique suggérait fortement l'implication de facteurs génétiques. Selon les auteurs, ce syndrome pouvait être provoqué par des canaux ioniques défectueux, comme dans le syndrome du QT long congénital, ou être une forme subclinique d'une cardiomyopathie héréditaire plus diffuse[138 162 140 142].

### *IV.1.1. Données cliniques*

Le syndrome de Brugada est caractérisé par des anomalies électrocardiographiques caractéristiques comportant un sus-décalage du segment ST dans les dérivations précordiales droites (≥ 0,1mV dans les dérivations V1, V2 et V3) souvent accompagné d'un aspect de bloc de branche droit, un intervalle QT normal, une prédisposition aux tachyarythmies ventriculaires mortelles et l'absence de maladie cardiaque structurale.

Le syndrome de Brugada 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[143] puis en 2005[144]. Il existe 3 types distincts de repolarisation sur les dérivations précordiales droites visibles (V1, V2 et V3) (Figure 29) :

- Type 1 : élévation du point J ≥ 2 mm avec un aspect convexe et descendant du segment ST et onde T inversée (« coved »).
- 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.

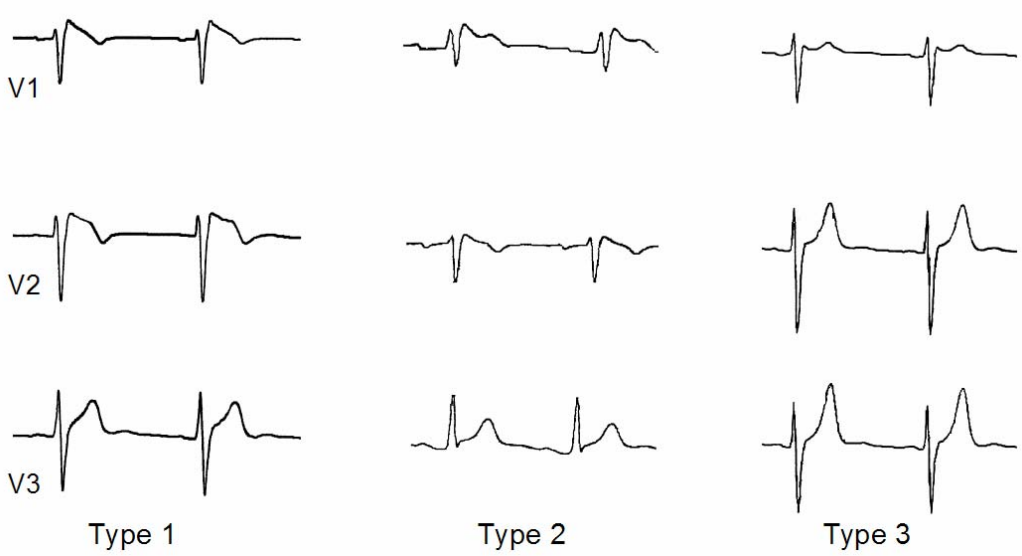



*Figure 29 : différents aspects de repolarisation compatibles avec un ECG de syndrome de Brugada.*

Seule une repolarisation de type 1, présente sur au moins deux dérivations précordiales droites, est considérée comme caractéristique d'un ECG de Brugada. Le terme de syndrome de Brugada 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, 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[144].

Ces modifications de la repolarisation s'accompagnent parfois d'un aspect de bloc de branche droite. L'intervalle QT est généralement normal (QTc<440ms) mais peut être allongé[133].

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[145]. Ces modifications peuvent aussi être induites par certains agents pharmacologiques ayant une action de bloqueurs des canaux sodiques dont les antiarythmiques de classe Ic ou les antidépresseurs tricycliques type amitriptyline[146]

les neuroleptiques phénothiaziniques mais également des variations de la glycémie induite par la prise de sucre[147].

Lorsque l'ECG de base est normal, les antiarythmiques de classe I sont utilisés pour effectuer un test diagnostique[148].

Les patients ont en général un rythme sinusal. Cependant 20% des patients atteints de ce syndrome présentent des arythmies supraventriculaires[149] telles que des fibrillations auriculaires[150]. Il a été décrit plusieurs associations entre un syndrome de Brugada et d'autres pathologies modifiant le rythme sinusal telles que le syndrome de Wolff-Parkinson-White[151], la dysfonction sinusale[152] et une extinction auriculaire[153].

Le syndrome de Brugada est par définition une pathologie rythmique du coeur sans anomalie structurale. Cependant des atteintes cardiaques comme les atteintes myocardiques[156] et péricardiques[154] peuvent s'accompagner de modification électrocardiographiques compatibles avec ce syndrome et doivent être écartées au préalable.

Il n'existe pas actuellement de traitement médical ayant prouvé son efficacité dans la prise en charge du syndrome de Brugada. Le seul traitement dont nous disposons est la mise en place d'un défibrillateur automatique implantable chez les patients pour lequel le risque rythmique lié au syndrome de Brugada est considéré comme important. L'évaluation de ce risque rythmique reste malheureusement actuellement difficile.

Les connaissances sur le syndrome de Brugada restent donc très imparfaites tant sur le plan physiopathologique que sur le mode de prise en charge clinique de ces patients.

### *IV.1.2. Données épidémiologiques*

Viskin et coll.[155] ont trouvé que la prévalence de ce syndrome parmi les patients atteints de fibrillation ventriculaire idiopathique était de 21% alors que pour Corrado et coll.[156], 14% des sujets jeunes ayant fait une mort subite ont un profil électrocardiographique évocateur d'un syndrome de Brugada. Les premiers symptômes rythmiques surviennent majoritairement chez les hommes, entre 22 et 65 ans[137 157 158 159].

Les seuls symptômes du syndrome de Brugada sont les syncopes et les morts subites suite à des fibrillations ventriculaires. La mort subite peut être le premier symptôme de la maladie. Ils ont surtout lieu la nuit[160]. Le syndrome de Brugada est aussi responsable de mort subite chez l'enfant et le nourrisson[161].

Le syndrome de mort subite inattendue nocturne (SUNDS : Sudden Unexpected Nocturnal Death Syndrome) a une importante prévalence en Asie du Sud Est et au Japon[162]. Cette maladie est encore appelée « Lai Tai » (en Thaïlande), ou « Bangungut » (aux Philippines) ou « Pokkuri » (au Japon)[162]. En Asie, on estime le taux annuel de mortalité chez les jeunes hommes de 26 à 38 décès pour 100 000. Il a été récemment été montré que le SUNDS et le syndrome de Brugada étaient la même maladie[163].

Les principales données épidémiologiques sont issues des diverses études réalisées par différentes équipes mondiales[137 160 164 165 166 167 168 169 170].

Une histoire familiale de mort subite de fibrillation ventriculaire ou de syncope est retrouvée dans 20 à 35% des cas selon les études. Les sujets atteints sont majoritairement des hommes d'origine caucasienne ou asiatique. La maladie se révèle entre 30 et 50 ans. Selon les auteurs, 25 à 64% des patients atteints sont symptomatiques. Les évènements rythmiques, tachycardies ventriculaires polymorphes ou fibrillations ventriculaires sont parfois résolutifs spontanément[172] (Tableau 5).

| | Nombre de patients | Sexe masculin | Patients symptomatiques | Histoire familiale de mort subite | Age de survenue des symptômes (ans) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Alings et coll.** | 163 | 150 | 104 dont 76 FV | 36/163 MS | 39,8 ± 10,6 |
| **Matsuo et coll.** | 32 | 27 | 8 dont 7 MS | NI | 47,3 ± 10* |
| **Atarashi et coll.** | 105 | 99 | 38 dont 20 FV | 5/105 propositus | Syncope 47 ± 13<br>ACR 41 ± 10 |
| **Brugada et coll.** | 334 | 255 | 144 dont 71 ACR | 49/180 propositus symptomatiques | Syncope 47 ± 14<br>ACR 41 ± 16 |
| **Brugada et coll.** | 547 | 408 | 124 | 302/547 propositus | NI |
| **Priori et coll.** | 200 | 152 | 56 dont 22 ACR | 26/130 propositus | 33 ± 13 |
| **Eckardt et coll.** | 212 | 152 | 89 dont 24 ACR | 19/60 propositus symptomatiques | NI |

ACR : Arrêt Cardio-Respiratoire, FV : Fibrillation Ventriculaire, MS : Mort Subite, NI : Non Indiqué,
* : age de diagnostic dans le sous-groupe sans décès par mort subite.

*Tableau 5 : caractéristiques démographiques et cliniques des patients atteints de syndrome de Brugada d'après 7 études différentes.*

Les études les plus récentes[171] [168] [170] indiquent comme seule thérapie l'implantation d'un défibrillateur chez les sujets ayant eu une mort subite ou des syncopes. En revanche, en ce qui concerne les patients asymptomatiques, les indications sont moins claires. Brugada et coll. montrent que pendant la durée de leur étude, 8% des patients asymptomatiques ont eu un évènement rythmique. Alors que dans l'étude de Eckardt et coll.[170], il y en a eu seulement 0,8%. L'implantation d'un défibrillateur chez les patients asymptomatiques est une question ouverte compte tenu du faible taux de mort subite chez ces sujets, des risques pour le sujet jeune, de l'impact de la pose d'un défibrillateur sur la qualité de vie, et du coût.
Certains considèrent que le déclenchement d'un trouble rythmique grave au cours d'une exploration électrophysiologique est un facteur prédictif majeur du risque de mort subite alors que ces résultats ne sont pas retrouvés par d'autres[171] [172] [168] [170]. Leurs données montrent que cet examen a une faible valeur prédictive positive et une forte valeur prédictive négative (Tableau 6).

| | Brugada et Coll.[168] | Brugada et coll.[169] | Priori et coll.[172] | Eckardt et coll.[171] |
|---|---|---|---|---|
| **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 diagnosic** | 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%) |
| | (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** | ±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 6 : comparaison des principaux fichiers de la littérature.*

Très récemment Belhassen et coll.[173] ont montré l'effet suppresseur de la quinidine sur les arythmies. Cette molécule pourrait peut-être devenir une alternative à l'implantation d'un défibrillateur.

### *IV.1.3. Données génétiques*

Cette pathologie initialement considérée comme rare, est maintenant estimée comme la première cause de mort subite chez le sujet jeune sans cardiopathie sous-jacente. Rapidement, il a pu être montré que les formes familiales étaient fréquentes dans ce syndrome et par une approche gène-candidat un premier gène a pu être identifié. Il s'agit du gène codant pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque *SCN5A*[138].

#### IV.1.3.1. Canal sodique cardiaque SCN5A

Grâce à l'étude de l'expression des canaux sodiques recombinants, nous avons pu déterminer certains mécanismes biophysiques par lesquels les canaux sodiques mutés provoquaient un syndrome de Brugada.

Plus de 70 mutations responsables du syndrome de Brugada ont été mis en évidence sur le gène *SCN5A* depuis 1998[181 165 174 175]. Toutes provoquent une perte de fonction du canal sodique cardiaque mais à différents niveaux :

- Pas d'expression[138 185] du canal. La mutation se caractérise par la délétion d'une base qui provoque soit l'apparition d'un codon stop prématurément soit un défaut d'épissage. La protéine synthétisée est tronquée et donc non fonctionnelle.
- problème d'adressage membranaire de la protéine[176 177]. Les protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique retiennent les protéines mutantes. Le nombre de canaux sodiques présents à la membrane est réduit et on observe une diminution de la densité de courant sodique.
- Altération des propriétés cinétiques du canal [177 163 183].
- Altération du filtre de sélectivité ionique du pore[163 178 179].

Toutes les mutations n'ont pas fait l'objet d'études électrophysiologiques.

#### IV.1.3.2. Hétérogénéité génétique

L'hétérogénéité génétique de cette pathologie est démontrée puisque 70 à 80% des patients atteints ne sont pas liés à des mutations dans le gène *SCN5A*[185].

En 2002, un deuxième locus pour ce syndrome a été identifié sur le chromosome 3 en 3p22-25 mais à ce jour, le gène responsable de cette deuxième forme de la maladie n'a pas encore été identifié[180]. Les gènes des canaux sodiques *SCN5A*, *SCN10A* et *SCN12A* situés à proximité du locus ont été exclus.

### *IV.1.4. Hypothèses physiopathologiques*

Les mécanismes physiopathologiques qui sous tendent le syndrome de Brugada sont inconnus cependant plusieurs théories ont été émises notamment celle de Charles Antzelevitch. Mais on sait aussi que le système nerveux autonome joue un rôle important dans ces mécanismes.

#### IV.1.4.1. Théorie physiopathologique d'Antzelevitch[181]

La physiopathologie du syndrome de Brugada est encore mal comprise. Le groupe de C. Antzelevitch a proposé que le substrat pour l'aspect électrocardiographique et les troubles du rythme du syndrome de Brugada résidait dans l'hétérogénéité cellulaire du myocarde ventriculaire en particulier au niveau du ventricule droit [164 182 183 184]. En effet, le myocarde ventriculaire est composé d'au moins trois types cellulaires distincts, les cellules épicardiques, endocardiques et M. Ces trois types cellulaires ont des propriétés de repolarisation différentes (Figure 30 A). La théorie d'Antzelevitch est basée sur la différence de repolarisation entre les différents types cellulaires des ventricules et en particulier au niveau du ventricule droit. Cette différence est appelée grandient transmural. En effet, la densité du courant Ito est plus importante dans l'épicarde que dans l'endocarde, en particulier dans l'épicarde du ventricule droit[182]. Ainsi la phase 1 du potentiel d'action

épicardique est caractérisé par une prépondérance du courant sortant (Ito) par rapport au courant entrant (principalement sodique et calcique). Ce déséquilibre de la balance entre les courants entrants et sortants se traduit sur le potentiel épicardique par une encoche « notch ». Les potentiels d'action des cellules épicardiques et M présentent un aspect de « spike and dome » (phase 1) qui est dépendant d'un courant potassique repolarisant transitoire (Ito). L'hétérogénéité spatiale de repolarisation crée un gradient transmural à l'origine du point J sur l'ECG de surface (Figure 30).

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.

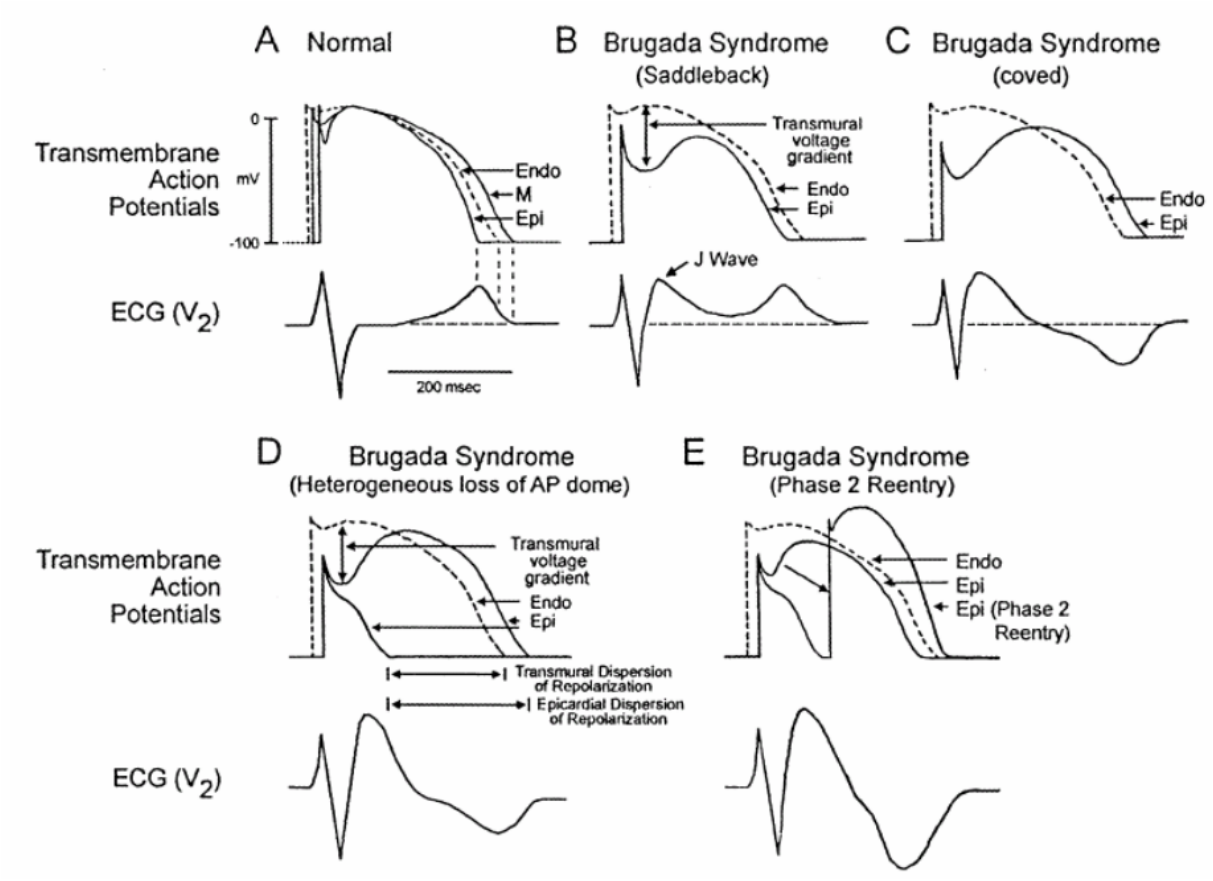
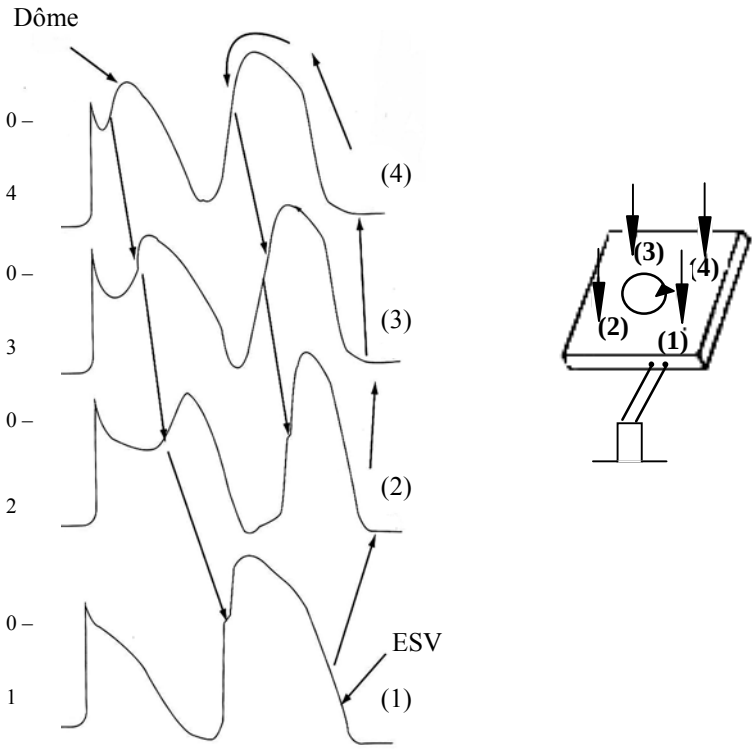



*Figure 30 : Représentation schématique des modifications du potentiel d'action du ventricule droit à l'origine des manifestations électrocardiographiques du syndrome de Brugada.*
*(D'après Antzelevitch[181])*

Dans des conditions pathologiques : l'encoche du potentiel d'action épicardique peut être plus marquée, on note alors une élévation du point J et du segment ST sur 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.

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[159]. Cette prépondérance du courant Ito chez le sujet de sexe masculin serait une des raisons de la prédominance masculine du syndrome.




*<u>Figure 31</u> : Mécanisme de 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.*

La différence de réponse de ces trois types cellulaires à des agents pharmacologiques ou à des conditions pathologiques se traduit souvent par une amplification de cette hétérogénéité cellulaire créant le substrat ainsi que le mécanisme déclenchant d'arythmies par réentrée (tachycardies ventriculaires polymorphes ou fibrillations ventriculaires) retrouvées chez les patients atteints de syndrome de Brugada.

La repolarisation précoce des cellules épicardiques se traduit par un raccourcissement anormal du potentiel d'action selon un phénomène de tout ou rien à la fin de la phase 1. La perte du dôme du potentiel d'action épicardique, alors que la durée des potentiels d'actions endocardiques n'est pas modifiée, se traduit par une grande dispersion de la repolarisation à travers le mur myocardique. Dans ces conditions l'hétérogénéité électrophysiologique du myocarde constitue un substrat arythmogène à la base des réentrées en phase 2[181], capables de déclencher des tachycardies ou fibrillations ventriculaires. La zone épicardique 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 (Figure 31).

Dans le syndrome de Brugada, une mutation dans le gène *SCN5A* est responsable d'une diminution du courant sodique conduisant à une augmentation relative du courant $I_{to}$, la perte du dôme du potentiel d'action des cellules épicardiques et le développement d'une grande dispersion de la repolarisation créent ainsi le substrat arythmogène conduisant à la mort subite[181 182 184].

L'hypothèse physiopathologique développée par Antzelevitch est intéressante mais ne permet pas d'expliquer l'ensemble des éléments retrouvés dans le syndrome de Brugada, car 80% des patients atteints d'un syndrome Brugada n'ont pas de mutation dans le gène *SCN5A*[185].

### IV.1.4.2. Rôle du système nerveux autonome

En 1996, Miyazaki et coll.[186] ont mis en évidence expérimentalement le rôle du système nerveux autonome dans le syndrome de Brugada par l'injection intracoronaire d'acétylcholine, chez des patients atteints de syndrome de Brugada. Cette injection induisait une élévation du segment ST. Les observations cliniques des patients atteints d'un syndrome de Brugada, montrent que les arythmies surviennent typiquement pendant le sommeil ou au repos quand il y a une dominance du système parasympathique[160]. Elles montrent aussi une modulation des manifestations électrocardiographiques du syndrome de Brugada en fonction de certains médicaments ou suivant le tonus vagal et/ou adrénergique[158]. Les agonistes du système sympathique ou les antagonistes parasympathiques diminuent le sus-décalage du segment ST tandis que les bloqueurs adrénergiques et les agonistes parasympathiques accentuent le sus-décalage.

En 2002, Wichter et coll.[187] ont exploré l'intégrité de l'innervation sympathique pré-synaptique grâce à la technique de tomoscintigraphie myocardique monophotonique au méthyl-iodo-benzyl-guanidine (MIBG) marqué à l'iode 123. Le $^{123}$I-MIBG est en compétition avec la noradrénaline endogène, dont il est un analogue pour sa captation dans l'élément présynaptique du nerf. Ils ont mis en évidence un défaut de fixation du marqueur au niveau des parois ventriculaires inférieure et septale gauche chez 47 % des patients atteints de syndrome de Brugada. La diminution de fixation du $^{123}I^{-}$MIBG traduit une dysfonction présynaptique cardiaque. L'augmentation de l'activité sympathique, en rapport avec un phénomène de désensibilisation semble improbable puisque la stimulation β-adrénergique a un effet positif sur la repolarisation dans le syndrome de Brugada. 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.

En 2004, Kies et coll.[188] ont précisé le rôle physiopathologique de la dysfonction du système nerveux autonome dans le syndrome du Brugada (Figure 32). Ils ont remarqué qu'une réduction de la libération de norépinéphrine et/ou une

augmentation de sa recapture diminue la concentration de la norépinéphrine dans l'espace intersynaptique. Cela entraîne une diminution de l'activation des récepteurs β-adrénergiques, une altération de la transduction du signal par les protéines G, l'adénylate cyclase et un faible taux d'AMPc. La protéine kinase A (PKA) n'est alors plus activée et ne peut donc plus phosphoryler les canaux calciques, à l'origine des évènements arythmogènes.

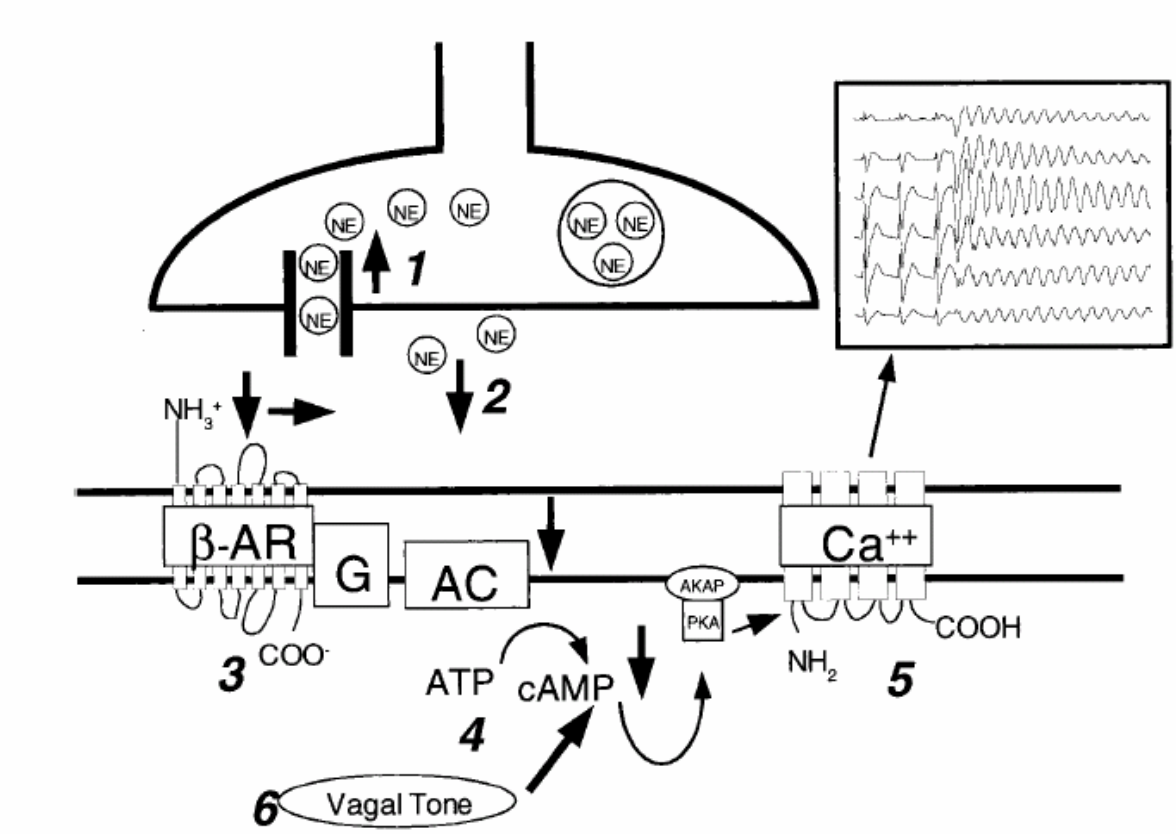



Figure 32 : mécanisme physiopathologique d'une dysfonction du système nerveux autonome dans le syndrome de Brugada.
(D'après Kies et coll.[188])

### IV.1.4.3. Autres hypothèses physiopathologiques

Pour expliquer les modifications électrocardiographiques typiques du syndrome de Brugada, certains auteurs[189] ont proposé un autre mécanisme physiopathologique. 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 électrocardiogramme 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. Cette théorie impliquant un retard de conduction a été discutée par Antzelevitch dans un éditorial[190]. S'il existait un retard de conduction dans le syndrome de Brugada alors l'accélération du rythme cardiaque devrait majorer les troubles de conduction et donc de repolarisation. Par contre, si l'on considère la première théorie, l'accélération du rythme cardiaque s'accompagnerait d'une normalisation de la repolarisation : la récupération des canaux potassiques impliqués dans la genèse du courant $I_{to}$ étant incomplète à fréquence rapide. Le déséquilibre de la balance entre les courants entrant et sortant serait alors moins marqué. Parallèlement à la théorie concernant les anomalies de conduction, une équipe japonaise[191] [192] a cherché à identifier des anomalies morphologiques non détectables avec les techniques usuelles et qui expliqueraient les troubles de repolarisation. Ils ont réalisé chez des patients atteints de syndrome de Brugada 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.

## IV.2. Etude Phénotypique et génétique de familles atteintes du syndrome de Brugada

Au cours de l'étude sur les familles atteintes du syndrome de Brugada, nous avons étudié d'abord les familles Ju., Wi., et Mo. sur lesquelles une analyse de liaison a été effectuée, puis ensuite les familles Ch., Me., Co. et M.

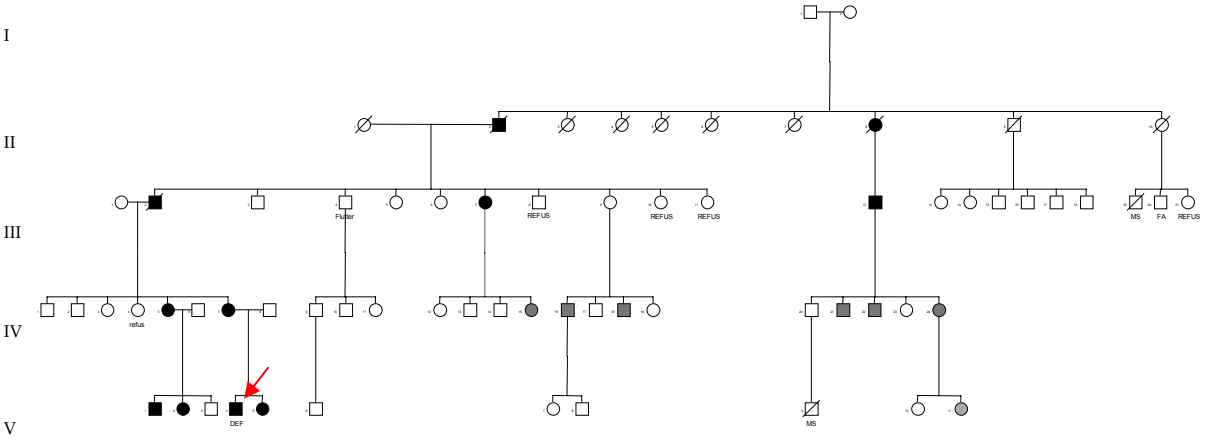
### *IV.2.1. Familles Ju., Wi., et Mo.*

#### IV.2.1.1. Etude phénotypique de la famille Ju.

Lorsque le propositus, âgé de 27 ans a consulté pour exploration d'un souffle, il a été a diagnostiqué sur l'ECG standard, un bloc de branche droite incomplet et un sus-décalage minime du segment ST. Un enregistrement dans le 3ème espace intercostal a été réalisé, montrant un sus-décalage net du segment ST, typique d'un syndrome de Brugada. A l'interrogatoire, on retrouve la notion de malaises d'allure vagale mais aussi d'une perte de connaissance de plusieurs minutes, au repos, suite à une prise d'alcool et de cannabis. Il pouvait s'agir d'une forme sévère de malaise vagal, mais aussi d'un trouble du rythme ventriculaire.
Lors de la stimulation ventriculaire au niveau de l'infundibulum pulmonaire, une fibrillation a été déclenchée, après 2 extrastimuli (S1S2=240ms, S2S3=200ms). Son échocardiographie était normale. 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 mais seulement 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. Comme sa grand-mère maternelle (III-1) avait un test à la flécaïnide négatif, l'enquête s'est ensuite orientée vers le grand père maternel du propositus. En raison de l'ECG de son grand père décédé à 54 ans (individu III-2), 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 ainsi 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.




*<u>Figure 33</u> : arbre généalogique de la famille Ju.*
*Les symboles noirs représentent les individus présentant un syndrome de Brugada et les symboles gris, les individus dont le phénotype est douteux. DEF= défibrillateur.*

Nous sommes donc en présence d'une famille comportant 8 sujets atteints sur 3 générations (Figure 33).

### IV.2.1.2. Etude phénotypique la famille Wi.

La famille Wi. a été recrutée en 2000 à Strasbourg (Figure 34).

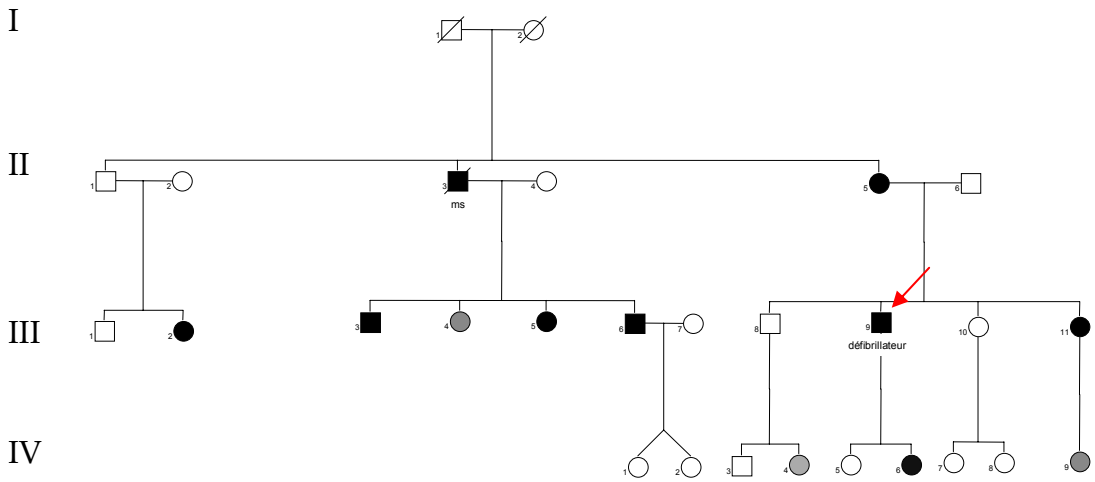



*Figure 34 : arbre généalogique de la famille Wi.*

Le propositus (III-9), âgé de 50 ans, a bénéficié d'un ECG systématique, sur lequel on note un bloc de branche droite incomplet avec un sus-décalage typique du segment ST (Figure 35). L'interrogatoire a retrouvé secondairement une 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 syndrome de Brugada, a entraîné une majoration du sus-décalage du ST. La stimulation ventriculaire a induit une tachycardie ventriculaire. Un défibrillateur automatique a été implanté. Aucun choc électrique n'a été délivré depuis l'implantation (suivi de 26 mois).

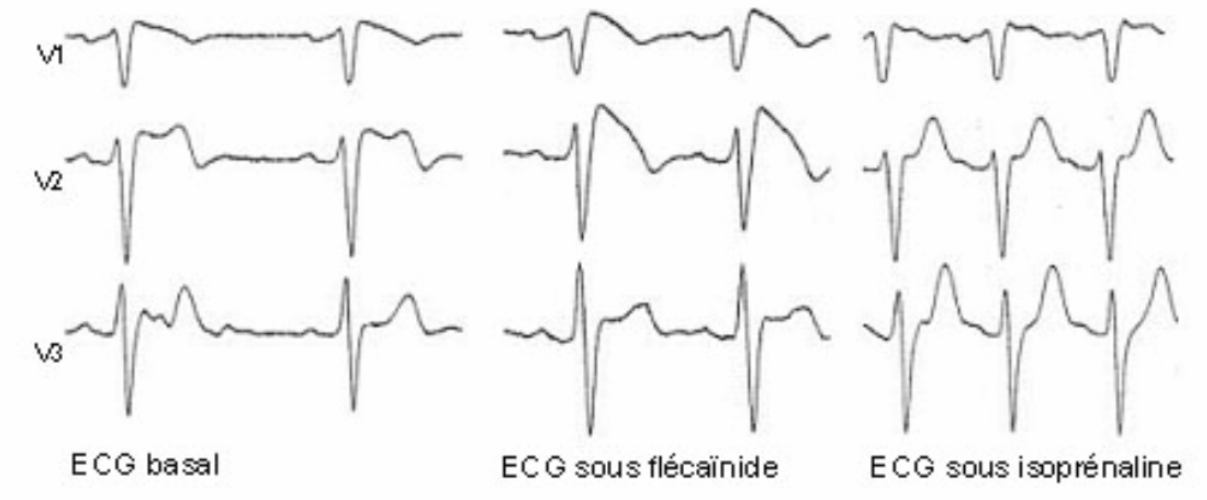
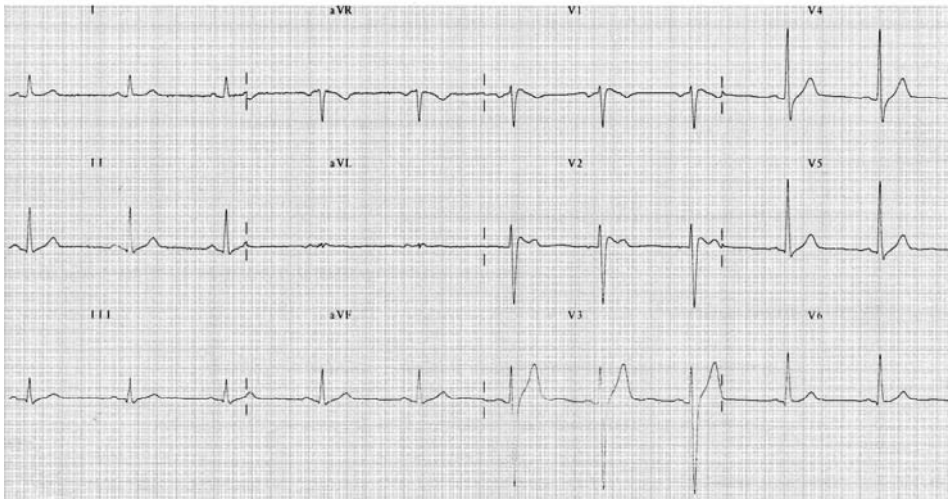



*Figure 35 : Electrocardiogrammes du propositus de la famille Wi (III-9)*

Un des oncles maternels du patient (II-3) est décédé subitement à 41 ans. Six autres membres de la famille présentent un test à la Flécaïne positif. L'individu II-5 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-10 a un ECG de base normal, mais n'a pas reçu de Flécaïne (refus). On ne peut donc pas éliminer formellement un syndrome de Brugada pour cette personne. L'enquête familiale n'a pu être poursuivie.

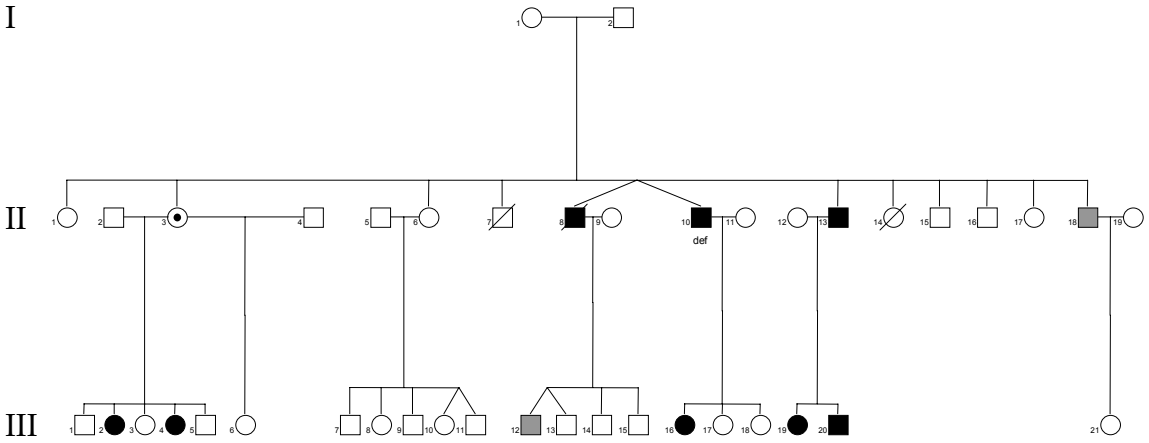
#### IV.2.1.3. Etude phénotypique de la famille Mo.

Cette famille localisée à l'Ile de la Réunion, a été explorée à la suite du décès brutal de l'individu II-8, pendant un repas, à l'âge de 43 ans. Son frère jumeau monozygote (individu II-10), le propositus, présentait un ECG de base évocateur d'un syndrome de Brugada (Figure 36).




*<u>Figure 36</u> : ECG de base du propositus de la famille Mo.*
*En V2, on voit nettement l'aspect en selle de l'onde T qui est caractéristique d'un syndrome de Brugada.*

Le test à la flécaïnide était positif, par contre la stimulation ventriculaire n'a déclenché aucun trouble du rythme. Malgré la négativité de ce test, en raison du contexte familial, un défibrillateur a été implanté.




*<u>Figure 37 :</u> arbre généalogique de la famille Mo.*

Six autres individus sont aussi atteints du syndrome de Brugada (Figure 37). L'individu II-13, dont la stimulation ventriculaire programmée était positive (Tachycardie ventriculaire polymorphe puis fibrillation), est aussi porteur d'un défibrillateur. 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 ?
Comme dans la famille Wi., 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.

### IV.2.1.4. Etude génétique des familles Ju., Wi. et Mo.

Dans un premier temps, nous avons testé les deux locus responsables du syndrome de Brugada. En effet, nous avons exclu le locus du gène *SCN5A*[138] en 3p21 et le 2ème locus du syndrome de Brugada en 3p22-25[180]. Nous avons ensuite testé l'informativité statistique de ces 3 familles en calculant le lod score théorique à 0% de recombinaison et à 100% de pénétrance de la pathologie (Tableau 7).
Compte tenu de l'existence de faux négatifs lors du test à la flécaïne[165], nous avons réalisé une analyse de liaison sur génome entier uniquement sur les individus atteints de ces trois familles. Par conséquent, l'informativité statistique de ces 3 familles est beaucoup diminuée (Tableau 7).

| Famille | Lod Score théorique 0% de recombinaison et à 100% de pénétrance (famille entière) | Lod Score théorique 0% de recombinaison et à 100% de pénétrance (atteint uniquement) |
|---|---|---|
| Famille Ju. | 5,68 | 2,06 |
| Famille Wi. | 2,42 | 1,16 |
| Famille Mo. | 4,45 | 0,86 |

*Tableau 7 : Lod-scores des familles Ju., Wi., et Mo.*

Les lod-scores théoriques de ces 3 familles sont tous inférieurs à 3, mais si nous considérons que dans ces 3 familles, le même gène est responsable du Brugada, nous pouvons alors additionner les lod-scores de ces familles. L'analyse de ces 3

familles simultanément, ne nous a pas permis d'identifier de locus. Nous avons alors décidé d'analyser ces familles indépendamment.

Dans le cas des familles Ju. et Wi., l'analyse de liaison ne nous a pas permis à ce jour de mettre en évidence un nouveau locus du syndrome de Brugada.
Cependant pour la famille Mo., l'analyse de liaison génétique sur l'ensemble du génome a permis de trouver une liaison pour un marqueur avec un lod score de 3.61 à 0% de recombinaison et 100% de pénétrance. Pour confirmer et définir précisément l'intervalle de liaison génétique, nous avons testé d'autres marqueurs génétiques de la zone. L'analyse de ces marqueurs nous a permis de définir l'intervalle de liaison minimal de 5,4 Mb (Figure 38).

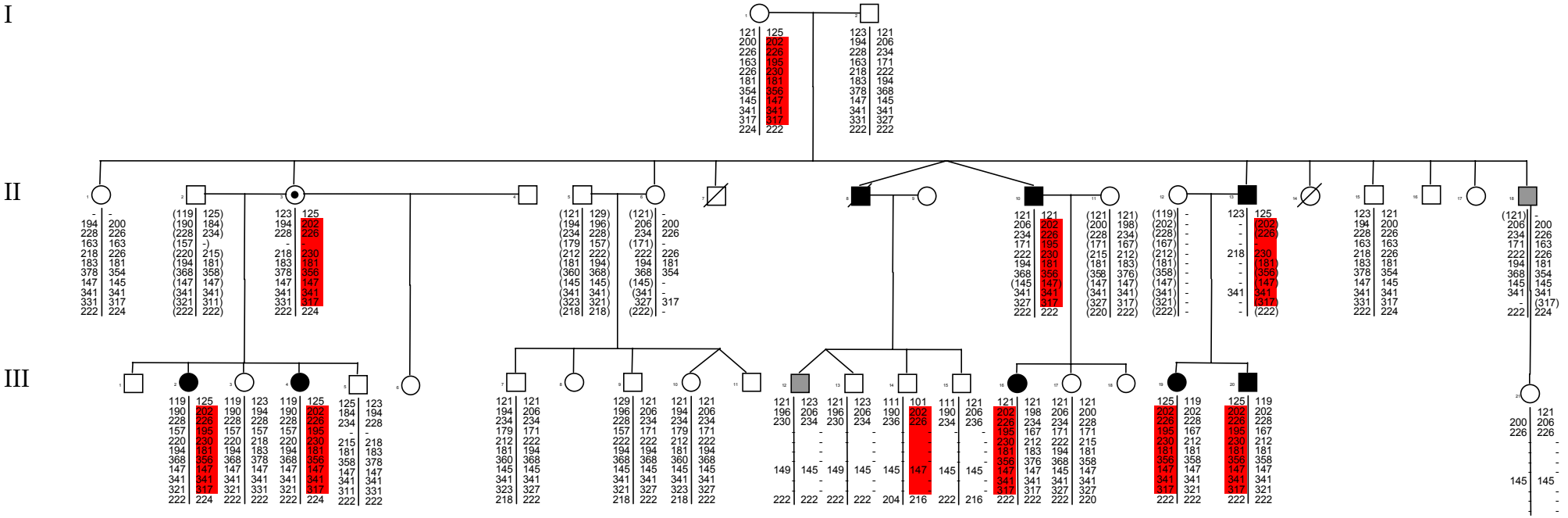



*Figure 38 : résultats de l'analyse génétique de la famille Mo.*
*Les haplotypes sont représentés sous chaque symbole. L'haplotype morbide est surligné en rouge.*

Cette zone de 5,4 Mb comprend 51 gènes dont 32 sont à expression cardiaque. Tous sont des candidats potentiels car ils se situent dans la zone de liaison. Cependant, nous avons choisi de séquencer un certain nombre de gènes dont les fonctions ou caractéristiques sont cohérentes avec les hypothèses physiopathologiques du syndrome de Brugada. Nous avons déjà séquencé un canal sodique, un canal potassique, 2 facteurs de transcription sans mettre en évidence de mutation.

### *IV.2.2. Familles Ch., Me., Jo., Co., et M.*

#### IV.2.2.1. Etude phénotypique et génétique de la famille Ch.

Sur les conseils de la médecine du travail, le propositus (II-2) est allé consulter un cardiologue qui a confirmé le diagnostic de syndrome de Brugada, après réalisation d'un ECG 12 dérivations.

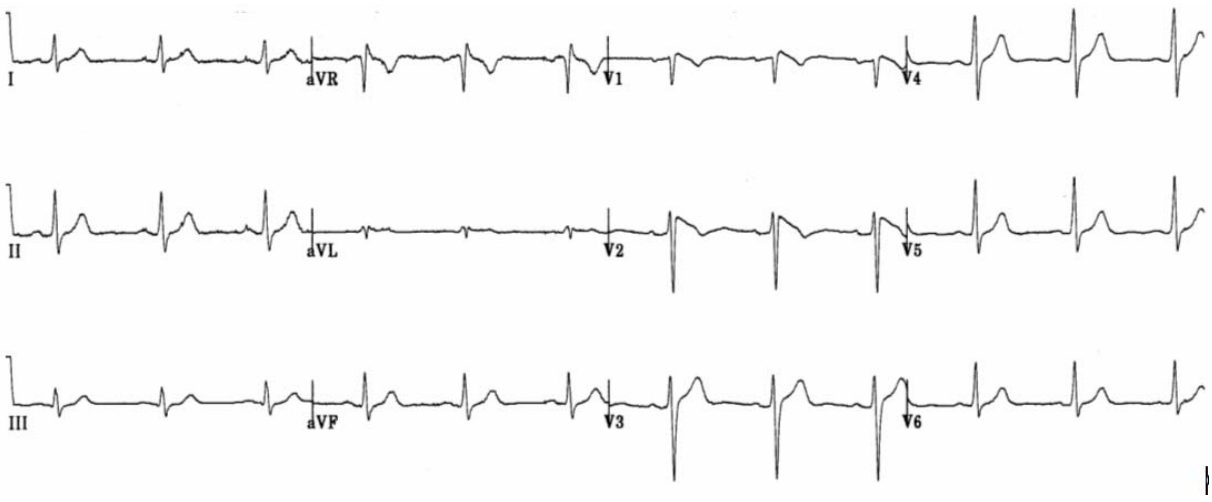



*Figure 39 : ECG basal du propositus de la famille Ch.*

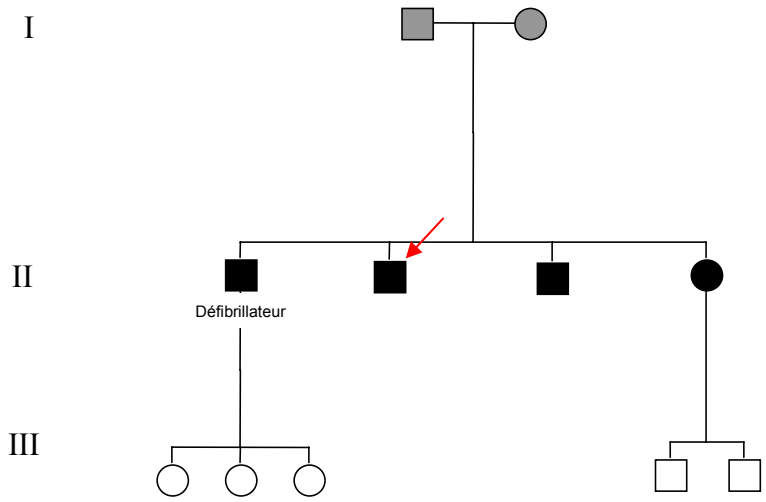



*Figure 40 : arbre généalogique de la Famille Ch.*

Dans le cadre de l'enquête familiale (Figure 40), nous avons identifié 3 autres personnes atteintes d'un syndrome de Brugada dont le frère du propositus (II-1) qui présentait un ECG caractéristique d'un syndrome de Brugada et qui était sujet à de fréquentes syncopes. Il a donc été décidé de lui implanter un défibrillateur cardiaque.

*Figure 41 : ECG basal de l'individu II-1 de la famille Ch.*

Tous les individus de la famille présentant des signes du syndrome de Brugada avait un test à l'ajmaline® positif. Après un examen électrocardiographique et un test à l'ajmaline®, il nous a été impossible de déterminer lequel des parents était atteint d'un syndrome de Brugada.

Après un diagnostic de syndrome de Brugada, une recherche de mutation sur le gène *SCN5A* est effectuée systématiquement. Aucune mutation du gène *SCN5A* n'a été mise en évidence chez le propositus.

### IV.2.2.2. Etude phénotypique et génétique de la famille Me.

Cette étude a fait l'objet d'une publication soumise au Journal of Cardiovascular Electrophysiology (en révision) : Vincent Probst, MD, PHD ; Marie Allouis ; Stephane Evain; Veronique Gournay, MD ; Jean-Jacques Schott, PhD ; Pierre Boisseau, PhD and Herve Le Marec, MD, PhD. Monomorphic Ventricular Tachycardia due to Brugada Syndrome Successfully Treated by Hydroquinidine Therapy in a Three-Year-Old Child.

Le propositus (IV-1) une petite fille de 3 ans, a été hospitalisée pour fièvre et vomissement. Elle présentait une tachypnée (46/min), une pression sanguine normale (83/55 mm de Hg), une température corporelle normale et une saturation du sang en oxygène normale (97%). Son ECG montre une tachycardie rapide et monomorphe (240 bpm), des complexes QRS larges, une déviation axiale gauche et présente un aspect de bloc de branche gauche (Figure 42). Elle a été traitée par cardioversion par choc électrique externe (24J), ce qui a permis de restaurer un rythme sinusal normal.

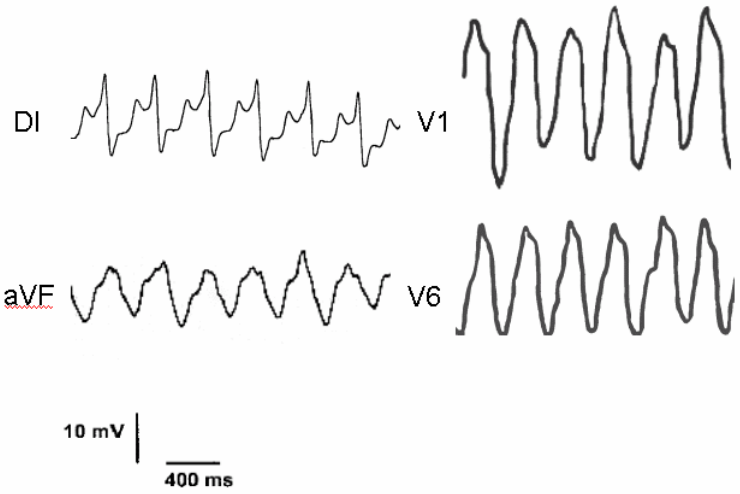



*Figure 42 : ECG du propositus de la famille Me présentant une tachycardie monomorphe avec des QRS larges, une déviation axiale gauche, et un aspect de bloc de branche gauche.*

L'ECG effectué après la cardioversion montre un bloc de branche droit avec un sus-décalage du segment ST et un hémibloc postérieur gauche (axe du QRS 120°) suggérant un syndrome de Brugada (Figure 43). Compte tenu de son poids (12kg), l'implantation d'un défibrillateur était impossible, un traitement par voie oral d'hydroquinidine (150mg 2 fois par jours) a alors été mis en place. Pendant les 13 mois qui ont suivi, cette petite fille a été hospitalisée 3 fois pour fièvre et mise sous surveillance cardiaque constante, mais aucune arythmie n'a été enregistrée.

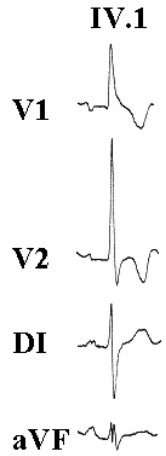



*Figure 43 : ECG du propositus montrant un bloc de branche droit et un hémibloc postérieur gauche associé à un sus-décalage du segment ST en V1*

L'enquête familiale a permis de mettre en évidence 3 autres personnes atteintes dans cette famille (Figure 44), dont la mère du propositus (III-1), l'une de ses tantes (III-2) ainsi que sa grand-mère (II-1).

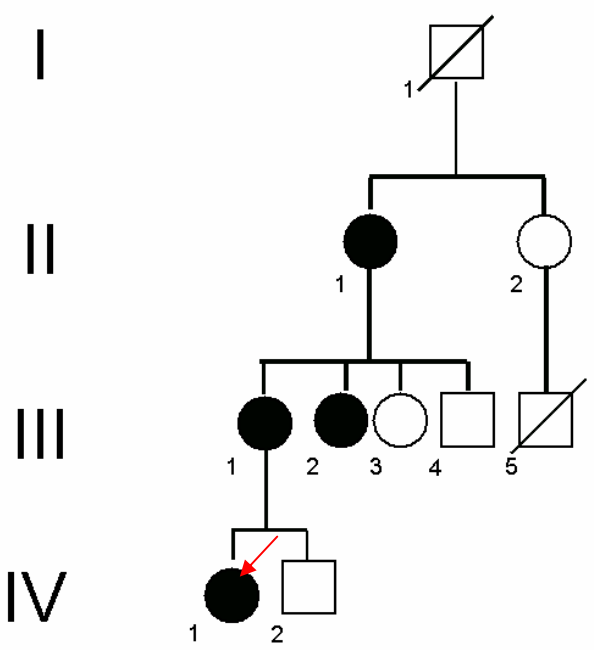



*Figure 44 : arbre généalogique de la famille Me.*

L'ECG de la mère du propositus (III-1) montre un aspect typique du syndrome de Brugada avec un sus-décalage du segment ST dans les dérivations précordiales droites, un bloc de branche droit complet et un PR long (212 ms) (Figure 45).

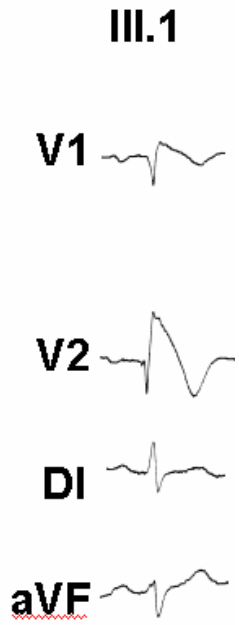



*Figure 45 : ECG de la mère du propositus de la famille Me.*

La tante (III-2) et la grand-mère du propositus (II-1), ne présentaient pas de signes électrocardiographie du syndrome de Brugada, mais le test à l'ajmaline a permis de démasquer le syndrome de Brugada. L'ECG du patient II-2 présente des troubles de la conduction cardiaque non spécifique et son test à l'ajmaline était normal.
Les autres individus de la famille ne présentaient aucun signe du syndrome de Brugada et leurs tests à l'ajmaline étaient normaux. Le patient IV-6, un enfant de 6 ans, n'a pas subi de test à l'ajmaline compte tenu de son âge.

Après un diagnostic de syndrome de Brugada, une recherche de mutation sur le gène *SCN5A* est effectuée systématiquement. Chez cette petite fille, la mutation L839P de l'exon 16 (Figure 46) a été retrouvée, elle coségrège parfaitement avec le syndrome de Brugada, dans cette famille (Figure 47). Cette mutation n'a été retrouvée chez aucun des 200 individus sains testés.

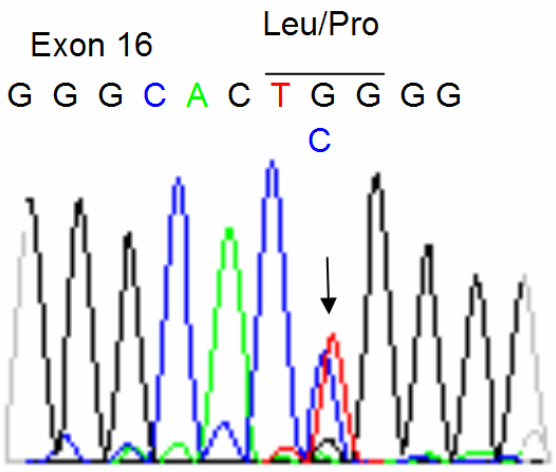
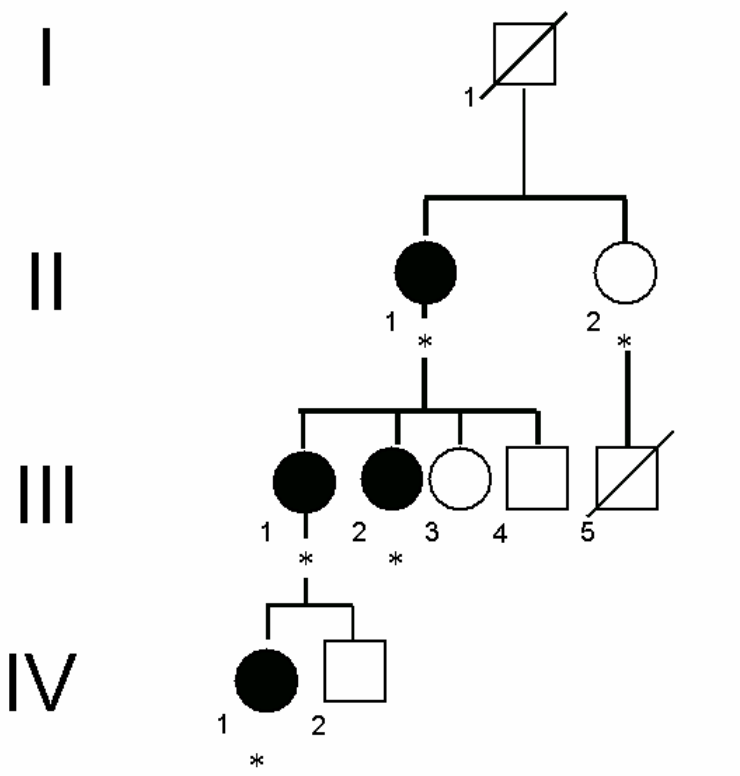



*Figure 46 : mutation SCN5A de la famille Me.*
*Cette mutation de l'exon 16 remplace une leucine en proline en position 838.*




*<u>Figure 47</u> : analyse génétique de la famille Me.*
*Le symbole + indique les individus porteurs de la mutation L839P du gène SCN5A, et le symbole – indique l'individus qui ne possède pas cette mutation.*

### IV.2.2.3. Etude phénotypique et génétique du patient Jo.

L'individu isolé Jo. est arrivé aux urgences après avoir fait une syncope. A son arrivée à l'hôpital, il était en fibrillation ventriculaire. Après réanimation et stabilisation de son état, un électrocardiogramme a été réalisé, le patient Jo. présentait en V1 et V2 un aspect en selle de l'onde T qui est caractéristique d'un syndrome de Brugada (Figure 48).

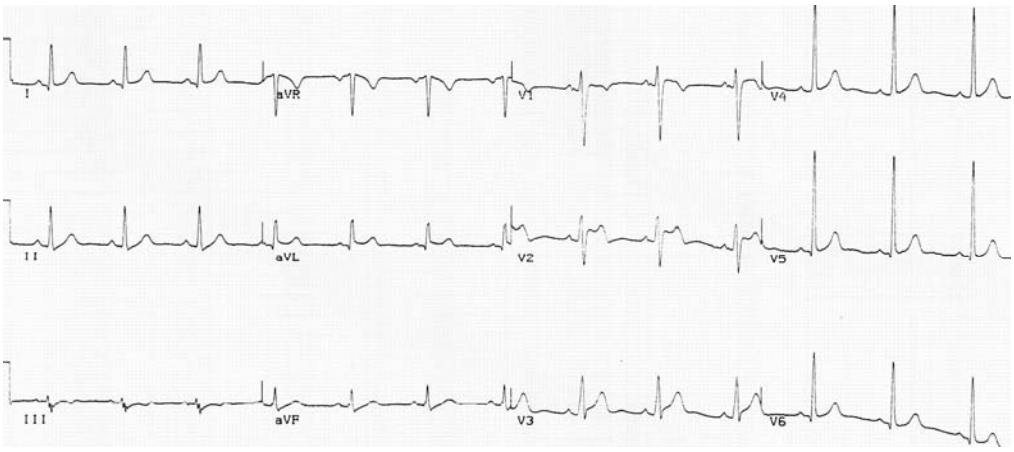



*Figure 48 : ECG de base de l'individu Jo.*

L'enquête familiale n'a pas permis de recruter les apparentés de cette personne, car ces derniers ont refusé de participer à l'enquête familiale (Figure 49).

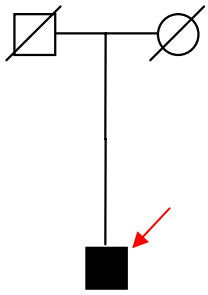


*Figure 49 : arbre généalogique famille Jo.*

Après un diagnostic de syndrome de Brugada, une recherche de mutation sur le gène *SCN5A* est effectuée systématiquement. Aucune mutation du gène *SCN5A* n'a été retrouvée chez ce patient.

### IV.2.2.4. Etude phénotypique et génétique de la famille Co.

Le propositus de cette famille (III-18) présentait en V1 et V2 de son ECG un aspect en selle de l'onde T caractéristique d'un syndrome de Brugada. Dans le cadre de l'enquête familiale (Figure 50), nous avons identifié 7 autres personnes atteintes d'un syndrome de Brugada.

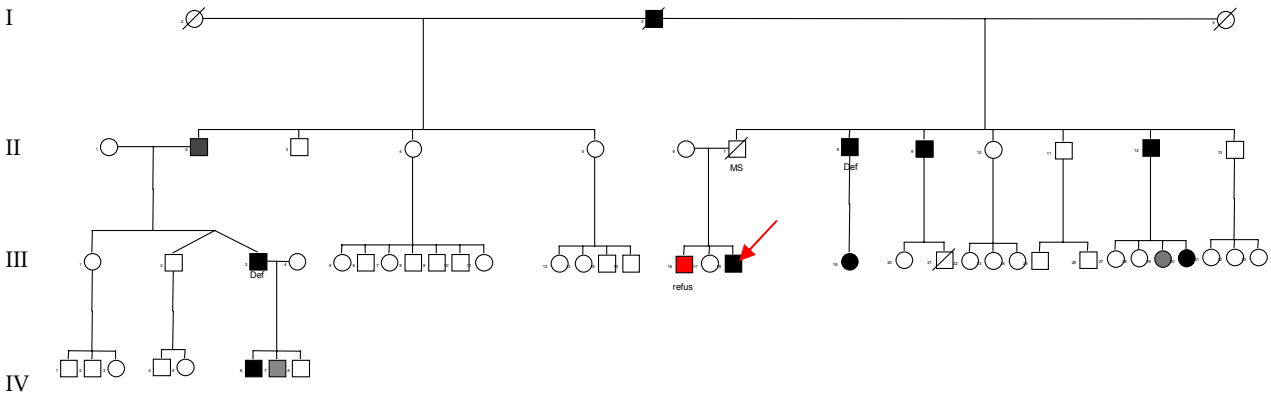



*Figure 50 : arbre généalogique de la famille Co.*

Après un diagnostic de syndrome de Brugada, une recherche de mutation sur le gène SCN5A est effectuée systématiquement. La mutation D1275N a été retrouvée chez le propositus. Cette mutation ne ségrège pas avec le syndrome de Brugada dans cette famille.

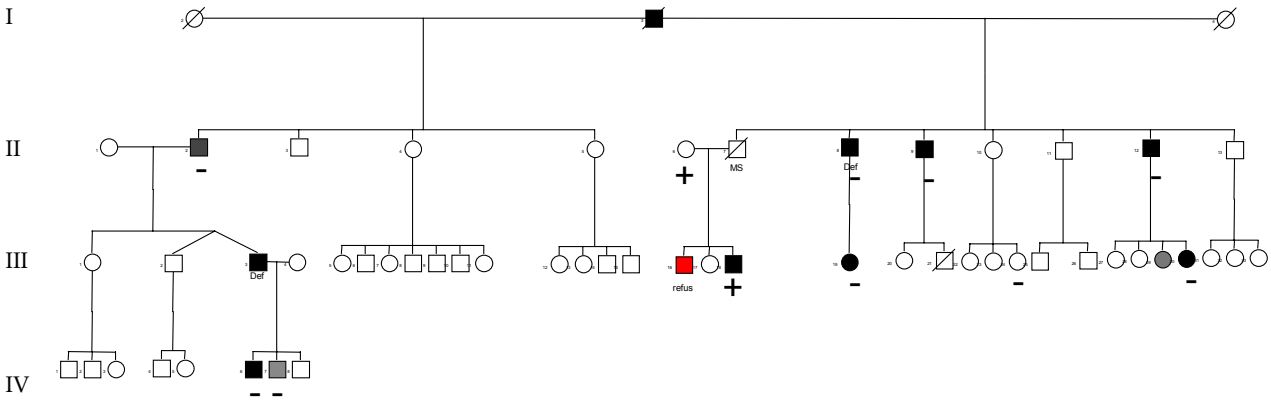



*Figure 51. Analyse génétique de la famille Co.*
*Le signe + correspond à la mutation D1275N retrouvée dans le gène SCN5A et le signe – correspond au personne non porteuse de cette mutation.*

### IV.2.2.5. Etude phénotypique et génétique de la famille M.

Le propositus de cette famille (III-9) présentait en V1 et V2 de son ECG un aspect en selle de l'onde T caractéristique d'un syndrome de Brugada. Dans le cadre de l'enquête familiale (Figure 50), nous avons identifié 4 autres personnes atteintes d'un syndrome de Brugada.

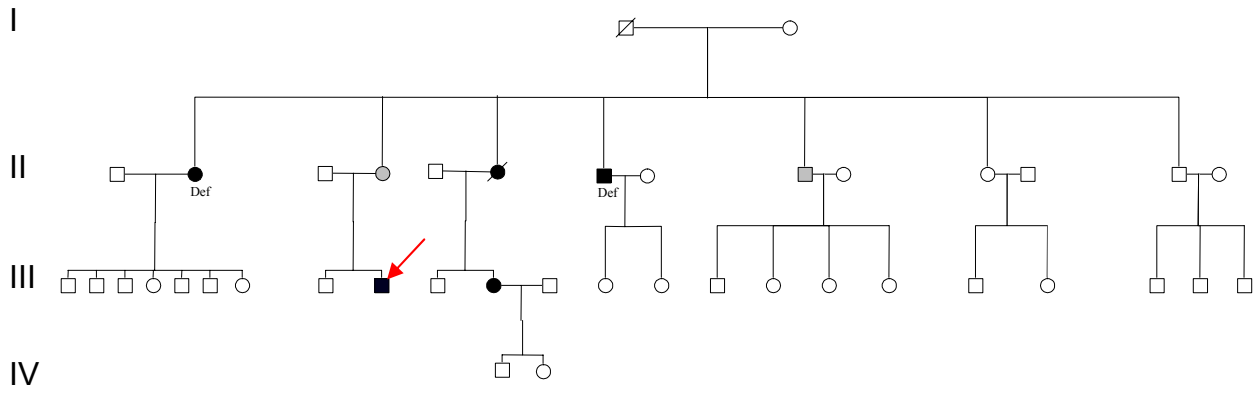



*Figure 52 : Arbre généalogique de la famille M.*

Après un diagnostic de syndrome de Brugada, une recherche de mutation sur le gène SCN5A est effectuée systématiquement. La mutation N1722D a été retrouvée chez le propositus. Cette mutation ne coségrège pas avec le syndrome de Brugada dans cette famille. Les patients II-2 et II-7 ne sont pas porteurs de la mutation N1722D bien qu'atteint du syndrome de Brugada.

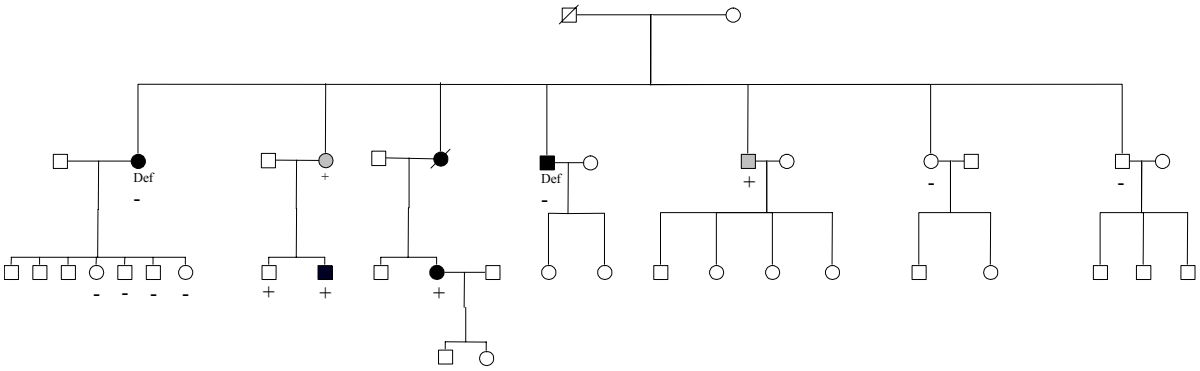



*Figure 53 : Analyse génétique de la famille M.*
*Le signe + correspond à la mutation N1722D retrouvée dans le gène SCN5A et le signe – correspond au personne non porteuse de cette mutation.*

## IV.3. Etude généalogique

Le syndrome de Brugada est une pathologie rare, cependant, la structure de recherche clinique sur les maladies cardiovasculaires du CHU de Nantes a mis en évidence plusieurs familles atteintes de ce syndrome (les familles Ju., Ch. Me. et Jo.), toutes originaires du Nord de Nantes (Figure 54). Les familles Ch. et Jo. n'étant pas assez grandes pour effectuer une analyse de liaison sur génome entier, nous

avons essayé de relier ces petites familles par la généalogie pour n'en former qu'une seule.

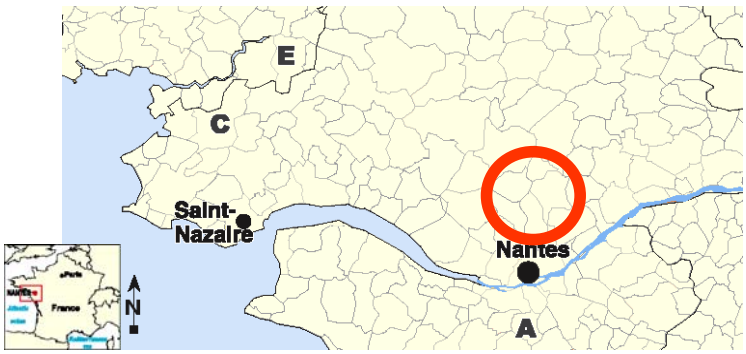



*Figure 54 : les communes d'origine de ces 3 familles sont localisées par le cercle rouge.*

Nous avons réalisé l'enquête généalogique à partir des propositus des familles Ju., Ch. Me. et Jo. mais aussi celui d'une autre famille originaire du nord de Nantes (famille R.). Bien que dans cette famille R., la mutation S1328I sur le gène SCN5A ait été identifiée, elle ne coségège pas avec le syndrome de Brugada. En effet, un patient atteint du syndrome de Brugada n'est pas porteur de cette dernière.

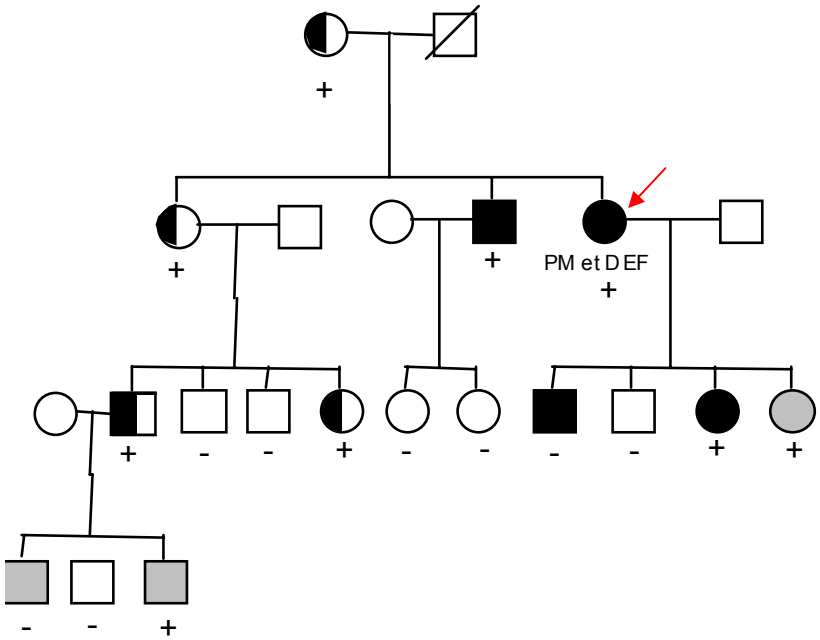



*Figure 55 : analyse génétique de la famille R.*
*Le symbole + indique les individus porteurs de la mutation G4295T (S1328I) dans l'exon 23 du gène SCN5A, et le symbole – indique l'individus qui ne possède pas cette mutation.*

Nous avons relié ces familles entre elles mais nous n'avons à ce jour mis en évidence aucun ancêtre commun (Figure 56). Nous avons réussi à relier au mieux 3 familles (Jo., R. et Ju.)

Chez 2 (famille R. et Me.) des 5 propositus des familles utilisés pour réaliser cette enquête généalogique, une mutation sur le gène SCN5A a été retrouvé. Cependant, malgré le lien généalogique qui existe, ces 2 propositus sont porteurs de mutations différentes sur le gène SCN5A.

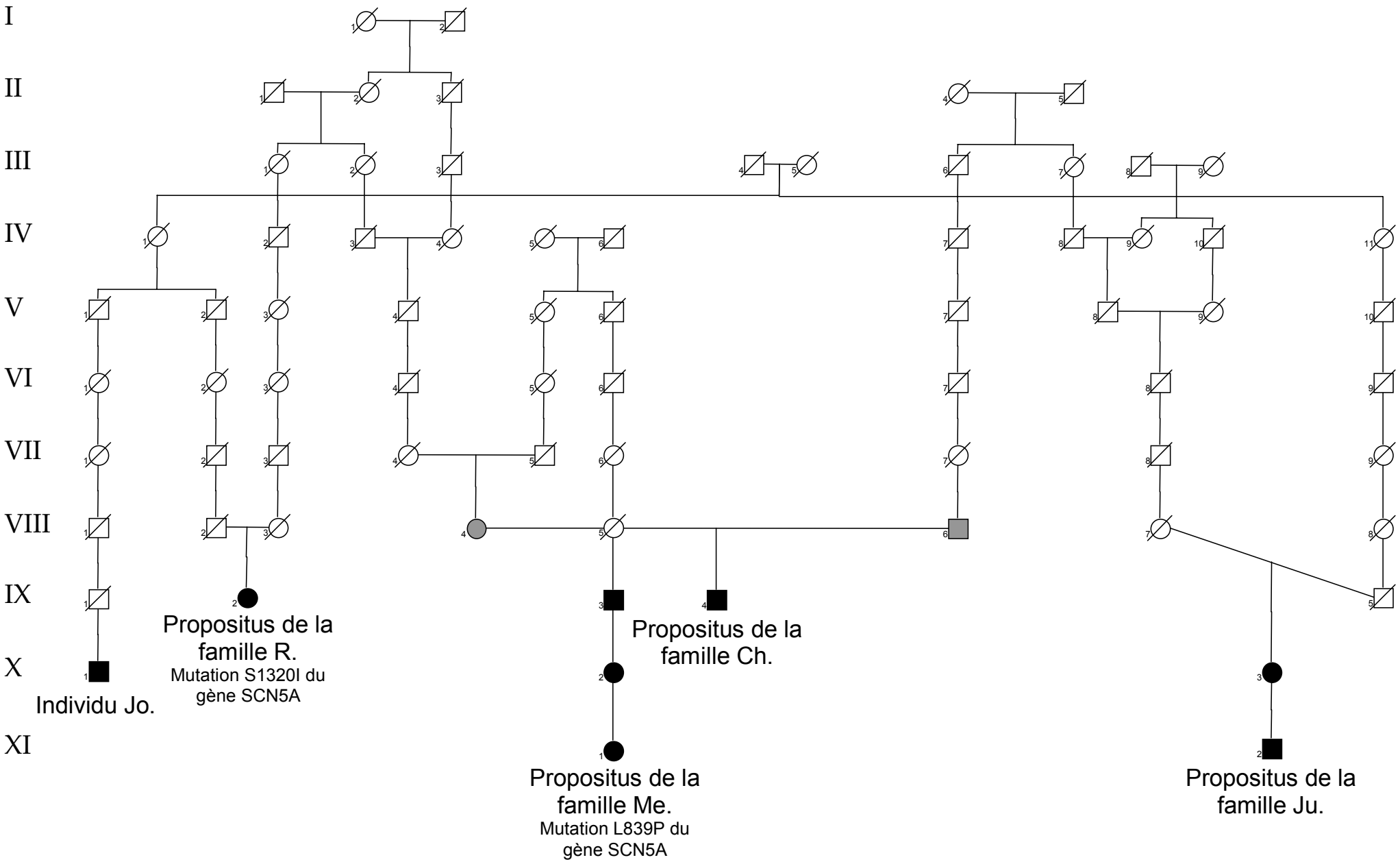



*Figure 56 : résultats de la généalogie ascendante des familles R., Ch., Me., Ju., et Jo.*

## IV.4. Discussion

Les fibrillations ventriculaires seraient responsables de plus de 300 000 morts subites par an aux Etats-Unis et d'environ 70 000 en France[138]. Environ 80% des patients souffrant de tachycardies ventriculaires potentiellement mortelles ont une maladie artérielle coronaire athérosclérotique avancée et la plupart ont une histoire d'infarctus du myocarde. Cinq à 10% de ces fibrillations ventriculaires restent inexpliquées. Le syndrome de Brugada représente 40 à 60% de ces fibrillations ventriculaires idiopathiques[137 138]. Le syndrome de Brugada a fait l'objet de nombreuses publications en 13 ans. Cette pathologie suscite d'autant plus d'intérêt qu'elle peut mettre en jeu le pronostic vital et qu'à l'heure actuel seul un traitement préventif, par implantation d'un défibrillateur automatique, existe.

- **Hétérogénéité génétique**

Dès les premières études, le caractère héréditaire du syndrome de Brugada suggérait fortement l'implication de facteurs génétiques. A ce jour, le seul gène dont l'implication a été démontrée est le gène SCN5A[138]. Cependant, un second locus en 3p22-25 co-ségréguant d'une façon autosomique dominante, a été identifié par analyse de liaison dans une famille[180].

Les familles que nous avons étudié, au cours de ce travail de thèse sur le syndrome de Brugada ne sont ni liées au locus du chromosome 3, ni au gène SCN5A sauf deux (Famille R. et Me.). L'étude de la famille Mo., nous a permis de mettre en évidence un nouveau locus. L'analyse de marqueurs génétique, nous a permis de définir l'intervalle de liaison minimal de 5,4 Mb. Cet intervalle de liaison comprend 51 gènes dont 32 sont à expression cardiaque. Compte tenu des différentes théories physiopathologiques du syndrome de Brugada, nous testons les gènes qui semblent les plus cohérents. A ce jour, nous avons séquencé, un canal sodique, un canal potassique, 2 facteurs de transcription et une ubiquitine ligase, sans mettre en évidence de mutation.

Aucune des autres familles atteintes du syndrome de Brugada ne coségrège avec ce locus, ce qui nous laisse présager une hétérogénéité génétique plus importante.

- **Problème de coségrégation des mutations du gène SCN5A dans les familles atteintes du syndrome de Brugada.**

Dans la famille R., on retrouve des patients atteints de troubles de la conduction cardiaque et d'autres de syndrome de Brugada associé à des troubles de la conduction (Figure 55). Dans la famille R., une mutation S1328I a été retrouvée dans le gène SCN5A, elle coségrège avec les troubles de conduction mais pas avec le syndrome de Brugada (Figure 55). Dans les familles Co. et M., nous avons mis en évidence des problèmes de coségrégation entre une mutation SCN5A et le syndrome de Brugada (Figure 51 et Figure 53).

La mutation D1275N retrouvée dans la famille Co. ne coségrège pas dans la famille avec le syndrome de Brugada. Cette mutation a été déjà décrite par Groenewegen et coll.[193] associée à 2 polymorphismes très proches de la connexine 40 (l'un dans la région promotrice et l'autre dans l'exon 1) dans une famille atteinte d'extinction auriculaire. Les études électrophysiologiques montre que cette mutation D1275N ne modifie pas significativement les propriétés du canal sodique. Cette mutation D1275N a été aussi retrouvée par McNair et coll.[121] dans une famille atteinte d'une forme particulière de cardiomyopathie dilatée, qui se caractérise par une dysfonction sinusale, des tachyarythmies supraventriculaires, des troubles de la conduction cardiaque progressifs. Compte tenu du fait que dans la famille Co. la mutation D1275N ne coségrège pas avec le syndrome de Brugada et qu'elle n'a pas d'effet significatif sur la cinétique du canal, il est probable qu'elle n'est pas en cause dans le syndrome de Brugada de cette famille.

Les mutations SCN5A pourraient être responsables de troubles de la conduction cardiaque tandis que des mutations dans un autre gène seraient à l'origine du syndrome de Brugada. La mise en évidence de nouveau gène responsable de ce syndrome permettra peut-être de répondre à cette question.

- **Variabilité phénotypique du syndrome de brugada**
    - Pénétrance

Dans une famille atteinte d'un syndrome de Brugada, parmi les patients porteurs de la même mutation, certains feront des morts subites et d'autres non. Priori et coll.[165] évaluent une pénétrance moyenne des mutations SCN5A de 16% à partir des ECG de base. Elle passe à 71,1% après test à la Flécaïne[171]. Le locus que j'ai mis en évidence dans la famille Mo. coségrège parfaitement. La pénétrance de la mutation du gène reponsable du syndrome de Brugada dans cette famille est complète. Cependant, cela ne pourra être confirmé que par l'identification du gène muté.

    - Expressivité variable.

Notre équipe a décrit en 2001[178], une famille dans laquelle la même mutation G1408R est responsable de troubles de la conduction cardiaque ou du syndrome de Brugada.

En 1999, Bezzina et coll.[194] ont identifié une famille où les ECG des patients atteints présentent à la fois un aspect de QT long (allongement de l'intervalle QT) et un aspect de syndrome de Brugada (sus-décalage du segment ST dans les dérivations précordiales droites). Ces patients atteints sont porteurs d'une seule mutation 1795insD sur SCN5A.

En 2004, Chang et coll.[195] ont retrouvé chez un nouveau-né atteint d'un syndrome du QT long associé à un bloc auriculo-ventriculaire. L'analyse par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) du gène SCN5A a montré que ce nouveau-né était porteur de la mutation *de novo* V1763M. Cette mutation est responsable de 2 pathologies différentes.

En 2002, Grant et coll.[196] ont identifié une famille où les porteurs de la délétion K1500 du gène SCN5A pouvaient être atteints d'un syndrome du QT long, du Brugada ou présentés des troubles de la conduction cardiaque. Cette mutation est à l'origine dans cette famille d'un syndrome de Brugada, du QT long et de troubles de la conduction cardiaque.

Toutes ces études montrent qu'il existe une variabilité phénotypique parmi les individus porteurs de la même mutation. Le phénotype est le résultat de l'interaction complexe entre un gène causal, son environnement génétique (gènes modificateurs)

et des facteurs environnementaux. Actuellement, nous ne connaissons que très peu de choses concernant les facteurs d'origine génétique qui vont influencer l'évolution de la maladie. Nous pensons que l'identification de ces facteurs sera l'un des grands challenges des prochaines années.

- Facteurs épistatiques responsables de variations phénotypiques

Dès les premières études publiées sur cette pathologie, les observations montraient que les hommes étaient plus sévèrement atteints que les femmes. En effet, seulement 12% des femmes sont symptomatiques alors que 25% des hommes le sont[165 197]. Récemment, les caractéristiques électrocardiographiques du syndrome de Brugada ont disparues chez 2 hommes après la réalisation d'une castration chirurgicale[198]. Tout cela vient renforcer l'hypothèse que les hormones sexuelles mâles jouent un rôle important dans le syndrome de Brugada

A l'inverse, les oestrogènes pourraient avoir un rôle protecteur dans le cadre d'un syndrome de Brugada. En effet Di Diego et coll. ont montré que la densité des canaux impliqués dans le courant $I_{to}$ dans la paroi du ventricule droit de chien était plus importante chez le mâle que chez la femelle[159]. Cette différence d'expression de ces canaux serait le résultat de la régulation des oestrogènes[199].

- Facteurs génétiques responsables de variations phénotypiques

La variabilité phénotypique pourraient être liée à la présence de polymorphisme soit en cis soit en trans du gène SCN5A. En effet, le polymorphisme H558R[200] seul, n'a aucun effet sur le canal mais est capable d'atténuer les effets de la mutation T512I du gène SCN5A[201]. Le polymorphisme H558R se comporte comme un allèle protecteur de la mutation T512I et il est possible que d'autres polymorphismes aient des effets semblables sur d'autres mutations. Il a aussi été montré qu'un polymorphisme du gène SCN5A (Y1103S) était un facteur de risque des populations afro-américaines[202], mais aussi caucasiennes[203].

Tout cela suggère que des facteurs génétiques tels que des gènes modulateurs ou des polymorphismes pourraient influencer l'expression phénotypique chez les sujets porteurs de mutation du gène SCN5A.

- **Epidémiologie génétique**

Le syndrome de Brugada est une pathologie rare, cependant la structure de recherche clinique sur les maladies cardiovasculaires du CHU de Nantes a identifié plusieurs familles atteintes de ce syndrome (les familles Ju., Ch. Me. et Jo.), toutes originaires du Nord de Nantes. Compte tenu l'incidence importante qu'il semblait y avoir au nord de Nantes, nous avons développé une approche d'épidémiologie génétique dans le syndrome de Brugada. Notre équipe a déjà développé ce type d'approches dans certaines pathologies telles que les rétrécissements aortiques et les troubles de la conduction cardiaque dégénératifs. Pour le syndrome de Brugada, nous en sommes qu'au début. Nous avons essayé de relier par la généalogie ascendante des familles atteintes du syndrome de Brugada originaires du nord de Nantes. Nous sommes ainsi parvenus à relier 4 familles mais seulement 2 à 2 (Figure 56). Mais il est fortement probable qu'il existe un ancêtre commun à ces 4 familles. Pour l'instant l'étude de cette grande famille, ne nous a pas permis de mettre en évidence un nouveau gène responsable du syndrome de Brugada. Dans 2 des 5 familles utilisées pour cette étude généalogique, une mutation sur le gène SCN5A a été identifiée. Cependant à chaque fois, la mutation de SCN5A est différente. Compte tenu du lien généalogique qui relie ces familles, le manque de coségrégation de la mutation S1328I dans la famille R. et la sévérité de la pathologie du propositus de la famille Me., nous sommes amenés à penser que le syndrome de Brugada n'était peut-être pas uniquement dû à des mutations dans le gène SCN5A.

La création de grandes bases de données à la fois cliniques, biologiques, généalogiques et génétiques, nous permettra peut-être d'identifier de nouveaux gènes ou des facteurs modulateurs du syndrome de Brugada.

# DEUXIEME PARTIE : ETUDES PHENOTYPIQUES ET GENETIQUES DE FAMILLES ATTEINTES TROUBLES DE LA CONDUCTION CARDIAQUE PROGRESSIFS

## *I. Description*

Les troubles de la conduction cardiaque sont très fréquents dans la population générale. Ils sont le résultat d'un ralentissement ou d'un arrêt de la conduction électrique au niveau du noeud auriculo-ventriculaire, du faisceau de His ou du tissu de Purkinje. On différencie plusieurs types de troubles de la conduction cardiaque selon le degré de sévérité et le siège du bloc (Figure 57). Les blocs auriculo-ventriculaires complet (ou BAV) représentent la forme la plus grave.

Le bloc auriculo-ventriculaire de 1$^{er}$ degré se caractérise par un délai de conduction entre les oreillettes et les ventricules supérieur à 200ms. Chaque onde P est suivie d'un complexe QRS (Figure 57).

Le bloc auriculo-ventriculaire de 2$^{ème}$ degré se caractérise par des ondes P qui ne sont pas toujours suivies d'un complexe QRS. Il existe 3 types de bloc auriculo-ventriculaire de 2$^{ème}$ degré qui se situent en général au niveau du noeud auriculo-ventriculaire :

- Type Mobitz I : L'intervalle PR s'allonge de battement en battement jusqu'au blocage de l'activité auriculaire puis le cycle recommence.

- Type Mobitz II: L'intervalle PR est constant, normal ou prolongé, une onde P est bloquée. Dans ce cas, le bloc se situe souvent au niveau du faisceau de His.

- Bloc auriculo-ventriculaire de haut degré. Sur l'ECG, le nombre d'onde P est de 3 ou plus pour un complexe QRS. Dans le cas des complexes conduits, l'intervalle PR est constant.

*Figure 57 : électrocardiogrammes associés aux différents types de blocs auriculo-ventriculaires. (D'après Mangrum et coll.[204])*

Ces altérations de la conduction peuvent évoluer vers un BAV complet ou BAV de 3ème degré. Dans ce cas, il y a dissociation complète de l'activité des oreillettes et des ventricules, l'influx électrique créé au niveau des oreillettes ne peut alors plus être conduit jusqu'aux ventricules. L'automatisme intrinsèque (rythme d'échappement) des ventricules ou du noeud auriculo-ventriculaire doit prendre le relais[205]. L'aspect des complexes QRS et la fréquence du rythme d'échappement seront variables en fonction du niveau où se situe le bloc.

Lors d'un BAV complet, si la prise de relais par l'automatisme ventriculaire tarde ou si la fréquence d'échappement est trop basse, cela peut provoquer chez le patient des syncopes voire une mort subite, ce qui fait toute la gravité de cette maladie prévenue par l'implantation d'un stimulateur cardiaque. Aucune donnée

épidémiologique précise n'est disponible, mais on estime la fréquence d'implantation de pacemaker à environ 0,3 pour 1000 habitants par an. Actuellement, le BAV est la première cause de pose de stimulateur cardiaque dans le monde.

## I.1. Classification des troubles de la conduction cardiaque suivant leur étiologie

Les troubles de la conduction cardiaque ont de multiples origines et sont classés suivant celles-ci en 3 groupes :

- BAV acquis ou secondaires.
- Troubles de la conduction cardiaque idiopathique.
- Troubles de la conduction cardiaque héréditaires

### *I.1.1. BAV acquis ou secondaires*

Les blocs auriculo-ventriculaires peuvent être consécutifs à un infarctus du myocarde récent, à des interventions chirurgicales à coeur ouvert[206] ou à des endocardites infectieuses ou subaiguës d'origine bactérienne ou virale. Ces troubles de conduction peuvent être transitoire et régresser dans les 15 jours.

Les blocs auriculo-ventriculaire chroniques peuvent être consécutifs à des altérations cardiaques telles qu'une maladie valvulaire aortique (surtout une sténose aortique calcifiée), une cardiopathie ischémique, un infarctus du myocarde ancien, ou une cardiopathie associée à une myopathie. Dans environ la moitié des cas de BAV chronique, aucune cardiopathie organique définie ne peut être identifiée et ils sont considérés comme cliniquement primitifs.[207]

### *I.1.2. Troubles de la conduction cardiaque idiopathiques*

Le bloc auriculo-ventriculaire chronique n'est pas toujours un BAV acquis, il peut résulter d'une dégénérescence fibreuse primitive frappant les voies de conduction intracardiaque et particulièrement le faisceau de His (maladie de

Lenègre). Il débute très souvent par l'atteinte d'une des branches du faisceau de His et va évoluer progressivement vers un bloc complet. Les altérations des voies de conduction sont souvent de nature dégénérative, scléreuse, d'évolution progressive et d'origine inconnue[207 208 209].

Les troubles de la conduction cardiaque progressifs étaient considérés comme une pathologie du vieillissement car son évolution était progressive et s'étalait sur plusieurs années, avant l'apparition du bloc complet. Cependant, en 1976, Greenspahn et coll.[210], ont montré l'existence d'un facteur de prédisposition héréditaire. En effet, ils ont retrouvé chez les apparentés de patients atteints de troubles de la conduction cardiaque une incidence élevée de cette pathologie.

### *I.1.3. Troubles de la conduction cardiaque héréditaires*

Les troubles de la conduction cardiaque héréditaires peuvent être classés suivant l'âge d'apparition des troubles[215] :

- « BAV congénitaux » : BAV du nourrisson ou du jeune enfant.
- « BAV familiaux progressifs » : BAV de l'adulte. Il s'exprime dans la majorité des cas de manière retardée à l'âge adulte, mais sont susceptibles parfois de se révéler dès l'enfance.

#### I.1.3.1. Troubles de la conduction cardiaque congénitaux

Les BAV congénitaux du nourrisson ou du jeune enfant peuvent être isolés ou associé à différents types de pathologies :

- à des maladies autoimmunes de la mère telles que le lupus érythémateux disséminé ou le syndrome de Sjögren. Les anticorps maternels passe la barrière placentaire et vont détruire le système de conduction du foetus[211 212].
- A des cardiopathies congénitales telles que les communications interauriculaires ou interventriculaires[213 214 215] (le diagnostic de BAV complet est en général fait à la naissance bien qu'il puisse être découvert plus tardivement). Il s'agit de maladies liées à des anomalies du développement

cardiaque. Les observations anatomopathologiques ont montré une interruption du tissu conducteur entre les oreillettes et le faisceau de His[216].

#### I.1.3.2. Troubles de la conduction cardiaque héréditaires progressifs

Les BAV de l'adulte peuvent tout comme les BAV congénitaux être :

- associés à d'autres maladies cardiaques ou systémiques familiales. Ils ont été décrits comme associé aux syndromes de Kearns-Sayre[217], d'Emery-Dreifuss[218], à la dystrophie myotonique de Steinert[219], l'ataxie de Friedreich, les collagénoses systémiques, et l'hémochromatose.
- ou isolés

Les troubles de la conduction cardiaque isolés se développent à l'âge adulte et sont caractérisés par un ralentissement progressif de la conduction de l'influx, notamment au travers du faisceau de His et de ses branches[220 221].

L'âge d'apparition et la vitesse d'évolution de cette pathologie sont variables suivant les individus. Bien que ces troubles de la conduction apparaissent en général de façon retardée et très progressivement, un bloc complet peut aussi apparaître de façon précoce et brutale au sein d'une même famille[220 215 222]. Il semble exister des disparités entre les familles, certaines présenteraient des formes moins sévères que d'autres[250].

## I.2. Troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés

### *I.2.1. Caractéristiques physiopathologiques*

Les troubles de la conduction cardiaque de l'adulte, les plus fréquents sont les blocs de branche droits. Ils peuvent être isolés ou associés à d'autres blocs. Suivant la localisation de l'atteinte du tissu de conduction, on différencie 3 grands types de troubles de la conduction cardiaque progressifs :

- PFHB I (Progressive Familiale Heart Block I) est caractérisé par une atteinte sélective des branches du faisceau de His. En générale, il débute par un bloc de branche droit associé ou non à un hémibloc antérieur gauche, évoluant progressivement vers un bloc complet. A l'ECG, la durée du QRS est allongée alors que le PR et le QTc sont normaux[250 223].

- PFHB II est caractérisé par une atteinte sélective du tissu de conduction au niveau du tronc initial du faisceau de His. Les troubles de conduction sont de type blocs auriculo-ventriculaires de différents degrés (1er, 2e ou 3e), évoluant plus ou moins lentement vers un bloc complet. La durée de l'intervalle QRS est normale, alors que celle de l'intervalle PR est allongée. Une bradycardie sinusale est souvent présente. Les troubles de conduction cardiaque peuvent être intermittents ou même régressifs, passant d'un bloc de second degré à un bloc de 1er degré, voire à une conduction normale[220 222 224].

- Atteinte de l'ensemble du tissu de conduction. Tous les types de troubles de conduction peuvent être trouvés dans une même famille: des troubles de conduction auriculo-ventriculaire de différents degrés et des troubles de conduction intraventriculaire (bloc de branche droit, bloc de branche gauche, hémibloc antérieur ou postérieur gauche), ainsi que des troubles du rythme sinusal (bradycardies)[215 221]. Les durées des intervalles PR, QRS et de l'onde P sont allongées. Ces troubles de conduction cardiaque progressifs, encore appelés maladie de Lenègre ou maladie de Lev[207 208 209], sont caractérisés par une altération progressive de la conduction cardiaque à travers le système His-Purkinje avec un bloc de branche droit ou gauche et un élargissement des complexes QRS, évoluant vers un BAV complet et pouvant donner des syncopes et des morts subites. La maladie de Lenègre serait caractérisée par une dégénérescence fibrotique diffuse du système de conduction atteignant principalement les parties distales des deux branches, alors que la maladie de Lev serait caractérisée essentiellement par une fibrose du faisceau de His et des parties proximales des deux banches[223].

### *I.2.2. Etudes anatomopathologiques et histologiques*

Les différentes études anatomopathologiques ont été réalisées sur des coeurs dont les parois étaient macroscopiquement normales. Les atteintes mises en évidence, étaient différentes suivant le type de troubles de la conduction cardiaque étudié[207 221].

En effet, dans le cas des PFHB I, Kennel et coll. et Stephen et coll. ont retrouvé une dégénérescence fibreuse de l'ensemble du faisceau de His et aucune atteinte du noeud sinusal et du noeud auriculo-ventriculaire[221 223]. L'atteinte d'une ou des deux branches du faisceau de His se traduit par un élargissement des QRS.

Dans les cas décrits par Lenègre et coll.[224] il existait soit une destruction du noeud auriculo-ventriculaire soit une lame fibro-adipeuse isolant le noeud auriculo-ventriculaire des oreillettes. Le faisceau de His ne présente aucune fibrose. L'atteinte du noeud auriculo-ventriculaire se traduit par l'allongement de l'intervalle PR tandis que la durée du QRS reste normale.

Il existe une très bonne corrélation entre les aspects électriques et les lésions des voies de la conduction retrouvées à l'examen histologique[207]. Il faut cependant noter qu'il existe une fibrose physiologique apparaissant avec l'âge et qui est retrouvée aussi bien chez les individus sains que chez ceux de troubles de la conduction[225].

### *I.2.3. Hypothèses physiopathologiques*

Compte tenu des multiples facteurs participant à la propagation de l'activité électrique, de nombreuses hypothèses physiopathologiques peuvent être émises. L'atteinte de l'excitabilité, l'atteinte des différents éléments des fonctions intracellulaires, l'atteinte des facteurs régulant le couplage électrique entre les cellules et l'atteinte anatomique modifiant la structure cellulaire du tissus de conduction[226 227 228 229] pourraient être des causes du ralentissement de la conduction.

#### I.2.3.1. Anomalie des canaux ioniques et des connexines cardiaques

Les principales causes de ralentissement de la conduction cardiaque sont une diminution de l'excitabilité membranaire ou une diminution du couplage électrique intercellulaire. Des anomalies des canaux sodiques, calciques et des connexines cardiaques pourraient donc être à l'origine de ces troubles de la conduction.

Les mutations dans le gène SCN5A donnent des protéines inactives. Les porteurs des mutations ont 50% de canaux sodiques normaux, et ont une réduction du courant sodique. La combinaison des mutations dans le gène SCN5A et la dégénération physiologie du système de conduction sont à l'origine du phénotype tardif des troubles de la conduction cardiaque chez ces patients[230].

#### I.2.3.2. Anomalie de développement du système de conduction cardiaque

Une autre hypothèse concerne les mécanismes impliqués dans la transition phénotypique responsable du développement du système de conduction cardiaque.

Les cellules du système de conduction cardiaque dériveraient de précurseurs myogéniques du tube cardiaque[231]. La transition morphologique et fonctionnelle des lignées cellulaires myogéniques en lignées cellulaires du système de conduction est essentielle à l'établissement de phénotypes différents entre les cellules du nœud sinusal, du nœud auriculo-ventriculaire, du faisceau de His, du réseau de Purkinje et des ventricules. Chacune de ces cellules présente des groupes différents de gènes qui leur confèrent un phénotype électrophysiologique spécifique[232].

Dans les pathologies associées à des troubles de la conduction cardiaques, on retrouve souvent les anomalies de la conduction localisées dans des zones spécialisées du système de conduction. A l'origine de ces pathologie, des mutations dans des gènes de facteurs de transcription ont été identifiées, tel que NXK2.5. En effet, ce facteur de transcription est l'un des plus précoces du mésoderme cardiaque

et jouerait un rôle essentiel dans la différenciation cellulaire et le développement cardiaque. NKX2.5 intervient aussi dans la septation auriculaire, ventriculaire et conotroncale, dans la formation des valves auriculo-ventriculaire et dans la formation du système de conduction[233] [234]. NKX2.5 intervient aussi dans la cardiogénèse à différents stades, compte tenu de la variété et de la sévérité du phénotype observées chez ces patients. Au début de la cardiogénèse, il initierait la transition morphologique et fonctionnelle des lignées cellulaires myogéniques en lignées cellulaires du système de conduction. A la naissance, l'absence de NKX2.5 rend le nœud auriculo-ventriculaire incapable de s'adapter à la croissance et la maturation normale du cœur[235].

Les études des animaux transgéniques ont permis de mieux comprendre la mise en place du système de conduction. Grâce à elles, d'autres facteurs pouvant intervenir dans le ralentissement de la conduction cardiaque comme sp4, la calréticuline, Rho ou la calcineurine ont été mise en évidence.

HF-1b (ou sp4) est un facteur de transcription, une protéine en doigt de zinc apparentée à la famille des facteurs sp1, exprimé préférentiellement dans les cellules du système de conduction cardiaque et dans les cardiomyocytes ventriculaires. Grâce au modèle de souris transgénique, Nguyen-Tran et coll. [236] ont émis l'hypothèse que 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. 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.

La calréticuline cardiaque est une protéine localisée dans la lumière du réticulum sarcoplasmique et ayant des fonctions diverses[237]. Elle interviendrait aussi dans la régulation de la voie transcriptionnelle $Ca^{2+}$/calcineurine/NF-AT/GATA4 en modulant la libération du calcium du réticulum endoplasmique[238]. Les troubles de conduction observés chez des souris surexprimant la calréticuline pourraient être dus à la fois à la diminution d'expression des connexines des jonctions communicantes et des canaux calciques de type L[239]. Il semblerait que le promoteur la calréticuline possède des sites de liaison à NKX2.5 qui activerait le gène et COUP-TF1 (Chicken

Ovalbumin Upstream Promoter-transcription Factor 1) qui l'inactiverait[240] mais d'autres facteurs de transcription pourraient réguler ce gène.

Wei et coll. ont réalisé une souris surexprimant la protéine Rho GDIα qui est un inhibiteur spécifique de la dissociation du GDP, dans le but de déterminer l'activité Rho GTPase dans le développement cardiaque. Les protéines Rho contrôlent une multitude de processus biologiques incluant la prolifération et la différentiation cellulaire, l'apoptose, la régulation du cytosquelette d'actine et le mouvement cellulaire. Ces souris présentent dès la naissance des troubles de la conduction cardiaque avec une atteinte uniquement nodale et atriale. L'analyse des cardiomyocytes montre une diminution de l'expression de la connexine 40 observée au niveau des oreillettes et du tissu de conduction. Ces observations suggèrent que le transgène Rho GDIα induit des troubles de la conduction cardiaque en régulant l'expression ou l'activité de protéines cardiaque (Connexine 40) impliquées dans la propagation de l'influx électrique[241].

Molkentin et coll. [242] ont réalisé deux lignées de souris surexprimant soit la calcineurine soit le facteur NFAT3 dans le but de déterminer le rôle de cette protéine dans l'hypertrophie cardiaque. La calcineurine est une phosphatase activée par le calcium et la calmoduline et qui déphosphoryle NF-AT3 (Nuclear Factor of Activated cells). NF-AT3 déphosphorylé devient nucléaire et interagit avec les facteurs de transcription impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. Les souris surexprimant la calcineurine développent des troubles de la conduction cardiaque ainsi qu'une hypertrophie cardiaques et meurent toutes subitement au bout de 24 semaines. L'association de courant $I_{to}$ réduit, de la fibrose du système de conduction, de la surcharge calcique de ces cellules, et l'activation des échangeur Na+/Ca+ pourrait être à l'origine des morts subites[243]. Gillis et coll. ont remarqué que les troubles de la conduction cardiaque sont uniquement le résultat de la surexpression de calcineurine[244].

### I.2.3.3. Changements de l'architecture du tissu cardiaque

Un cytosquelette intact est nécessaire pour une structure correcte des myocytes et essentiel pour les voies de signalisation. Des mutations dans les gènes codant pour des protéines du cytosquelette et des protéines de membrane ont été identifiées dans des cardiomyopathies héréditaires et des dystrophies musculaires.

Des mutations sur le gène de la lamineA/C ont été mises en évidence chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée associée à des troubles de la conduction cardiaque[245]. Les lamines sont des polypeptides constitutifs de la lamina nucléaire, un réseau filamenteux 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 dont l'émerine et avec les composants nucléaires. 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[245].

Des mutations sur la desmine, gène codant pour une protéine des filaments intermédiaire, ont été identifiées dans une myopathie squelettique associée à une cardiopathie et à des troubles de la conduction[246]. La desmine est une protéine du cytosquelette qui participe aux filaments intermédiaires responsables du maintient de la structure et de la fonction des myofibrilles du muscle squelettique et du muscle cardiaque. Elle attache les bandes Z des myofibrilles à la membrane plasmique et à la membrane nucléaire. Des modifications post-traductionnelles de la desmine joueraient un rôle dans la régulation de l'organisation et de la structure des filaments intermédiaires pendant le cycle cellulaire. Les protéines mutées perturberaient l'assemblage normal des filaments intermédiaires et désorganiseraient les myofibrilles ce qui s'accompagnerait d'une dégénérescence progressive du

myocarde avec des zones de fibrose interstitielle et de nécrose et des calcifications secondaires, atteignant en particulier le ventricule gauche[246].

Il a été démontré qu'une désorganisation structurale du cytosquelette des myocytes ventriculaires pouvait altérer les densités et les cinétiques des canaux sodiques, calciques et K(ATP) et donc modifier l'excitabilité des myocytes[247 248]. 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[66]. La γ-syntrophine s'associe au canal sodique cardiaque et est capable de réguler son expression à la membrane et sa fermeture[249]. La désorganisation du cytosquelette d'actine des cardiomyocytes, in vitro par la cytochalasine D, serait à l'origine d'un courant de fenêtre $I_{Na}$ tardif pour des valeurs de potentiels hyperpolarisants, susceptible de prolonger la phase de repolarisation du potentiel d'action et d'entraîner des anomalies de l'excitabilité cardiaque[247].

De façon générale, la désorganisation du cytosquelette peut induire des anomalies de la conduction cardiaque d'origine structurale ou fonctionnelle.

## *II. Données génétiques des troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés*

L'identification de familles atteintes de troubles de la conduction héréditaires progressifs isolés a montré le caractère familiale de cette pathologie et à suggérer une probable transmission autosomique dominante[215 210]. Depuis ces travaux, plusieurs équipes ont identifié d'autres grandes familles atteintes de troubles de la conduction héréditaires et ont confirmé le mode de transmission autosomique dominant. Elles ont aussi montré que la pénétrance de la pathologie était d'environ 50% chez les femmes et de 75% chez les hommes[250].

## II.1. Canal sodique cardiaque SCN5A

En 1999, notre équipe a décrit 2 familles atteintes de la maladie de Lenègre[251]. Une de ces 2 familles présentait différents aspects de troubles de la conduction (4 patients avaient reçu un stimulateur cardiaque en raison de syncope ou de BAV complet, 10 patients présentaient un bloc de branche droit isolé ou associé à un hémibloc antérieur gauche ou postérieur gauche, 2 patients un bloc de branche gauche, 1 patient un hémibloc antérieur gauche isolé, 8 avaient un intervalle PR allongé (>210 ms) et la durée des QRS moyennés était de 135±7 ms). Le caractère progressif des troubles de la conduction avait bien été démontré par un suivi longitudinal de plusieurs patients atteints (l'onde P, l'espace PR et la durée du QRS augmentent avec l'âge).
Le propositus de la seconde famille présentait à la naissance des troubles de la conduction cardiaque du premier degré associé à un bloc de branche droit. Ses 3 frères étaient asymptomatiques, mais l'un d'entre eux avait un bloc de branche droit. La mère du propositus présentait des troubles de la conduction non spécifique.
Par une approche gène-candidat, deux mutations IVS22+2 T→C et del5280G ont été mise en évidence. Le canal sodique SCN5A est responsable de la phase initiale du potentiel d'action, et sa fonction est essentielle à la propagation rapide de la dépolarisation myocardique.

Les études électrophysiologiques des mutations de SCN5A montrent qu'elles sont à l'origine des troubles de la conduction cardiaque et provoque toute une perte de fonction du canal sodique, par différents mécanismes :

- Soit par un défaut d'adressage de la protéine. C'est le cas de la mutation IVS22+2 T→C qui provoque un épissage anormal de l'exon 22 de SCN5A. Les études de réexpression montrent que la protéine mutée n'était adressée à la membrane. Ces résultats suggèrent que chez les patients atteints, la réduction de 50% du courant sodique doit diminuer la vitesse de propagation de l'influx électrique et prolonger ainsi les paramètres de conduction. L'haploinsuffisance de SCN5A en combinaison avec le vieillissement exagère le ralentissement de la conduction ce qui conduit à la maladie de Lenègre.

- Soit par altération de l'activation du canal[252]. L'étude de la mutation G514C exprimée dans des cellules tsA201, a montré que le canal était adressé correctement à la membrane mais présentait un déplacement de la courbe d'activation à l'équilibre vers les potentiels positifs. Ceci provoque une diminution du courant $I_{Na}$ et donc un ralentissement de la conduction cardiaque par une diminution de l'excitabilité.

- Soit par l'altération de l'inactivation du canal[253]. Les mutations D1595N et G298S induisent une altération de l'inactivation rapide et une augmentation de l'inactivation lente du canal associées à une diminution de l'amplitude du courant.

- Soit par l'altération de l'inactivation et l'activation du canal[254]. La caractérisation de la mutation R225W a montré qu'il y avait un déplacement de la courbe d'inactivation et d'activation à l'équilibre vers les potentiels positifs. Ceci provoque une diminution du courant $I_{Na}$ et donc un ralentissement de la conduction cardiaque par une diminution de l'excitabilité.

## II.2. Hétérogénéité génétique

Brink et coll.[255] ont décrit, en 1977 une famille originaire d'Afrique du Sud descendant d'un ancêtre Portugais qui aurait émigré en Afrique du Sud vers 1696. En 1978, Stephan[256] a décrit une très grande famille originaire du Sud du Liban, descendant d'un ancêtre commun polygame qui était probablement atteint. La même année, en 1995 de Meus et coll.[257] et Brink et coll.[258] ont mis en évidence sur le chromosome 19q13.2-q13.3, un premier locus des troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés à partir de ces 2 très grandes familles. A ce jour, aucun gène responsable de ces troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés n'a encore identifié. Ces 2 familles ont un phénotype similaire, les troubles de conduction cardiaque sont de type blocs de branche droits parfois associés à hémibloc antérieur gauche pouvant évoluer vers un bloc complet. Les complexes QRS sont larges,

l'intervalle PR est normal et il n'y pas de bradycardie sinusale ce qui indique une atteinte préférentielle des branches du faisceau de His. On peut appeler ces troubles de la conduction cardiaques, des PFHB I.

Lynch et coll.[259] ont étudié une famille de 1067 membres. Parmi 255 sujets étudiés, 40 individus présentaient des troubles de conduction et 87 sujets présentaient des arythmies au repos. Les troubles de conduction étaient des BAV de différents degrés, évoluant progressivement vers un bloc complet. Les intervalles QRS et QTc étaient normaux. Une bradycardie sinusale était souvent présente. Ceci indique que l'atteinte du tissu de conduction siège au dessus de la bifurcation du tronc commun du faisceau de His. Ce trouble de conduction est encore appelé PFHB de type II.

## *III. Etude Phénotypique et génétique de familles atteintes de troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés*

Nous avons étudié 3 familles atteintes de troubles de la conduction progressifs isolés :

- Deux ont été recrutées de manière habituelle : les propositus ont été vu en consultation par l'un des cardiologues de la clinique cardiologique du CHU de Nantes.
- Le recrutement de la dernière famille est inhabituel : à partir d'un registre informatique regroupant pour tous les patients hospitalisés dans des hôpitaux de Nantes, de Saint-Nazaire et la clinique Saint Henri depuis 1992, le ou les diagnostics ainsi que les actes thérapeutiques réalisés, nous avons établi une carte indiquant la répartition géographique des patients implantés d'un pacemaker. Nous avons ainsi mis en évidence une zone de forte incidence de patients implantés d'un pacemaker. Pour chacun des patients originaires de cette zone, une enquête familiale et généalogique a été réalisée. La famille Br. est le résultat de cette méthode de recrutement.

## III.1. Famille Ro.

### *III.1.1. Etude phénotypique*

A l'occasion de syncopes, on a découvert chez le propositus, une patiente âgée 78 ans (III-15), un bloc auriculo-ventriculaire complet. Lors de cet électrocardiogramme, elle avait un rythme d'échappement à 35 battements par minute avec un aspect de bloc de branche droit (Figure 58). Nous n'avons pas retrouvé d'ECG enregistré avant la survenue du BAV complet. Elle a bénéficié de l'implantation d'un pacemaker.

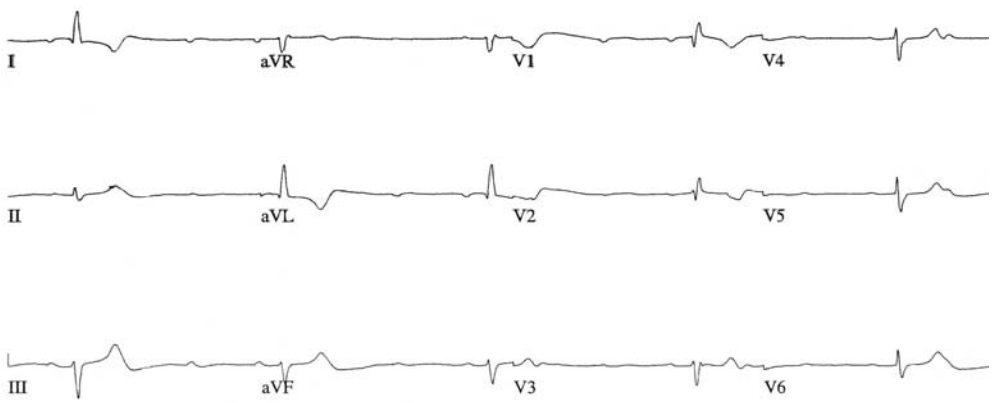



Figure *58* *: ECG du propositus de la famille Ro. Cette personne est en BAV complet avec un rythme d'échappement à 35 battements par minutes.*

L'enquête familiale a identifié 3 autres personnes atteintes dont l'un de ses enfants, un homme de 47 ans (IV-2), qui présente sur l'ECG un bloc de branche complet avec des QRS mesurés à 150 ms et un PR à 178 ms, un frère âgé de 62 ans (III-13), avec un bloc nodal, un PR à 220 ms et des QRS à 1O2ms, et un oncle (II-5) âgé de 80 ans.(II-5) qui présentait à l'ECG un bloc nodal, un PR à la limite supérieure de la normale. Compte tenu de la survenue de syncopes brutales faisant évoquer un bloc complet paroxystique, ce patient a bénéficié de l'implantation d'un pacemaker, il n'a plus présenté de syncope après cette implantation.

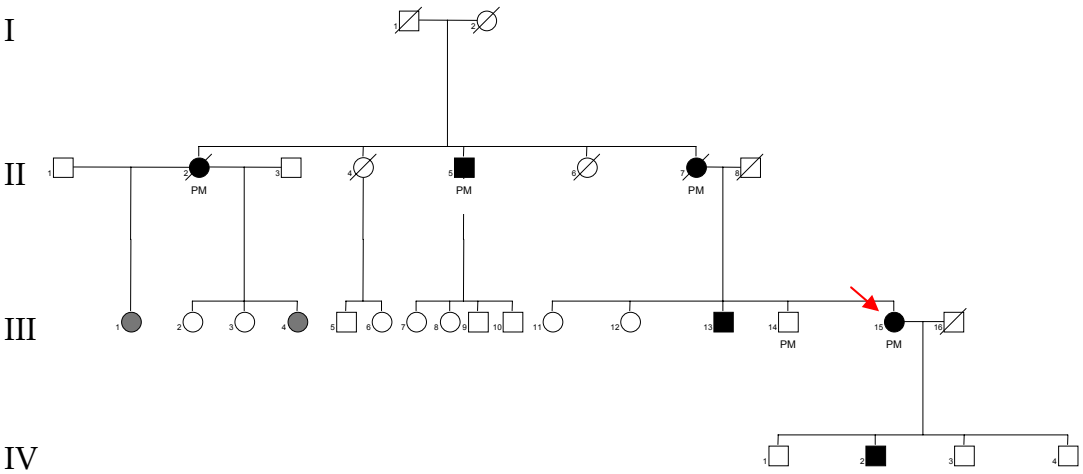



*Figure 59* : *arbre généalogique de la famille Ro*
*Les symboles noirs représentent les individus présentant des troubles de la conduction cardiaque progressifs. PM=pacemaker*

Vingt deux personnes ont été examinées, 4 sont phénotypiquement atteintes, 2 sont douteuses et 16 sont saines (Figure 59).

### *III.1.2. Etude génétique*

A partir des membres de la famille Ro. (Figure 59), pour lesquels la maladie de Lenègre ségrégeait selon un mode autosomique dominant, nous avons réalisé une analyse de liaison. Nous avons testé les différents locus des troubles de la conduction cardiaque isolés et les locus des connexines cardiaques. En effet, nous avons exclu le locus 19q13.2-q13.3[258] [257] et le gène SCN5A[251] en 3p21, déjà décrit comme responsable de troubles de la conduction cardiaque progressifs. Les locus des connexines cardiaques 45 (11q21), 43 (6q21-23) et 40 (1q21.1) [260] qui sont importantes dans la conduction cardiaque ont eux aussi été exclus. Nous avons ensuite testé l'informativité statistique de cette famille en calculant le lod score théorique (3,37 à 0% de recombinaison et 100% de pénétrance de la pathologie), et nous avons réalisé une analyse de liaison sur génome entier. Cette analyse de liaison ne nous a pas permis à ce jour de mettre en évidence un nouveau locus de troubles de la conduction dégénératifs. Mais un certain nombre de région sont encore non informatives. Compte tenu de la faible informativité des marqueurs génétiques de ces zones dans cette famille, nous pouvons espérer qu'en testant des

marqueurs plus polymorphes situés dans les mêmes régions chromosomiques, nous pourront les rendre informatifs.

## III.2. Famille Ch.

### *III.2.1. Etude phénotypique*

Lors d'une consultation chez son cardiologue en 1998, le propositus (III-9), une femme de 61 ans, a été diagnostiquée comme atteinte de bloc auriculo-ventriculaire de 1$^{er}$ degré associé à un bloc de branche droit (Figure 60).

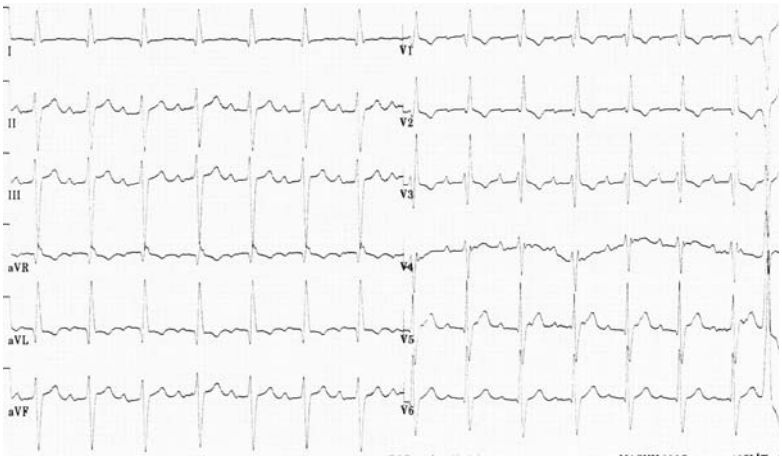



*Figure 60 : ECG du propositus de la famille Ch. Réalisé en 1998.*

En 2001, il a été décidé de lui implanter un pacemaker car elle était en bloc auriculo-ventriculaire complet (Figure 61).

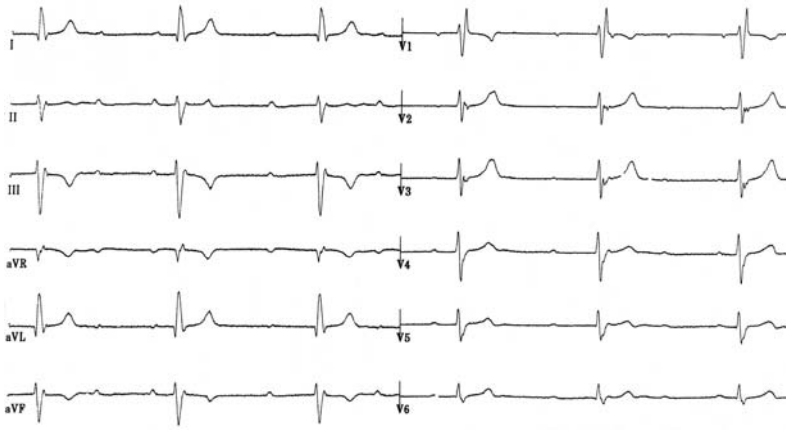



*Figure 61 : ECG du propositus de la famille Ch. réalisé en 2001.*

L'enquête familiale a permis d'identifier 11 autres sujets atteints :

- La mère du propositus (II-4) qui présentait à l'examen électrocardiographique, un bloc de branche droit et un hémibloc antérieur gauche avec un PR à 240ms. Un pacemaker lui avait été implanté.
- Un frère (III-10), âgé de 69 ans avec un bloc de branche droit et un hémibloc antérieur gauche. Un pacemaker lui avait été implanté.
- Un autre frère, âgé de 57 ans (III-11) avec un bloc de branche droit. Un pacemaker lui avait été implanté.
- Un neveu avec un bloc de branche droit, et des QRS mesurés à 125 ms.
- Une soeur (III-7), âgée de 67 ans avec un bloc de branche droit et un hémibloc antérieur gauche.
- Une tante (II-1) de 89 ans avec un bloc de branche droit et un hémibloc antérieur gauche et un PR à 200ms. Un pacemaker lui avait été implanté.
- Le fils de son cousin (IV-1) âgé de 43 ans avec un bloc de branche droit.
- Une femme de 88 ans (II-7) avec un bloc de branche gauche et un PR à 220ms.
- Une autre femme, âgée de 87 ans avec un bloc nodal, un bloc incomplet droit avec un PR à 230ms et des QRS mesurés à 84 ms. Un pacemaker lui avait été implanté.
- Un homme de 75 ans avec un bloc de branche droit et un hémibloc antérieur gauche avec un PR à 160 ms.

Un neveu au propositus (IV-2), un homme de 47 ans a été considéré comme phénotypiquement douteux car il présentait à l'examen électrocardiographique, un bloc incomplet droit un PR à 170 ms, un QRS à 110 ms avec un axe mesuré à 42°.

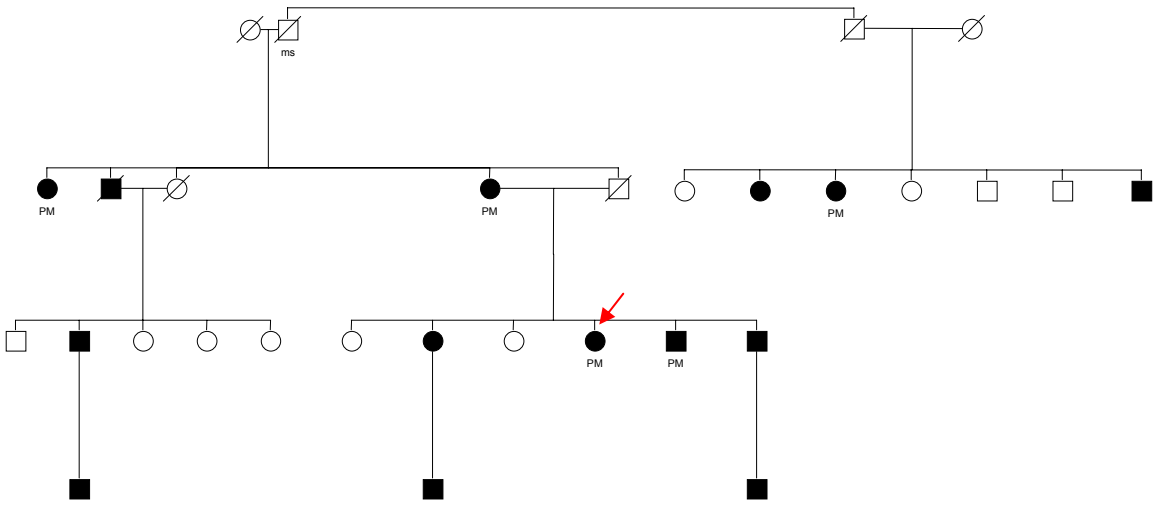



*Figure 62 : arbre de la famille Ch.*
*PM=pacemaker. Il est à noter dans cette famille que les individus II-3 et II-5 sont frère et soeur.*

Nous avons pu examiner dans cette famille, 16 personnes dont 12 sont phénotypiquement atteintes, 1 phénotypiquement douteuse et 10 sont saines (Figure 62).

### *III.2.2. Etude génétique*

Comme pour toutes les familles de troubles de la conduction cardiaque, nous testons par une approche gène-candidat les différents locus des troubles de la conduction cardiaque isolés (19q13.2-q13.3[258] [257] et le gène SCN5A[251]) et les locus des connexines cardiaques (connexines 45 (11q21), 43 (6q21-23) et 40 (1q21.1)[260]). Tous ces locus ont été exclus. Nous avons ensuite testé l'informativité statistique de cette famille en calculant le lod score théorique (4,61 à 0% de recombinaison et 100% de pénétrance de la pathologie), et nous avons réalisé une analyse de liaison. Cette analyse de liaison ne nous a pas permis de mettre en évidence un nouveau locus de trouble de la conduction dégénératif.

Dans un deuxième temps, les cliniciens ont réanalysé les phénotypes des patients de cette famille. Comme les individus de l'une des branches de la famille ont un phénotype moins homogène que le reste de la famille, nous les avons supprimé de l'analyse (Figure 63).

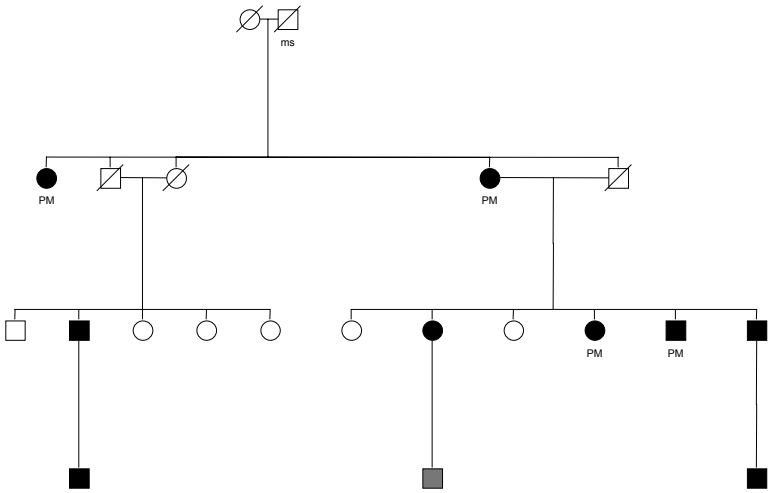



*Figure 63 : pedigree utilisé pour la 2ème analyse génétique de la famille Ch.*

Nous avons à nouveau testé l'informativité statistique de cette famille en calculant le lod score théorique (2,83 à 0% de recombinaison et 100% de pénétrance de la pathologie), et nous avons réanalysé les résultats de la précédente analyse de liaison. Cette analyse de liaison ne nous a pas permis à ce jour de mettre en évidence un nouveau locus de trouble de la conduction dégénératif. Mais certaines régions du génome sont encore non informatives. Compte tenu de la faible informativité des marqueurs génétiques de ces zones dans cette famille, nous pouvons espérer qu'en testant des marqueurs plus polymorphes situés dans les mêmes régions chromosomiques, nous pourront les rendre informatifs.

## III.3. Répartition géographique des patients implantés d'un stimulateur cardiaque pour bloc auriculo-ventriculaire.

La carte établie à partir des fichiers PMSI a montré une répartition géographique non aléatoire des implantations de stimulateurs cardiaques dans la

région nantaise. A titre de référence, le nombre d'implantation de pacemaker pour 1000 habitants était de 1,54 pour Nantes (299 implantations pour 195185 habitants) et de 1,53 pour Saint-Nazaire (59 implantations pour 38350 habitants). Le taux d'implantation le plus élevé est retrouvé pour la région R. (23 pour 2867 habitants soit 8,02 pour 1000 habitants). Cette région R. est une zone rurale de 5 km de rayon constituée de 4 communes (Figure 64).

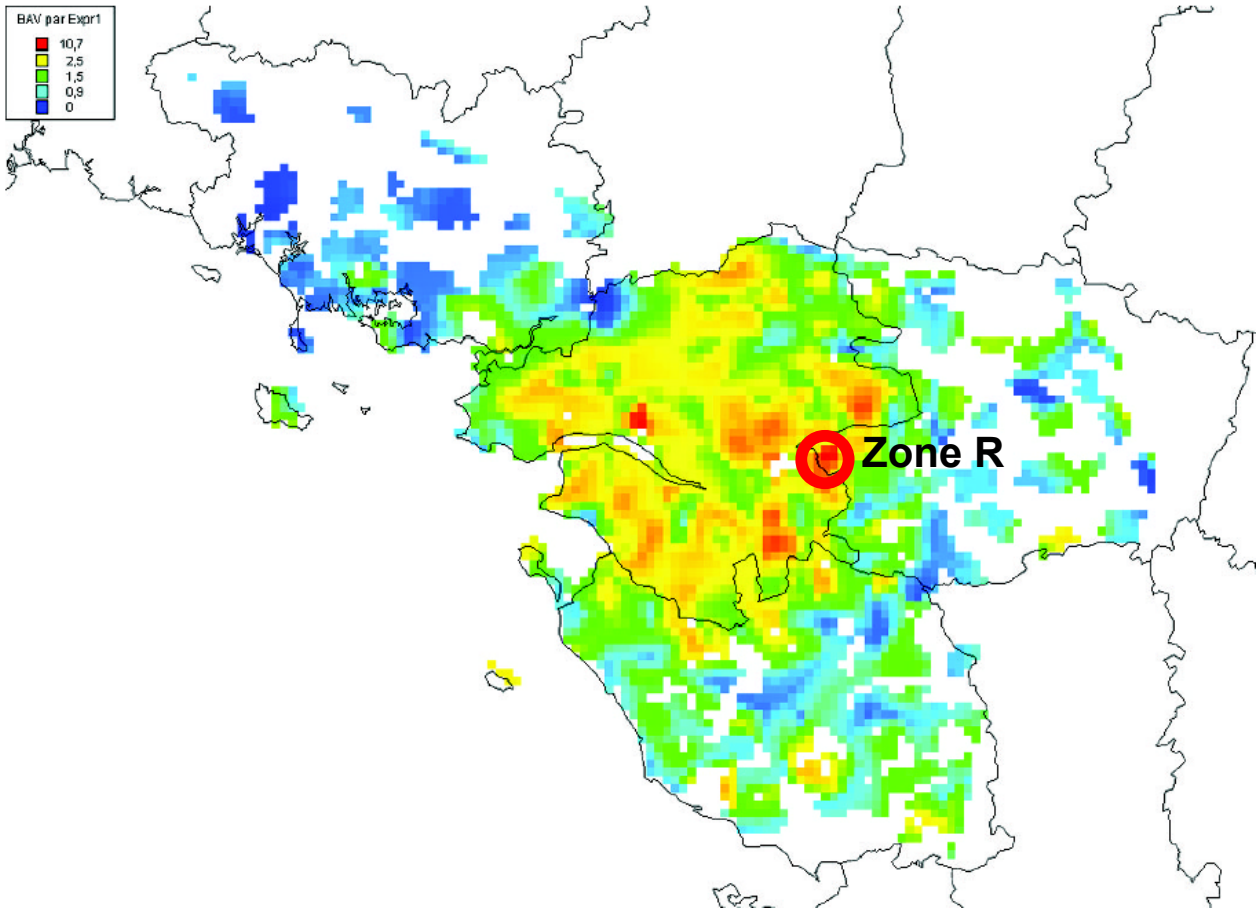



*Figure 64 : Répartition géographique de la fréquence des implantations de pacemaker pour BAV dégénératif dans la région Nantaise. Localisation géographique de la région R.*

Les dossiers médicaux des 23 patients implantés natifs de la région R. ont été étudiés. Seuls 9 avaient un bloc de conduction infra-hissien sans cardiopathie associée. 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. Grâce à l'étude généalogique de ces propositus, des liens de parentés ont

été retrouvés entre 4 propositus tandis qu'aucun lien de parenté n'a été retrouvé entre les 13 autres propositus à 5 générations.

## III.4. Famille Br.

### *III.4.1. Etude phénotypique.*

Parmi les familles de la région R., la famille Br. (Figure 65) remplissait les critères d'informativité génétique et a été retenue pour tester par analyse de liaison les locus déjà identifiés dans les troubles de la conduction cardiaque progressifs.

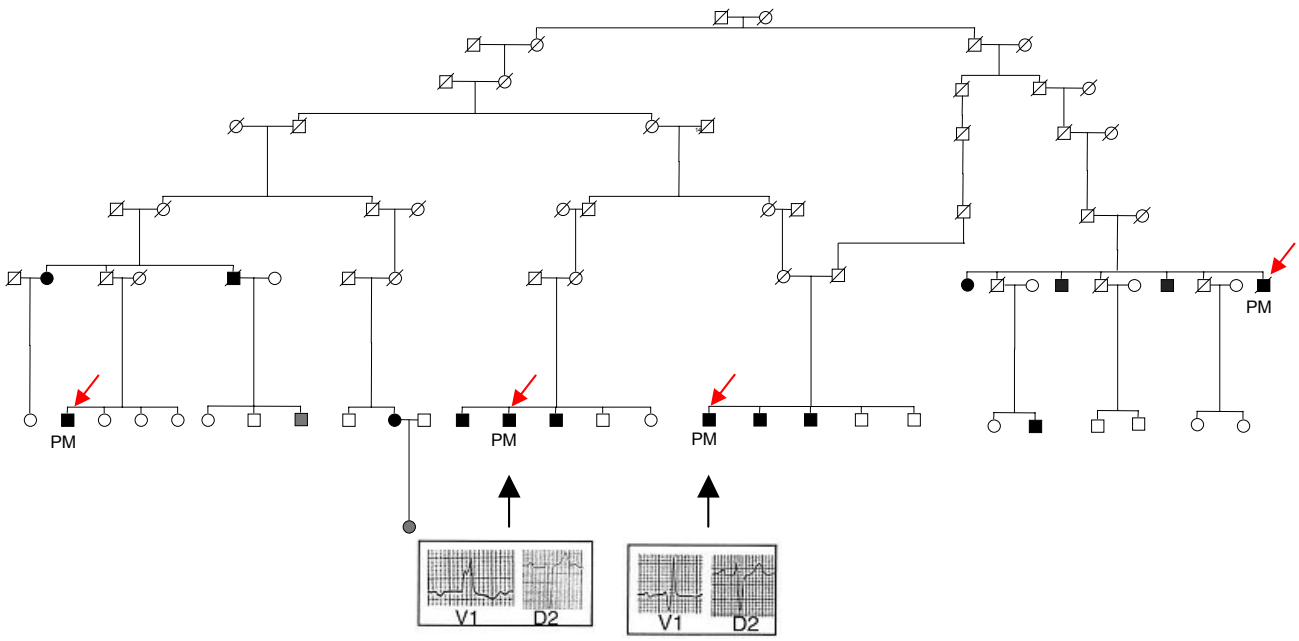



*Figure 65 : arbre généalogique de la famille Br.*
*PM : pacemaker.*

La famille Br. est constituée de 4 noyaux familiaux dont le lien généalogique a été retrouvé vers 1770 par l'identification d'un couple d'ascendants communs. Elle comporte 37 membres, dont 12 individus phénotypiquement atteints, 2 individus phénotypiquement douteux et 23 individus sains. Trois membres de la famille ont bénéficié de l'implantation d'un stimulateur cardiaque en raison de syncopes ou de

bradycardie sévère. Parmi les individus atteints, les troubles de la conduction observés étaient :

- Bloc de branche droit complet associé à un hémibloc antérieur gauche (2 patients)
- Bloc de branche droit incomplet associé à un hémibloc antérieur gauche (1 patient)
- Hémibloc antérieur gauche (7 patients)
- Bloc auriculo-ventriculaire du premier degré associé à un bloc de branche gauche complet (1 patient)
- Un bloc auriculo-ventriculaire complet avec des complexes d'échappement ventriculaires larges (1 patient)

La patiente phénotypiquement douteuse était âgée de 42 ans et avait un bloc de branche droit incomplet. Un membre de la famille décédé était atteint de maladie de Lenègre et était porteur d'un stimulateur cardiaque.

### *III.4.2. Etude génétique.*

Comme pour toutes les familles de troubles de la conduction cardiaque, nous avons testé les différents locus des troubles de la conduction cardiaque isolés (19q13.2-q13.3[258] [257] et le gène SCN5A[251]). Tous ces locus ont été exclus. Nous avons ensuite testé l'informativité statistique de cette famille en calculant le lod score théorique (5.62 à 0% de recombinaison et 90% de pénétrance de la pathologie et 5.21 à 0% de recombinaison et 90% de pénétrance de la pathologie), et nous avons réalisé une analyse de liaison. Cette analyse de liaison ne nous a pas permis à ce jour de mettre en évidence un nouveau locus des troubles de la conduction dégénératifs. Mais un certain nombre de région sont encore non informatives. Compte tenu de la faible informativité des marqueurs génétiques de ces zones dans cette famille, nous pouvons espérer qu'en testant des marqueurs plus polymorphes situés dans les mêmes régions chromosomiques, nous pourront les rendre informatifs.

## *IV. Discussion*

Les troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés sont fréquents et potentiellement graves. La physiopathologie de cette maladie est mal connue. Il existe une certaine hétérogénéité génétique de cette maladie. Des mutations dans le gène SCN5A[251] et un locus en 19q13.2-q13.3[258 257] peuvent être responsables de cette pathologie.

Les familles que nous avons étudié, au cours de ce travail de thèse sur les troubles de la conduction cardiaque progressifs isolés ne sont ni liées au locus du chromosome 19, ni au gène SCN5A ce qui nous laisse présager une hétérogénéité génétique plus importante.

- **Caractéristiques des troubles de la conduction cardiaque progressifs.**

Les troubles de la conduction cardiaque progressifs sont une maladie relativement fréquente dans la population générale. En effet, dans leur forme la plus sévère, ils sont responsables de bloc auriculo-ventriculaire complet nécessitant l'implantation d'un pacemaker dans le but d'éviter les syncopes et la mort subite. Aucune donnée épidémiologie 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.

Les troubles de la conduction cardiaque progressifs sont une maladie du sujet âgé. En effet, sa prévalence augmente avec l'âge et passe de 1% à 50 ans à 17% après 80 ans[261] mais aussi sa sévérité[230]. Dans la première famille atteinte de trouble de la conduction cardiaque identifiée par notre équipe, il y a avec l'âge, une majoration des troubles de la conduction, l'intervalle PR et la durée du QRS s'allongent. Les droites qui représentent l'évolution des paramètres en fonction de l'âge des patients, montrent une évolution parallèle de la durée de l'onde P et de l'intervalle PR entre les patients atteints et les sains (Figure 66). Mais ce caractère progressif n'est pas spécifique de ce gène puisque nous l'avons retrouvé dans la majorité des formes familiales.

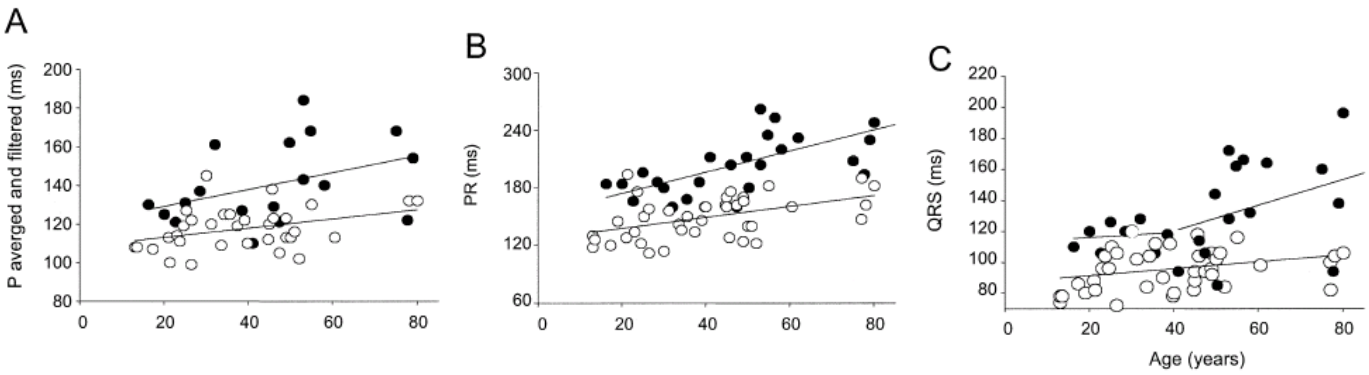



*Figure 66: évolution des paramètres de conduction avec l'âge.*
*●sujet atteint ○sujet sain.*
*A : variation de la durée de l'onde P avec l'âge. B : variation de la durée de l'intervalle PR. C : variation de la durée du QRS.*
*(D'après Probst et coll.[230])*

Les troubles de la conduction cardiaque progressifs sont une maladie dont les origines peuvent être multiples, ils peuvent être consécutifs à un traitement ou à un infarctus ou à une autre maladie, congénitaux ou encore génétiques. Un nombre mal défini des cas de troubles de conduction est d'origine héréditaire.

- **Problèmes posés par la génétique des pathologies à expression tardive**

Les caractéristiques de cette maladie en rendent difficiles mais intéressantes l'étude génétique. En effet, étudier une pathologie à expression tardive et relativement fréquente à origine multiples, posent des problèmes pour les approches de génétiques inverses classiques.

Le problème des phénocopies et des non pénétrants se pose quelque soit la pathologie. De ce que nous savons des troubles de la conduction cardiaque, les non pénétrants doivent exister dans cette pathologie. La pénétrance des troubles de la conduction est variable, puisque elle est quasi, complète dans le cas de mutation dans le gène SCN5A[251 230], et incomplète (75% des hommes et 50% des femmes) dans le cas du locus du chromosome 19[250]. Aucune phénocopie n'a été identifié dans la familles lié à SCN5A, ni dans celles liées au locus du 19. Cependant il est probable qu'elle existe puisque cette pathologie peut avoir des origines multiples. Ces dernières sont difficiles à identifier car il n'existe pas de critères cliniques permettant de distinguer les formes sporadiques des formes génétiques de la

maladie de Lenègre. Il est cependant possible d'identifier les troubles de la conduction secondaires à une cardiopathie.

L'apparition tardive du phénotype est une autre difficulté car parmi les individus ayant un phénotype sain, seuls les patients âgés peuvent être pris en compte. Enfin, les familles que nous recrutons ne sont souvent composées que de 1 à 2 générations de patients en vie, ce qui ne facilite pas l'étude génétique de cette pathologie.

La variabilité de l'expression de la maladie est un autre problème. La famille qui a permis de mettre en évidence l'implication du gène SCN5A dans les troubles de la conduction cardiaque, présentait un phénotype homogène. Cependant les familles que nous avons recrutées par la suite, ne nous ont pas permis de mettre en évidence de nouveau locus des troubles de la conduction cardiaque. Faut-il alors privilégier uniquement l'étude des familles avec une atteinte homogène, en considérant les individus ayant un phénotype différent comme des phénocopies, ou pas ? La mise en évidence de nouveaux gènes impliqués dans les troubles de la conduction cardiaque ainsi que les études phénotype-génotype qui s'en suivront pourront sûrement répondre à nos interrogations.

- **Solutions à ces problèmes**

L'étude de ces différentes familles atteintes de troubles de la conduction cardiaque progressifs, nous a permis de remarquer que pour les patients jeunes, nous avions des difficultés à définir leur phénotype, car bien que les valeurs de l'électrocardiogramme soient dans les limites de la normale, celles-ci sont tout de même plus longues que chez des patients « normaux ». A terme, grâce à notre cohorte de patients, nous pourrons redéfinir les valeurs normales des différents paramètres électrocardiographiques en fonction de l'âge. Nous pourrons alors diagnostiquer les troubles de la conduction beaucoup plus précocement et ainsi il deviendra possible d'assurer un meilleur suivi des patients.

Pour nous faciliter l'étude génétique de ces familles, il faut que ces dernières soient de grandes tailles. Pour ce faire, une enquête familiale suivie d'une enquête généalogique peut être réalisée. Deux méthodes de recrutement sont possibles. La méthode que nous utilisons habituellement et qui consiste à identifier lors des consultations de cardiologie des noyaux familiaux de troubles de la conduction

cardiaque et d'effectuer une enquête familiale pour agrandir la famille (famille Ro. et famille Ch.).

L'épidémiologie génétique peut être une 2ème méthode pour faciliter le recrutement de grandes familles. Cette approche est facilitée par la création du registre informatique regroupant l'activité médicale des hôpitaux de Nantes, de Saint-Nazaire et la clinique Saint Henri. Avant ces 50 dernières années, la population qui composait la région, se déplaçait peu et était traditionnellement constituée de grandes familles. Cette approche est basée sur l'hypothèse que si une pathologie est de nature génétique, il devrait être possible d'identifier des foyers de fortes prévalences de la maladie dans certaines communes de la région. La carte géographique des implantations de stimulateurs cardiaques dans la région nantaise a montré une répartition non aléatoire (Figure 64). Les principales villes ont un taux faible d'implantation, probablement dû au fait que dans ces villes, les migrations de populations sont plus importantes. La zone de plus haute concentration d'implantation de pacemaker se situe à l'est de Nantes. A partir des foyers de haute incidence de la pathologie, nous avons pu recruter la grande famille Br. Les informations apportées par ce registre doivent être interprétées avec prudence, car il n'inclue que les formes sévères et ne permet donc pas de connaître la répartition géographique réelle des patients atteints de la maladie de Lenègre. D'autres part, l'étude de la répartition géographique des troubles de la conduction cardiaque ne permet pas d'avoir la certitude d'identifier des formes familiales monogéniques. En effet, une fréquence élevée de la maladie dans une région n'est pas forcément la conséquence d'une fréquence élevée d'une mutation génétique donnée, mais peut être le fait de facteurs multigéniques ou environnementaux qui sont difficiles à apprécier.

# TROISIEME PARTIE : RECHERCHE DE PARTENAIRE PROTEIQUE DE SCN5A

# *I. Introduction*

Les nombreuses pathologies liées à des mutations sur le gène *SCN5A* suggèrent qu'il existe une régulation de la fonction du canal, nécessaire à la fonction cardiaque normale. Il a été montré que SCN5A peut s'associer à des protéines cytoplasmiques[262]. Ces protéines sont probablement impliquées dans la régulation de l'activité du canal mais détermine aussi sa localisation subcellulaire, et régule sa biosynthèse et/ou sa dégradation. Des défauts dans ces protéines partenaires pourraient altérer la fonction du canal sodique cardiaque et être à l'origine de pathologies liées à SCN5A. L'identification de ces protéines constitue donc une étape fondamentale pour la compréhension de la régulation de SCN5A et identification de nouveaux gènes candidats dans ces pathologies. Cette partie de mon travail de thèse rapporte l'identification, la localisation subcellulaire et un effet biologique d'un nouveau partenaire de SCN5A.

## *I.1. Structure du canal sodique cardiaque*

Les canaux sodiques voltages-dépendants cardiaques sont responsables de la phase rapide du potentiel d'action myocardique. Ils jouent un rôle crucial dans l'initiation, la propagation et le maintien du rythme cardiaque normal[263]. Dans le coeur, SCN5A est la forme majoritaire mais d'autres isoformes des canaux sodiques voltages-dépendants sont exprimées chez la souris et probablement chez l'Homme.

Le canal sodique cardiaque est un membre de la famille des canaux sodiques voltage-dépendants. Ce canal est composé d'une sous-unité α qui forme le pore et d'une ou deux sous-unité accessoires β.

La sous-unité α du principal canal sodique cardiaque humain est codée par le gène *SCN5A*. Ce dernier a été cloné en 1992 par Gellens et coll.[264]. Elle est fortement glycosylée et constituée de 2016 acides aminés. La protéine SCN5A (Figure 67) est composée de 4 domaines homologues (DI, DII, DIII et DIV), chacun constitué de 6 segments transmembranaires[265]. Le 4$^{ème}$ segment transmembranaire

de chaque domaine est chargé et est impliqué dans l'activation du canal. Les 2 derniers segments ainsi que la boucle P de chaque domaine constituent le pore du canal[266]. A ce jour, aucune structure moléculaire n'a été observée en cristallographie.

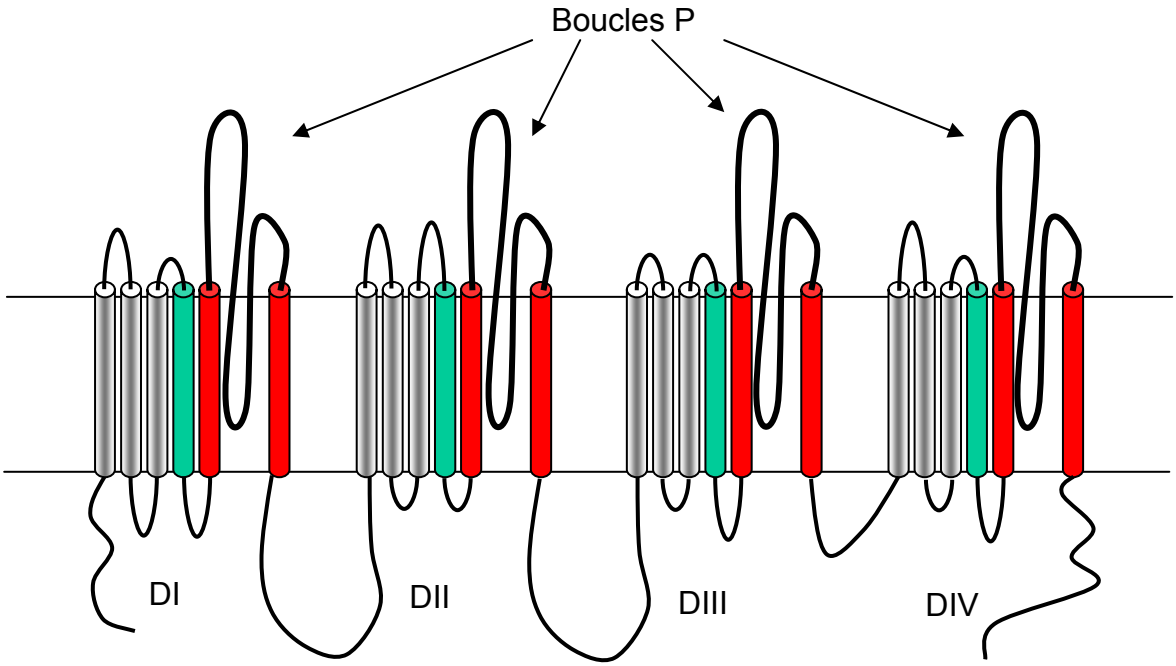



*Figure 67 : structure de la sous-unité α du canal sodique cardiaque. En vert : le segment S4 ; en rouge : les segments S5 et S6 ; en gras : les boucles P*

Les sous-unités β sont des glycoprotéines transmembranaires. Elles sont constituées d'une partie N-terminale extracellulaire de grande taille contenant un domaine immunoglobuline (Ig), d'un segment transmembranaire et une partie C-terminale intracellulaire[267]. Dans le coeur, 4 isoformes β ont été décrites[268 269]. Un certain nombre d'études dans des systèmes de réexpression montrent que la co-expression de la sous-unité β et de SCN5A provoque une accélération de la sortie de l'état inactivé du canal, et une augmentation de la densité de courant[270]. Les sous-unités β semblent aussi être impliquées dans l'assemblage, l'adressage et la modulation post transcriptionnelle de la sous-unité α[266].

### *I.2. Adressage du canal sodique[271]*

L'étape importante de l'adressage des protéines membranaires est le passage du réticulum endoplasmique (RE) à l'appareil de Golgi. Plusieurs mécanismes ont été décrits comme déterminants dans cette étape.

Le premier mécanisme est lié à la présence dans la protéine d'un motif de rétention du réticulum endoplasmique permettant de réguler l'adressage à la membrane plasmique. La plupart des protéines résidant dans le RE possède ce motif qui les retient. Pour les protéines nouvellement synthétisées, ce motif facilite probablement leur liaison avec les protéines adaptatrices du RE[272]. A moins qu'une autre protéine vienne s'y fixer et cacher ainsi ce motif, permettant la sortie de la protéine du RE. Sur la protéine SCN5A, 6 motifs de rétention du RE ont été identifiés dont 3 se situent dans l'interdomaine I-II[273]. Zhou et coll.[273] ont montré aussi que l'augmentation de courant sodique due à la protéine kinase A (PKA) disparaissait quand les 3 sites étaient éliminés. De plus, l'augmentation de courant sodique disparaît quand le résidu 483, une sérine phosphorylée par la PKA est remplacée par une alanine. Cela suggère que la phosphorylation du canal sodique supprime le mécanisme de rétention dans le RE, entraînant une augmentation du nombre de canaux à la membrane responsable de l'augmentation du courant sodique. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du nombre de canaux à la membrane en réponse à une stimulation de la PKA sont encore inconnus.

Le deuxième mécanisme est dû à la présence dans la protéine d'un motif d'exportation du RE. En effet, la sortie des protéines du RE est sous le contrôle d'un motif d'exportation[274]. Il existe dans la partie C-terminale de SCN5A un motif diacide qui pourrait potentiellement être un motif d'exportation du RE. Cependant actuellement, aucune donnée ne confirme l'implication de ce motif dans l'exportation de SCN5A hors du RE.

Le troisième est le résultat de l'interaction d'un domaine PDZ (domaine d'association protéine-protéine) avec des protéines d'ancrage, qui peuvent affecter le transport du RE au Golgi[275]. La partie C-terminale de SCN5A contient un domaine PDZ qui est capable de lier la syntrophine γ2[249]. Il a été montré que le canal sodique était couplé au cytosquelette d'actine via la syntrophine[249]. Bien qu'il n'existe aucune

donnée précise à ce sujet, il semble que le motif PDZ pourrait avoir un rôle dans le passage du canal sodique du RE à l'appareil de Golgi.

En plus de ces signaux de rétention ou d'exportation du RE, il existe un mécanisme de contrôle/qualité dans le Golgi. Ce mécanisme a été démontré dans le cas des canaux potassiques rectifiants entrants[276]. Peu de choses sont connues sur la régulation du transport de SCN5A du Golgi à la membrane plasmique. Une étude décrit la localisation intracellulaire de SCN5A marqué par la GFP dans des cardiomyocytes de chien[277]. L'expression du canal est plus élevée dans le RE que dans le Golgi, suggérant que le mécanisme de transport entre le RE et l'appareil de Golgi régule le nombre de canaux à la membrane[277].

### *I.3. Localisation du canal sodique cardiaque*

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont responsables de l'initiation et de la propagation du potentiel d'action. Ils sont localisés au niveau des disques intercalaires qui sont les structures qui font le lien entre les cardiomyocytes[278 281]. Il semblerait qu'une certaine quantité de canaux sodiques fonctionnels soit stockée au niveau des cavéoles, compartiments sous-membranaires, qui adressent à la membrane les canaux sodiques en cas de stimulation β adrénergique[279].

### *I.4. Les partenaires de SCN5A*

Cinq protéines ont été décrites comme interagissant avec SCN5A : les ankyrines B et G, le facteur de croissance fibroblastique FHF1B, la calmoduline, l'ubiquitine ligase Nedd4 et la syntrophine. Ces protéines interagissent avec la partie C-terminale de SCN5A, mise à part les ankyrines B et G qui se lie à l'interdomaine II-III du canal (Figure 68).

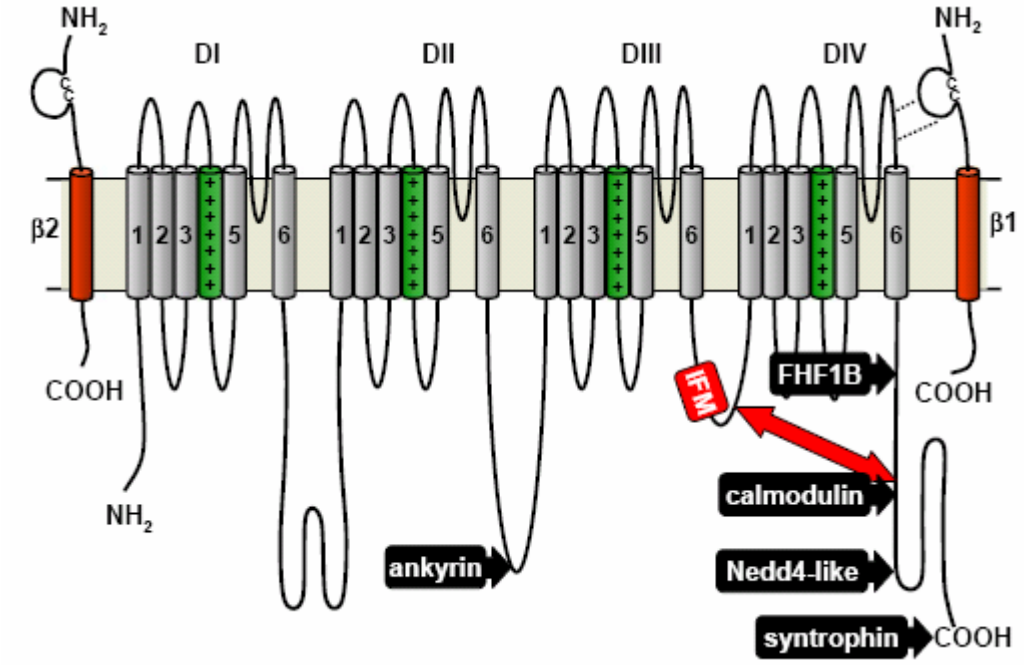



*Figure 68 : la sous-unité α du canal sodique cardiaque associée à ses 2 sous unité β ainsi que les protéines interagissants.*
*Les sous-unités β sont en rouge. Les 4 segments en vert sont sensibles au potentiel de membrane. Le motif IFM joue un rôle clé dans l'inactivation. Les protéines interagissant avec SCN5A sont représentées schématiquement et indiquent leur site de liaison approximatif.*
*(D'après Abriel et Kass[262])*

### I.4.1. Ankyrine G

Lemaillet et coll.[280] ont montré, en 2003, qu'il existait une séquence de 9 acides aminés dans l'interdomaine II-III de tous les canaux sodiques de la famille des SCNxA, qui était capable d'interagir avec l'ankyrine G. En 2000, Priori et coll.[165] avaient décrit la mutation E1053K sur le gène *SCN5A* dans le cadre du syndrome de Brugada. Cette mutation modifierait le motif de liaison à l'ankyrine G. En 2004, Mohler et coll.[281] ont confirmé que la mutation de E1053K empêchait toute liaison entre SCN5A et l'ankyrine G. De plus, ils ont montré que cette mutation perturbe l'adressage de SCN5A au niveau des disques intercalaires, suggérant que l'ankyrine G pourrait avoir un rôle dans l'adressage du canal.

### I.4.2. Facteur de croissance fibroblastique FHF1B

En 2001, Liu et coll.[282] ont montré grâce à un crible double hybride que la partie C-terminale de Nav1.9 de rat interagissait directement avec FHF1B. FHF1B est un facteur de croissance qui appartient à la famille des facteurs de croissance fibroblastiques. Il est intracellulaire et exprimé dans le tissu cardiaque. Par la suite, il a été montré que FHF1B interagissait avec la partie proximale du C terminal de SCN5A entre les acides aminés 1773 à 1832[283].

L'étude électrophysiologique des cellules HEK293 coexprimant SCN5A et FHF1B montre une altération de l'inactivation du canal sans modification des autres paramètres[283]. Dans cette zone d'interaction, plusieurs mutations décrites dans le cadre du syndrome du QT long ou du syndrome de Brugada ont été identifiées. L'une d'entres elles, la D1790G[59] identifiée dans le cadre du syndrome du QT long, a été étudiée. Elle empêche l'interaction de FHF1B avec SCN5A, et par conséquent restaure le phénotype contrôle[283]. FHF1B jouerait un rôle dans l'adaptation des protéines kinases à SCN5A. Cependant, le rôle précis de FHF1B dans la régulation et la fonction du canal reste à préciser.

### I.4.3. Calmoduline

De nombreux canaux ioniques sont capables de fixer la calmoduline (CaM)[284] et le calcium joue un rôle important dans l'excitabilité cardiaque et la contraction[285]. La recherche systématique du motif de liaison à la CaM, IQ dont la séquence consensus est IQxxxRxxxxR montre que ce motif existe en C-terminal de SCN5A et de toutes les autres isoformes des sous-unités α des canaux sodiques[286]. La possibilité que la CaM module le courant sodique a été suggérée par un expérience de double hybride démontrant l'interaction d'un canal sodique voltage dépendant avec la CaM grâce à un motif IQ présent dans la partie C terminale du canal sodique[287]. En 2002, 2 équipes ont démontré l'interaction directe de SCN5A avec la CaM[288 289].

Cependant les effets de cette dernière sur le canal semblent controversés. En effet, Tan et coll.[288] ont montré que la liaison entre la CaM et SCN5A accélère le passage du canal à l'état inactif et que la mutation A1924T située dans la séquence consensus du motif IQ, altère l'effet de la CaM sur SCN5A. Deschênes et coll.[289] ont montré qu'il n'y a pas d'effet direct de la CaM sur les propriétés cinétiques de SCN5A. Récemment, Kim et coll.[290] ont suggéré que la liaison de la CaM avec le domaine IQ de SCN5A pourrait moduler l'interaction entre la porte d'inactivation (l'interdomaine II-III) et la partie C terminale du canal. En effet, Motoike et coll.[291] ont montré que l'interaction entre l'interdomaine II-III et la partie C terminale stabiliserait le canal dans un état inactif. Le rôle de CaM sur SCN5A est encore mal connu, cependant elle pourrait jouer un rôle clé dans l'inactivation du canal.

### I.4.4. Ubiquitines ligases

En 1996, Staub et coll.[292] ont montré grâce à un crible double hybride que le motif PY du canal sodique épithélial ENaC dont la séquence consensus est PPxY est capable de lier le domaine WW situé en C-terminal de Nedd4. Nedd4 est une protéine de la famille des ubiquitines ligases E3. Les ubiquitines sont des petites protéines de 7 kDa qui sont retrouvées dans toutes les cellules animales. Elles se fixent de manière covalente aux protéines membranaires grâce aux ubiquitines ligases E3 (ubiquitinylation) favorisant soit l'adressage et l'internalisation soit la dégradation de ces protéines par le protéasomes ou par le système lysosomal[293]. Einbond et coll.[294] ont montré que la partie C terminale des canaux sodiques du coeur et du cerveau contenait un motif PY. En 2000, Abriel et coll.[295] ont montré dans l'oocyte de Xenope que Nedd4 était capable de diminuer le courant $I_{Na}$. En 2004, van Bemmelen et coll.[296] ont montré que Nedd4-2 est exprimé dans les cellules cardiaques et se lie au motif PY de SCN5A. Il est aussi capable d'ubiquitinyler et diminuer le nombre de canaux sodiques présents à la membrane. En 2004, Rougier et coll.[297] ont montré que Nedd4-2 est capable de réguler SCN5A mais aussi 2 autres isoformes cérébrales des canaux sodiques voltage-dépendants et que cette régulation est spécifique de Nedd4-2. En effet Nedd4-2 diminue le courant sodique généré par SCN5A en réduisant le nombre de canaux à la

membrane et en augmentant le taux d'internalisation des canaux. Cependant comment Nedd4 est-il régulé ? Est-il le seul à ubiquitinyler SCN5A ? Quelle est la part de la régulation du turn-over de SCN5A dans les pathologies liées à ce dernier ? Telles sont les grandes questions qu'il reste encore à approfondir.

### I.4.5. Syntrophines

En 1998, Gee et coll.[298] ont montré que le domaine PDZ de SCN5A qui se situe dans la partie C terminale du canal interagit spécifiquement avec plusieurs syntrophines, et ils ont pu purifier le complexe formé par SCN5A, la syntrophine et la dystrophine à partir de tissu cardiaque. La syntrophine fait partie de la famille des protéines adaptatrices intracellulaires qui constitue le complexe des protéines associées à la dystrophine dans les muscles cardiaque et squelettiques. L'effet de l'interaction de la syntrophine sur SCN5A a été montré dans 2 études différentes. La première en 2002[273], montre que quand le domaine PDZ de SCN5A est tronqué, l'inactivation du canal est altérée dans l'ovocyte de Xénope. Cependant dans les cellules HEK293, les propriétés biophysiques du canal tronqué ne sont pas différentes de celles du canal sauvage. En 2003, Ou et coll.[249] ont montré que la syntrophine γ2 est capable de se fixer au domaine PDZ de SCN5A et provoque une altération de l'activation. Ces résultats discordants sont probablement dus aux différents systèmes de réexpression utilisés. Le rôle du complexe multiprotéique comprenant la dystrophine, SCN5A et la syntrophine reste encore à préciser. Il pourrait en effet intervenir dans la stabilisation de SCN5A dans la membrane cellulaire.

## *II. Recherche de nouveaux partenaires protéiques.*

De nombreuses mutations responsables du syndrome de Brugada ou de troubles de la conduction cardiaque progressifs sont localisées dans l'interdomaine I-II de la protéine SCN5A ou IDI-II. Nous avons donc choisi de rechercher les protéines capables d'interagir avec ce domaine intracellulaire du canal. Pour rechercher de nouveaux partenaires de SCN5A nous avons utilisé la technique du crible double hybride.

### II.1. Principe

Le système double hybride est une méthode génétique dont le but est de détecter *in vivo* chez la levure, des interactions protéine-protéine. Il peut-être utilisé pour établir des interactions entre deux protéines connues ou pour rechercher dans une banque d'ADNc un gène codant pour une protéine capable d'interagir avec une protéine donnée, il s'agit alors d'un « crible » double hybride.

La méthode repose sur l'utilisation des propriétés structurelles communes à de nombreux facteurs de transcription eucaryotes. En effet ils sont constitués d'une chaîne polypeptidique comprenant deux domaines essentiels à leur fonction : le domaine de liaison à l'ADN (BD) et le domaine activateur de la transcription (AD). Séparément ces deux domaines n'ont aucune activité transcriptionnelle.
Deux protéines de fusion sont générées : la première est une fusion du domaine de liaison à l'ADN LexA-BD avec la protéine « appât » (X) et la deuxième est une fusion du domaine activateur du facteur de transcription GAL4-AD et la protéine « proie » (Y) (Figure 69).

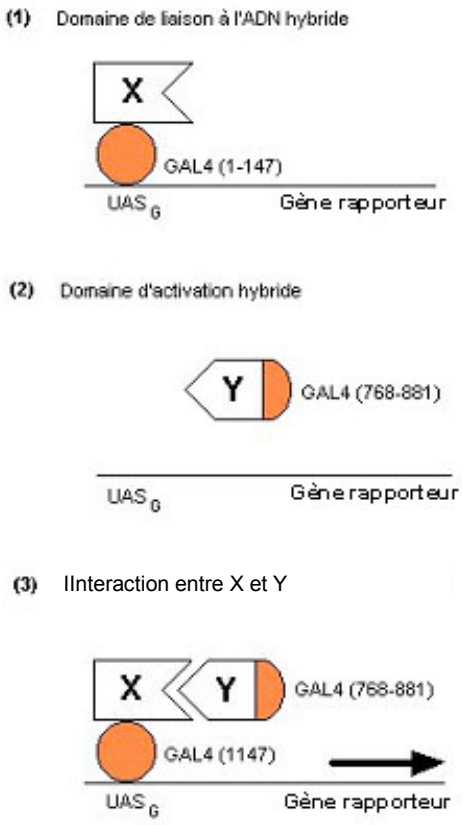



*Figure 69 : Stratégie de détection des interactions entre protéines par le système double hybride. Les plasmides codant pour deux protéines hybrides, l'un représentant le DBD de GAL4 fusionné à la protéine X, et l'autre représentant le domaine d'activation de GAL4 fusionné à la protéine Y, sont construits et introduits dans la levure L40. L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine GAL4 fonctionnelle et donc à l'activation de la transcription du gène rapporteur qui est sous la dépendance de GAL4. La protéine fusionnée au DBD est appelée "appât". L'appât est généralement une protéine dont on recherche les partenaires cellulaires. La protéine associée au domaine d'activation est appelée "proie". La proie peut être inconnue. On réalise alors avec l'appât le crible d'une banque issue d'un tissu ou d'un type cellulaire donné, fusionné au domaine d'activation GAL4 pour identifier des proies.*

Les plasmides sont introduits dans une souche de levure contenant un ou plusieurs gènes rapporteurs et possédant en amont LexA, le site de reconnaissance de LexA-BD. Classiquement deux gènes rapporteurs sont utilisés : un marqueur de prototrophie HIS3 et LacZ. La souche L40 de *Saccharomyces cerevisiae* possède le gène HIS synthase (HIS3) et le gène LacZ sous contrôle de LexA. Son génome est le suivant : Mat a, trp1, leu2, his3, LYS2 ::LexA-HIS3, URA3 ::LexA-LacZ. Les plasmides codant pour le BD et l'AD confèrent aux levures la capacité de pousser sur un milieu carencé en leucine et en tryptophane respectivement ; c'est à dire sur un milieu dénué de ces deux acides aminés, ne se développent que les clones contenant à la fois les deux types de plasmides.

S'il existe une interaction entre les hybrides BD-X et AD-Y, le facteur de transcription est alors reconstitué et donc actif. Il permet la transcription des gènes rapporteurs. Les cellules acquièrent ainsi la faculté de pousser dans un milieu carencé en histidine. La β-galactosidase (codée par le gène LacZ) est produite et confère une coloration bleue aux clones lorsque du 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-B-D-Galactoside (X-Gal) est fourni aux levures. Le plasmide banque de ces clones peut ensuite être purifié et séquencé conduisant ainsi à l'identification, grâce aux banques de données, de la protéine capable d'interagir avec la protéine étudiée.

## II.2. Crible double hybride.

Pour réaliser le crible double hybride, nous avons utilisé comme appât, l'interdomaine I-II en entier (ou IDI-II, acides aminés 417 à 711) (Figure 70) et comme proie, une banque de cerveau de souris nouveau-nées. Nous avons obtenu 22 clones.

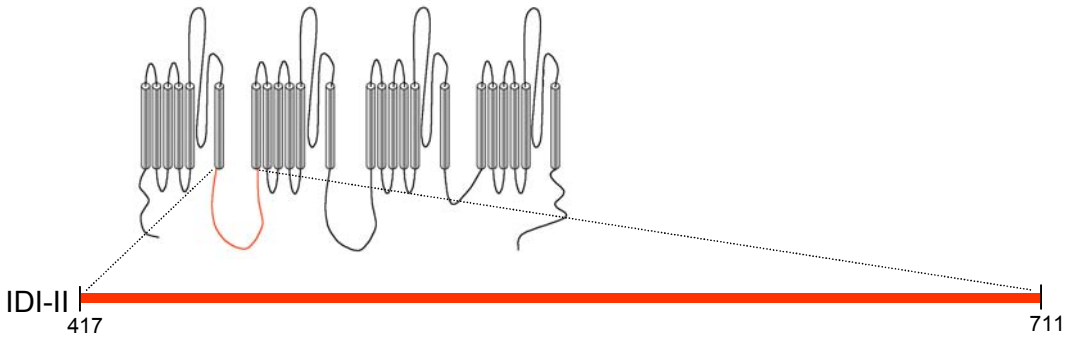



*Figure 70 : appât utilisé pour le crible double hybride.*
*IDI-II comprend les acides aminés 417 à 711.*

L'un des 22 clones obtenus contenait un plasmide contenant l'ADNc codant pour l'intégralité de la protéine 14-3-3η (14-3-3 eta). Pour vérifier cette interaction, nous avons réalisé l'expérience une 2ème fois à partir des plasmides purifiés. L'interaction est déterminée par la capacité des levures L40 à pousser sur un milieu de culture dépourvu de leucine, de tryptophane et d'histidine (Figure 71).

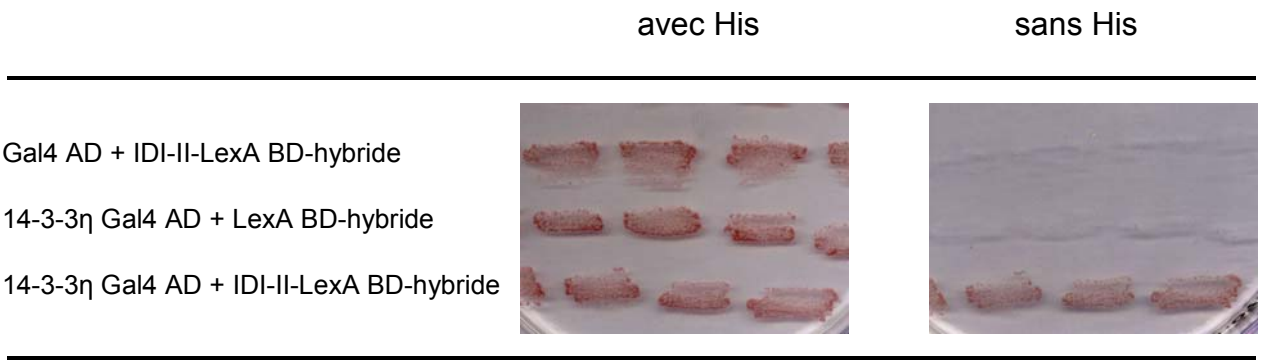



*Figure 71 : 14-3-3η interagit avec IDI-II de SCN5A.*

L'enchaînement en acides aminés classiquement rencontré dans l'interaction avec la protéine 14-3-3 a été bien étudié[299] [300]. Les sites consensus les plus généralement retrouvés sont les suivants : RSXpSXP[301] et RXXXpSXP où R est une arginine, S une sérine, X un acide aminé quelconque, pS une phosphosérine et P une proline. Cependant il faut noter qu'un certain nombre de protéines interagissant avec 14-3-3 ne possèdent pas ce type de séquences. Nous les avons recherchées dans l'IDI-II de SCN5A et aucun site de fixation canonique de 14-3-3 n'a été mis en évidence. Nous avons donc décidé d'affiner la zone de fixation de 14-3-3 sur l'IDI-II de SCN5A en utilisant la technique du double hybride. Pour ce faire, nous avons construit différentes proies à partir de l'IDI-II de SCN5A (Figure 72) et testé leur capacité à se fixer à 14-3-3η.

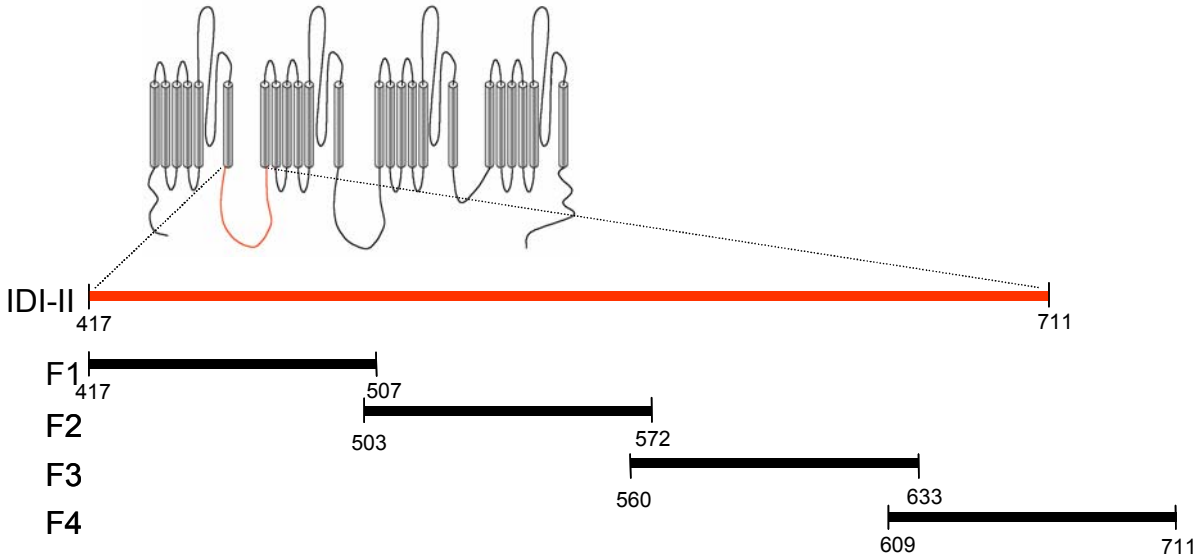



*Figure 72 : Les appâts utilisés lors du double hybride pour réduire la zone d'interaction entre SCN5A et 14-3-3η.*
*L'IDI-II va de l'acide aminé 417 à 711, le fragment 1 de 417 à 507, le fragment 2 de 503 à 572, le fragment 3 de 560 à 633 et le fragment 4 de 609 à 711.*

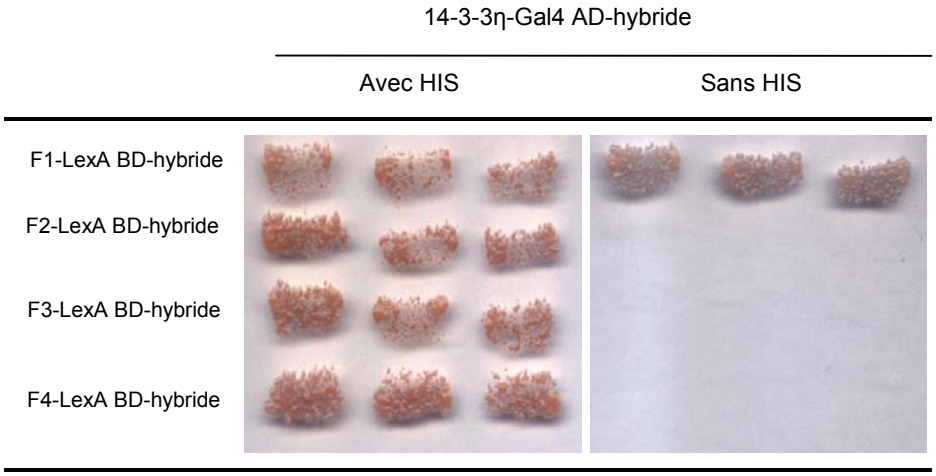



*Figure 73 : 14-3-3η interagit avec le fragment 1 de l'IDI-II SCN5A.*
*14-3-3η n'interagit pas avec les autres fragments de l'interdomaine.*

Seules les levures L40 qui contiennent les plasmides codant pour le fragment 1 et 14-3-3η sont capables de pousser en l'absence d'histidine dans le milieu (Figure 73). Le fragment 1 de SCN5A et 14-3-3η sont capables d'interagir.
Comme ce fragment contient 90 acides aminés, nous avons construit d'autres proies pour réduire encore la zone d'interaction (Figure 74).

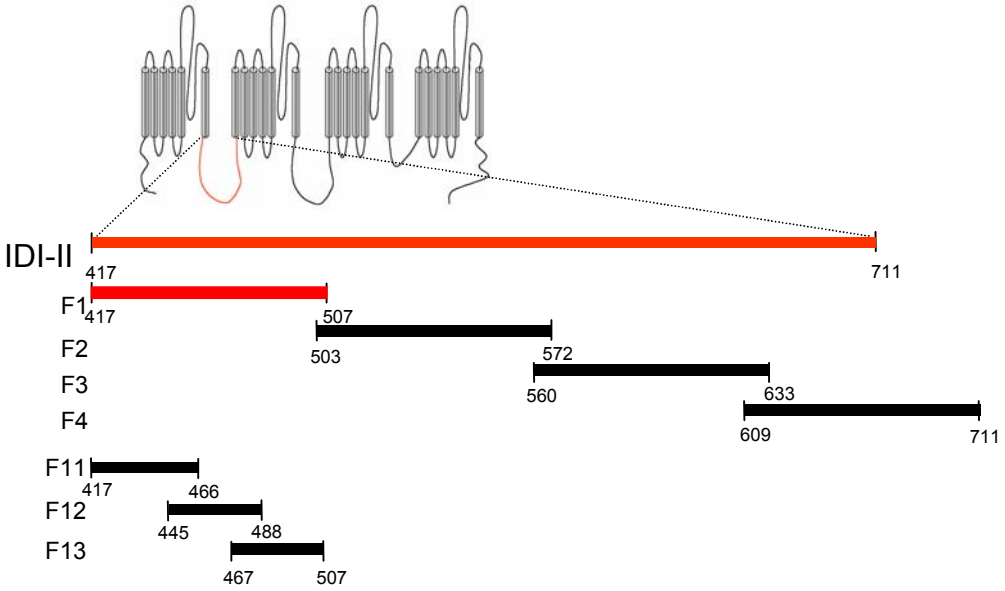



*Figure 74 : Appâts utilisés pour réduire la zone d'interaction entre SCN5A et 14-3-3η. Les numéros indiquent la position des acides aminés dans la séquence totale de SCN5A.*

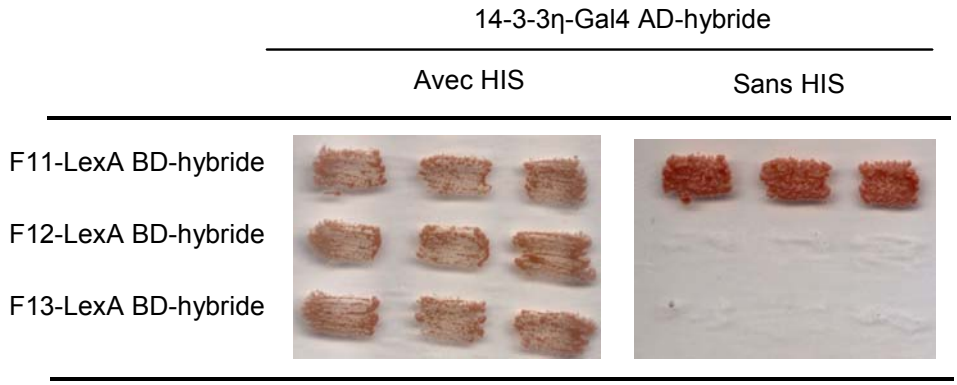



*Figure 75 : 14-3-3η interagit avec le fragment 11(acides aminés 417 à 466) de SCN5A. 14-3-3η n'interagit pas avec les autres fragments de la boucle 1 de SCN5A.*

Seules les levures L40 qui contiennent les plasmides codants pour le fragment 11 (acides aminés 417 à 466) et 14-3-3η sont capables de pousser en l'absence d'histidine dans le milieu (*Figure* 75). Le fragment 11 de SCN5A et 14-3-3η sont capables d'interagir.

Pour savoir si cette interaction est spécifique d'une isoforme de 14-3-3, nous avons testé d'autres isoformes de 14-3-3 : thêta (τ) et zêta (ζ) (Figure 76).

Nos clones témoin contiennent le plasmide appât avec l'IDI-II et le plasmide proie vide.

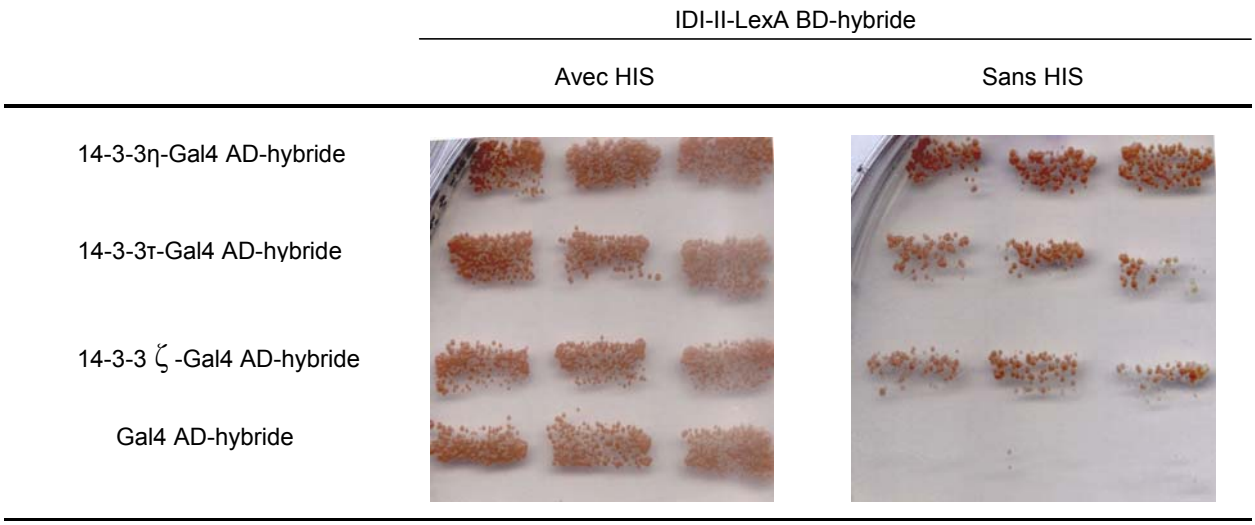



Figure 76 : *14-3-3η interagit avec l'IDI-II de SCN5A.*
*Les isoformes τ et ζ de 14-3-3 interagissent aussi avec l'IDI-II de SCN5A.*

Les isoformes η, τ et ζ de 14-3-3 se lient avec l'IDI-II de SCN5A. Cependant, il faut noter que la poussée des levures produit des clones moins denses dans le cas de 14-3-3 τ et ζ.

## II.3. Caractérisation de l'interaction de SCN5A avec 14-3-3η.

Pour caractériser l'interaction de SCN5A avec 14-3-3η, nous avons vérifié cette interaction *in vivo* par immunoprécipitation, puis nous avons voulu savoir si la localisation de ces 2 protéines dans la cellule rendait possible cette interaction. Nous avons enfin étudié l'effet physiologique de 14-3-3 sur SCN5A grâce à la technique de patch-clamp et séquencé 2 isoformes de 14-3-3 chez des propositus de familles atteintes de syndrome de Brugada et de troubles de la conduction cardiaque.

### *II.3.1. Immunoprécipitation.*

Les résultats du crible double hybride chez la levure ont mis en évidence une interaction entre un fragment du IDI-II de SCN5A et la protéine 14-3-3η entière. Pour

étudier cette liaison au niveau de la protéines SCN5A entière, nous avons utilisé la technique d'immunoprécipitation, que nous avons effectué dans un premier temps à partir de cellules COS-7 transfectées puis sur des extraits de coeurs de souris.

### II.3.1.1. Immunoprécipitation à partir d'extrait de cellules COS-7

Les cellules COS-7 ont été transfectées transitoirement par un plasmide pEGFP ou un plasmide pEGFP contenant l'ADNc de SCN5A en fusion du côté C-terminal avec celui de la GFP (SCN5A-GFP)[178] et par un plasmide pCI contenant l'ADNc de 14-3-3. Après avoir réalisé l'immunoprécipitation en utilisant soit un anticorps anti-GFP soit un anticorps anti-14-3-3, nous avons révélé les protéines du complexe par Western Blot (Figure 77).

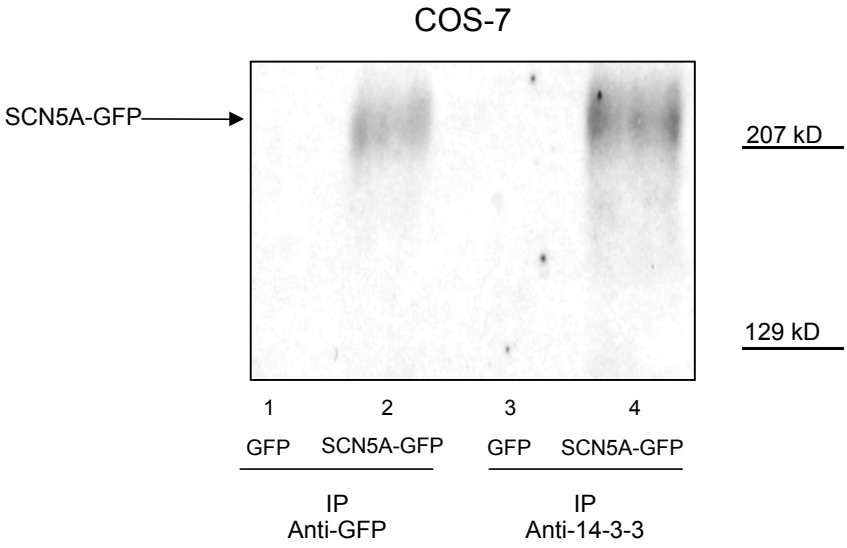



*Figure 77 : La protéine SCN5A entière interagit avec 14-3-3η dans un extrait de cellules COS-7. Puit 1 et 3 : extraits de cellules COS-7 transfectées avec le plasmide pEGFP, puits 2 et 4 : extraits de cellules COS-7 transfectées avec le plasmide pEGFP-SCN5A. IP anti-GFP=immunoprécipitation réalisée avec l'anticorps anti-GFP, IP anti-14-3-3=immunoprécipitation réalisée avec l'anticorps anti-14-3-3*

Dans le cas de l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-GFP, une protéine d'un poids moléculaire d'environ 230 kDa est révélée lorsque les cellules COS-7 ont été transfectées par le plasmide pEGFP contenant l'ADNc de SCN5A.

Dans le cas de l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-14-3-3, nous retrouvons cette même bande à 230 kDa, correspondant à SCN5A fusionné à la GFP. Cette bande protéique révélée dans les puits 2 et 4 correspond donc à la protéine de fusion SCN5A-GFP

Aucun signal à 230 kDa n'est observé lorsque l'immunoprécipitation est réalisée à partie d'extraits de cellules COS-7 transfectées avec la GFP seule. La bande correspondant à la GFP n'est pas visible sur ce gel compte tenu de la très faible réticulation du gel permettant de visualiser que les protéines de haut poids moléculaires. D'autre part, nous avons vérifié que la protéine GFP présente dans les cellules COS-7 transfectées avec le vecteur pEGFP n'est pas immunoprécipitée par l'anticorps anti 14-3-3. Ces résultats montrent qu'il existe une interaction spécifique entre 14-3-3η et la sous-unité α entière du canal sodique.

Après avoir mis en évidence l'interaction des 2 protéines entières dans un système de surexpression de SCN5A, nous avons voulu visualiser cette interaction dans un système physiologique. Pour cela, nous avons choisi de réaliser une immunoprécipitation à partir d'extraits de coeur de souris.

#### II.3.1.2. Immunoprécipitation à partir d'extrait de coeur de souris

L'immunoprécipitation a été réalisée de la même façon que précédemment en utilisant des extraits de coeur de souris à la place des extraits de cellules COS-7 transfectées transitoirement (Figure 78).

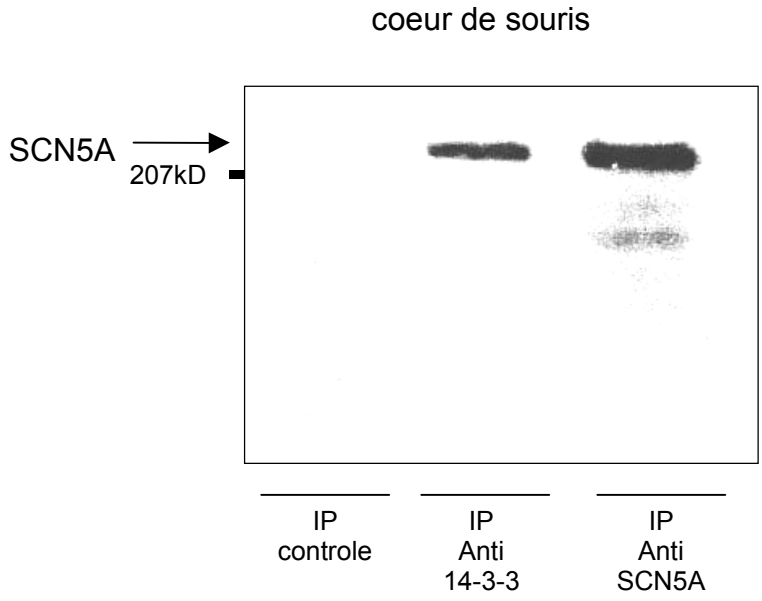



*Figure 78 : SCN5A interagit avec 14-3-3η dans de l'extrait de coeur de souris. IP anti 14-3-3=immunoprécipitation réalisée avec l'anticorps anti-14-3-3 et IP anti-SCN5A= immunoprécipitation réalisée avec l'anticorps anti-SCN5A.*

Lorsque l'immunoprécipitation est réalisée avec l'anticorps anti-SCN5A, ce même anticorps révèle une bande à environ 210 Da qui correspond à la taille de SCN5A. Dans le cas de l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-14-3-3, nous retrouvons cette bande à 210 kDa révélée par l'anticorps anti-SCN5A correspondant à SCN5A. L'immunoprécipitation contrôle avec l'anti-14-3-3 pré incubé avec la protéine 14-3-3 purifiée (Figure 78) ne révèle aucun signal sur le Western Blot indiquant qu'il n'y a pas de liaison non spécifique entre SCN5A et la protéine G-sépharose utilisée pour l'immunoprécipitation.

### *II.3.2. Immunocytochimie.*

Ces expériences d'immunoprécipitation montrent donc clairement que l'interaction de ces 2 protéines peut exister dès lors qu'elles sont en présence. Cette liaison ne peut cependant avoir lieu dans la cellule et donc avoir un sens physiologique que sous la condition que ces 2 protéines se trouvent dans le même

compartiment cellulaire. Nous avons donc étudié la localisation cellulaire de 14-3-3η et SCN5A par immunocytochimie dans des cellules COS-7 transfectées par le plasmide pIRES codant pour 14-3-3η fusionnée à l'étiquette peptidique HA en N-terminal de la protéine et SCN5A fusionnée à la GFP (Figure 79).

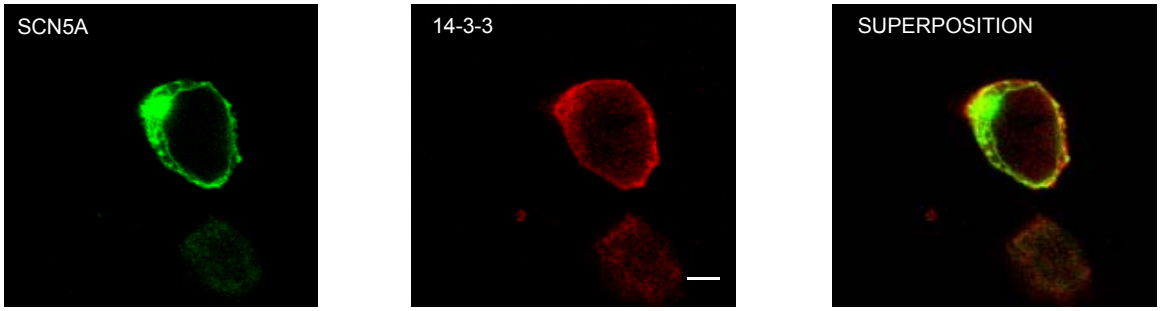



*Figure 79 : Immunocytochimie sur cellule COS-7 transfectée par le plasmide pIRES-14-3-3η-HA-SCN5A-GFP.*
*SCN5A : le marquage vert correspond la protéine GFP fusionnée à SCN5A. 14-3-3 : l'immunomarquage rouge correspond 14-3-3η fusionnée à l'étiquette peptidique HA. SUPERPOSITION : superposition des 2 marquages. La barre correspond à 10µm.*

Ces expériences montrent que ces 2 protéines se trouvent dans le même compartiment cellulaire dans un système d'expression transitoire, mais dans les cardiomyocytes qu'en est-il ? Pour répondre à cette question, nous avons étudié la localisation de 14-3-3 dans les cardiomyocytes isolés de lapin par immunocytochimie (Figure 80).

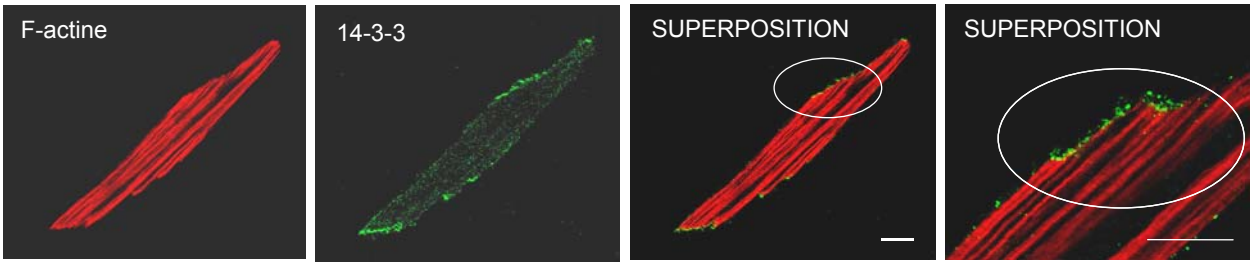



*Figure 80 : localisation de 14-3-3 dans les cardiomyocytes de lapin.*
*F-actine : l'immunomarquage rouge correspond à l'actine filamenteuse. 14-3-3 :l'immunomarquage vert correspond à 14-3-3. SUPERPOSITION : superposition des 2 marquages. La barre correspond à 10µm.*

Les résultats montrent que 14-3-3 a une localisation majoritairement au niveau des disques intercalaires mais aussi de façon diffuse dans le cytoplasme. Les disques intercalaires se situent aux extrémités du faisceau d'actine. Nous avons

voulu dans un deuxième temps étudier la localisation de SCN5A et 14-3-3 dans des cardiomyocytes par immunocytochimie (Figure 81).

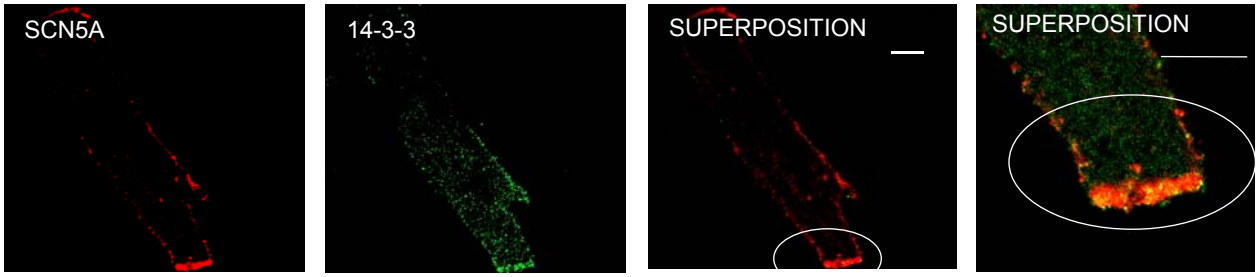



*Figure 81 : localisation de SCN5A et de 14-3-3 dans des cardiomyocytes isolés de lapin. SCN5A : l'immunomarquage rouge correspond à SCN5A. 14-3-3 : l'immunomarquage vert correspond à 14-3-3. SUPERPOSITION : superposition des 2 marquages. La barre correspond à 10µm.*

La localisation de SCN5A obtenue dans les cardiomyocytes isolés sont en accord avec les données de la littérature : SCN5A est localisé dans les disques intercalaires[302], et 14-3-3η est localisé majoritairement dans les disques intercalaires et de façon diffuse dans le cytoplasme.
Dans les cardiomyocytes, ces résultats montrent qu'il y a une colocalisation de 14-3-3 et SCN5A dans les disques intercalaires.

Pour tenter d'élucider le rôle physiologique de 14-3-3 sur SCN5A, nous avons étudié l'activité du canal sodique dans le système de cellules COS-7 transfectées transitoirement par SCN5A

### *II.3.3. Effet physiologique de l'interaction de SCN5A avec 14-3-3η.*

Pour élucider le rôle de 14-3-3 sur le canal sodique SCN5A, nous avons d'une part effectué une étude électrophysiologique de SCN5A en utilisant la technique de patch clamp en configuration cellule entière. D'autre part, nous avons séquencé 2 isoformes de 14-3-3 chez des propositus de familles atteintes de troubles de la conduction cardiaque ou du syndrome de Brugada.

### II.3.3.1. Patch clamp.

Pour étudier le rôle de 14-3-3 sur SCN5A, nous avons effectué une étude électrophysiologique de SCN5A en utilisant la technique de patch clamp en configuration cellule entière. Dans nos conditions expérimentales (cellules COS-7 à 35°C), les expériences préliminaires montrent que la surexpression de 14-3-3, n'aurait aucun effet sur la densité de courant, ni sur la sensibilité de l'activation de SCN5A au potentiel. En revanche, nous observons un déplacement de la courbe d'inactivation dépendant du potentiel vers des potentiels plus négatifs.

Parallèlement à ces expériences préliminaires, nous avons surexprimé 14-3-3η et son dominant négatif, un double mutant de 14-3-3 η. Thorson et coll. [303] ont décrit ce double mutant de 14-3-3 η. Tout comme 14-3-3 sauvage, il est capable de se dimériser cependant cet hétérodimère 14-3-3 sauvage/14-3-3 dominant négatif perd son affinité à lier sa protéine cible. Les résultats des expériences préliminaires montrent que la surexpression de 14-3-3η et son dominant négatif fait disparaître complètement l'effet observé sur l'inactivation du canal SCN5A.

D'après nos premières expériences, la surexpression de 14-3-3η aurait un effet sur l'inactivation du canal. Cet effet semblerait disparaître complètement quand 14-3-3η et son dominant négatif sont surexprimés.

### II.3.3.2. Séquençage de propositus atteints de troubles de la conduction progressif ou du syndrome de Brugada.

La mise en évidence de l'interaction de SCN5A avec 14-3-3η amenait à penser que les gènes YWHAH et YWHAE codant respectivement pour les protéines 14-3-3 η et ε pourraient être de bons candidats dans le cadre du syndrome de Brugada et des troubles de la conduction cardiaque progressifs. Nous avons donc séquencé 12 propositus de familles atteintes de syndrome du Brugada et 7 propositus de familles atteintes de troubles de la conduction cardiaque progressifs, toutes non liées à SCN5A. Nous avons retrouvé 4 polymorphismes, mais aucune mutation n'a pu être mise en évidence sur les gènes YWHAE et YWHAH.

| | YWHAE exon3 | YWHAH exon1 | YWHAH exon2 |
|---|---|---|---|
| Polymorphismes retrouvés chez les propositus Brugada ou troubles de la conduction cardiaque | K94K, F120F | IVS1 +39 del G | IVS2 +12 G→A |

*Tableau 8 : tableau récapitulatif des polymorphismes retrouvés lors du séquencage de 14-3-3 ε et η*

## *III. Discussion.*

Grâce au crible double hybride, nous avons réussi à mettre en évidence une interaction directe entre le canal sodique voltage-dépendant SCN5A et la protéine 14-3-3η qui a été confirmée par des expériences d'immunoprécipitation. Cette zone d'interaction se situe au niveau de l'interdomaine I-II de SCN5A entre les acides-aminés 417 et 466. L'immunomarquage des cardiomyocytes montrent que 14-3-3 colocalise avec SCN5A au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes. Les études électrophysiologiques préliminaires ont montré que 14-3-3η était capable de moduler l'inactivation de SCN5A.

14-3-3η est une protéine constituée de 246 acides aminés. Elle appartient à la famille des protéines adaptatrices eucaryotes 14-3-3. Elles ont été découvertes dans le cerveau[304] en 1968. Leur nom provient du numéro de la fraction de chromatographie sur DEAE-cellulose où elles ont été retrouvées et de leur position de migration sur gel d'électrophorèse. Cette famille de protéines est exprimée de façon ubiquitaire. L'isoforme η de 14-3-3 est exprimée dans le coeur. Leur séquence protéique est hautement conservée, de la Levure aux Mammifères. Sept isoformes (β, γ, ε, ζ, η, τ et σ) codées par 7 gènes différents sont connus chez les Mammifères. Les protéines 14-3-3 peuvent induire des changements de conformation, masquer des sites spécifiques ou jouer le rôle de protéines chaperonnes au niveau de leurs protéines cibles[305]. Les différentes techniques de biologie moléculaire ont montré que de nombreuses protéines différentes peuvent se lier à 14-3-3[306] [307]. Par conséquent, 14-3-3 joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires tels que :

- la signalisation cellulaire. De nombreuses protéines sont connues pour se lier à 14-3-3, la calmoduline[308], des protéines de la voie des MAPK[309], des protéines régulatrices de RhoA[310 311], des protéines kinases ...
- le contrôle du cycle cellulaire. 14-3-3 interagit avec cdc25 pour favoriser sa localisation cytoplasmique et l'empêche d'activer cdc2 (protéine clé dans la division cellulaire cellulaire) [312 313].
- l'adhésion cellulaire. 14-3-3 est capable d'interagir avec de nombreuses protéines du cytosquelette[306 307].
- l'apoptose. En réponse à un stimulus, BAD, une protéine promotrice de l'apoptose, est phosphorylée. Cette phosphorylation favorise la liaison de 14-3-3 à BAD. BAD ne peut plus se lier à Bcl2, une protéine anti-apoptotique. Bcl2 est alors inactif et l'apoptose est alors inhibée [314 315 316].

  14-3-3 se lie à FKHRL1, un facteur de transcription participant à l'initiation de l'apoptose et favorise sa localisation cytoplasmique [317] inhibant ainsi sa capacité à stimuler l'apoptose.
- le contrôle de la transcription. 14-3-3 est capable de se lier *in vitro* aux protéines de liaison à la TATA-box (TBP), au facteur de transcription IIB (TFIIB), et au facteur humain s'associant à TBP, hTAF(II)32 [318].
- la régulation des canaux ioniques. 14-3-3 est connu pour participer à la régulation PKA dépendent du canal potassique HERG et pour accélérer son activation[319].

  Le canal chlore CLCA1 est régulé par 14-3-3ε via la voie calmoduline-dépendant [320].

  14-3-3 vérifie le bon assemblage du canal potassique KCNJ11 pour lui permettre d'être adressé à la membrane[321].

  L'expression membranaire des canaux potassiques KCNK3 et KCNK9 est régulée par 14-3-3β. En effet la phosphorylation facilitée par 14-3-3 permet à la protéine de quitter le RE et d'être adressée à la membrane[322 323].

Dans le cas de SCN5A, la zone de liaison à 14-3-3η (acides aminés 416 à 466), ne contient aucun site classique de phosphorylation par la PKA, ni signal de rétention du réticulum endoplasmique RKR. Cependant, plus loin dans cet

interdomaine, 3 motifs RKR ont été décrits dont un en $_{479}$RKR$_{481}$ suivi en position 484 d'une sérine potentiellement phosphorylable par la PKA[273], mais leur présence n'est pas nécessaire à l'interaction entre SCN5A et 14-3-3η.

Les résultats d'électrophysiologie montrent que la surexpression de 14-3-3η dans les cellules COS-7 provoque un déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. Quand 14-3-3η et son dominant négatif sont co-exprimés, le déplacement de la courbe d'inactivation disparaît complètement. Comme le suggère Thorson et coll.[303], le dominant négatif se dimérise avec 14-3-3 sauvage et réduirait l'affinité de celui-ci vis à vis de sa protéine cible. L'effet du dominant négatif sur le déplacement de la courbe d'inactivation de SCN5A, montre que l'effet de 14-3-3 sauvage nécessite les 2 sites de liaison du dimère de 14-3-3. Le dimère 14-3-3 peut lier simultanément 2 ligands[299]. Nous ne pouvons pas exclure qu'il puisse exister un deuxième site de liaison à 14-3-3 sur la protéine SCN5A et que ce dernier puisse être utilisé par le dimère 14-3-3 pour induire l'effet fonctionnel. Dans nos conditions expérimentales, l'hétérodimère 14-3-3 dominant négatif/14-3-3 sauvage peut donc ne se lier qu'à un site et ne pas avoir d'effet biologique sur SCN5A.

En ce qui concerne le canal potassique HERG, il y a 2 sites de liaison à 14-3-3, l'un sur le N terminal et l'autre sur le C terminal. La coexpression du dominant négatif de 14-3-3 avec 14-3-3 sauvage annule l'effet de 14-3-3 sur l'activation du canal. Nous n'avons observé aucun effet de 14-3-3 sur la densité de courant de SCN5A. Cependant, dans nos conditions expérimentales, il nous est impossible d'exclure la présence d'un second site d'interaction sur une autre protéine partenaire de SCN5A absente dans notre système. Nedd4-2 est capable de se lier au domaine PY du C terminal de SCN5A[296 297], et Ichimura et coll.[324] ont montré que Nedd4 était capable d'interagir avec 14-3-3, inhibant ainsi l'activité ubiquitine ligase de Nedd4. Nedd4 est connu pour induire une diminution de $I_{Na}$ par augmentation de la dégradation du canal SCN5A[296 297]. Dans ce cas, une surexpression de 14-3-3, pourrait inhiber l'ubiquitinylisation de SCN5A par Nedd4 et le maintenir à la membrane. 14-3-3 pourrait ainsi participer à la régulation de la quantité de canaux sodiques à la membrane des cardiomyocytes. Il serait aussi intéressant de savoir si 14-3-3 régule la fonction de SCN5A en réponse à un stimulus extracellulaire ou non.

Le canal sodique SCN5A est responsable de la phase rapide du potentiel d'action myocardique et joue un rôle crucial dans l'initiation, la propagation et le maintient du rythme cardiaque normal[263]. Des mutations du gènes SCN5A ont été retrouvées dans de nombreuses pathologies, comme le syndrome du QT long de type 3[20], les troubles de la conduction cardiaque[251], le syndrome de Brugada[138], la mort subite du nourrisson[325], les cardiomyopathies dilatées[121] et l'extinction sinusale[326]. Aucune mutation sur les gènes 14-3-3η et 14-3-3ε n'a été retrouvée chez les propositus de familles atteintes du syndrome du Brugada ou de troubles de la conduction cardiaque non liées à SCN5A que nous avons testés. Compte tenu du faible nombre de patients que nous avons séquencé et du fait que nous avons séquencé seulement 2 isoformes de la famille des 14-3-3, nous ne pouvons pas exclure une implication de cette famille de protéines dans ces 2 pathologies.

Il existe d'autres pathologies cardiaques dans lesquelles 14-3-3 pourrait être impliqué, d'abord les pathologies où des mutations des gènes SCN5A et KCNH2 ont été retrouvées, mais aussi l'hypertrophie cardiaque. En effet, Zhang et coll.[327] ont réalisé une souris transgénique exprimant uniquement au niveau du coeur le dominant négatif de 14-3-3. Suite à une hypertension induite par ligature partielle de l'aorte, les souris développent une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une dilatation du ventricule gauche et meurent rapidement d'une dysfonction cardiaque massive. Liao et coll.[328] ont confirmé ces résultats en transfectant des cardiomyocytes de rat par un plasmide codant pour le peptide R18, un inhibiteur des protéines 14-3-3. D'après Liao et coll.[328], 14-3-3 agirait à plusieurs niveaux du mécanisme d'induction de l'hypertrophie cardiaque.

D'après ces quelques données, 14-3-3 semble jouer un rôle important dans la physiologie cardiaque, cependant le rôle de 14-3-3 dans le coeur reste encore mal connu.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse s'inscrit dans la démarche de recherche sur les troubles du rythme et de la conduction développée conjointement par l'unité INSERM 533 et le service de cardiologie au sein de l'Institut du Thorax.

L'objectif est de participer à la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies cardiovasculaires et à une meilleure analyse clinique pour assurer une prise en charge diagnostique, pronostique et thérapeutique adaptée, des malades. Ceci passe par l'identification de gènes morbides couplée à des approches physiologiques, et par une démarche clinique et moléculaire qui vise à analyser les relations phénotype/génotype.

Mon travail de thèse a abordé ces différents aspects. Dans le cadre de l'étude des relations phénotype/génotype, le travail réalisé sur une grande famille atteinte de tachycardies ventriculaires catécholergiques liées à une mutation dans le gène *RyR2* a permis de montrer que le phénotype pouvait être très variable : depuis la forme typique (tachycardies bidirectionnelles ou polymorphes à l'effort) décrite initialement par le groupe de Lariboisière jusqu'à des formes apparemment mineures, sans trouble du rythme lors des examens classiques (épreuve d'effort et enregistrement Holter) chez des patients symptomatiques. Dans ce cadre, le diagnostic moléculaire devient essentiel dans la prise en charge des membres de la famille.

L'étude des familles atteintes de syndrome de Brugada a permis de montrer la complexité de ce syndrome. A ce jour, seul le gène SCN5A a été impliqué dans ce syndrome mais des mutations dans ce gène ne sont retrouvées que dans 30% des cas. L'analyse de familles dans lesquelles des mutations dans le gène *SCN5A* ont été identifiées, montre que dans certains cas le rôle de ce gène reste difficile à comprendre (sujets phénotypiquement atteints mais indemnes de mutation). Il est probable que l'amélioration des connaissances physiopathologiques via l'identification des autres gènes permettra de résoudre ces cas qui restent actuellement inexpliqués.

Dans le cadre des syndromes du QT long, l'approche de génétique moléculaire m'a permis de résoudre le problème d'une famille dans laquelle deux syndromes coségrégeaient (QT long et Marfan) et de confirmer l'hétérogénéité du syndrome de Marfan, même si un nouveau locus n'a pas pu être identifié.

Parallèlement à l'étude des relations phénotype/génotype mon travail a permis d'identifier deux nouveaux locus dans le cadre de la fibrillation auriculaire et du syndrome de Brugada.

L'étude de nombreuses familles atteintes de troubles de conduction ne m'a pas permis de localiser de nouveau gène mais montre bien l'hétérogénéité et le caractère potentiellement héréditaire de ces atteintes, dont la pénétrance, comme dans le syndrome de Brugada, reste à préciser.

De larges approches d'épidémiologie génétique et de généalogie ont été débutées dans ces deux pathologies. Elles permettront, nous l'espérons, d'étendre la taille des familles tout en se concentrant uniquement sur les sujets phénotypiquement atteints.

Pour compléter l'approche de génétique, j'ai utilisé la technique de double hybride pour identifier un nouveau partenaire protéique de SCN5A que j'ai ensuite testé, par une approche gène candidat, dans ces deux pathologies.

Dans les formes familiales de maladies rares, les techniques de génétique inverse sont maintenant parfaitement rodées pour l'identification des gènes morbides. Dans ce cadre, le principal écueil reste le nombre de sujets atteints.

L'approche des maladies fréquentes pour lesquelles le caractère héréditaire peut être mis en évidence est plus complexe.

Les caractéristiques de la population régionale et particulièrement l'absence de migration des populations rurales que nous avons pu remarquer lors de précédentes études génétiques qui ont abouties à l'identification du premier gène de troubles de conduction et du premier gène de maladie valvulaire myxoïde, nous ont amené à coupler l'approche génétique à de grandes approches épidémiologiques et généalogiques. Cette approche est comparable celle développée dans la population islandaise pour laquelle le caractère héréditaire de maladies fréquentes comme la maladie de Parkinson ou le cancer du poumon a déjà été mis en évidence[329 330]. Ce travail nécessite le développement de grandes bases de données cliniques et, très probablement, de nouveaux outils qui devront prendre en compte le risque de faible pénétrance et celui de facteurs environnementaux qui pourraient jouer un rôle majeur.

L'objectif à long terme est d'identifier les gènes de prédisposition aux maladies fréquentes, d'apparition souvent tardive, et de développer ainsi une véritable médecine prédictive. La génétique n'est certainement qu'une étape du

développement de cette médecine prédictive. Elle devrait permettre, par de multiples approches, de préciser les mécanismes physiopathologiques des maladies et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le travail réalisé au sein de l'institut du Thorax sur les troubles de conduction liés à des mutations dans le gène SCN5A préfigure l'approche multidisciplinaire qui devrait permettre de préciser les mécanismes complexes mis en jeu dans le développement de ces maladies dégénératives. L'étude des relations phénotype/génotype a mis en évidence le caractère progressif de cette maladie héréditaire qui ne s'exprime cliniquement que vers la quatrième décennie. L'analyse d'une souris transgénique SCN5A+/- a montré qu'elle exprimait un phénotype comparable à celui observé chez les malades. L'étude de ce modèle animal a permis de montrer que la mutation morbide était responsable d'un changement de phénotype cellulaire et tissulaire (remodelage) qui aboutissait progressivement aux troubles de conduction sévère. De multiples approches physiologiques, génomiques, pharmacologique permettront peut-être d'identifier de nouvelles cibles pour la prévention de l'expression de la maladie chez l'homme.

# ANNEXES

# *I. Matériel et Méthodes*

## I.1. Génétique inverse

### *I.1.1. Analyse phénotypique*

L'analyse phénotypique a été réalisée dans la structure de recherche clinique du service de cardiologie, partie intégrante du Centre d'Investigation Clinique (CIC) du CHU de Nantes.

#### I.1.1.1. Répartition géographique des patients implantés d'un stimulateur cardiaque pour bloc auriculo-ventriculaire.

En 1992, un registre informatique appelé PMSI regroupant l'activité médicale des hôpitaux de Nantes, de Saint-Nazaire et la clinique Saint Henri a été créé. Il inclut pour chaque patient hospitalisé le ou les diagnostics ainsi que les actes thérapeutiques réalisés. Nous avons récupéré le fichier des 2906 patients de ces 3 centres, qui répondait aux critères suivants :

- Acte thérapeutique : implantation d'un stimulateur cardiaque
- Diagnostic : bloc auriculo-ventriculaire

Les communes de naissance ont été obtenues à partir des numéros de Sécurité Sociale.

Pour évaluer la répartition géographique des patients implantés d'un stimulateur cardiaque, nous avons pour chaque commune de la région rapporté le nombre total de patients recensés comme ayant eu un stimulateur cardiaque pour bloc auriculo-ventriculaire, à la population de la commune. Compte tenu de l'âge moyen d'implantation d'un stimulateur cardiaque (environ 70 ans), nous avons utilisé les données du recensement INSEE de 1936 pour chaque commune. Nous avons

donc obtenu pour chaque commune, le nombre de personne implantés par habitant. Comme la maladie de Lenègre représente plus de 80% des implantations de stimulateur cardiaque pour bloc auriculo-ventriculaire, nous avons utilisé une carte pour mettre en évidence des foyers de haute fréquence de la maladie de Lenègre. Parmi les 2096 patients, nous avons sélectionné comme propositus pour une enquête familiale, ceux qui étaient originaires des régions où il y a une incidence élevée d'implantation de pacemaker.

#### I.1.1.2. Enquête familiale

L'enquête familiale a été réalisée par les infirmières de recherche clinique de la structure de recherche clinique du service de cardiologie du CHU de Nantes.
L'étape initiale de cette enquête est d'identifier des patients atteints (propositus ou cas index) de la pathologie étudiée et de réaliser une enquête familiale exhaustive afin obtenir une famille la plus grande possible pour qu'elle soit statistiquement informative sur le plan génétique.

Chaque membre d'une famille est contacté par le propositus selon les recommandations sur la déontologie médicale et le diagnostic génétique de l'Ordre National de Médecins. Ceux qui acceptent de participer à l'étude, doivent signer un consentement écrit en accord avec les recommandations du CCPPRB (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale) du CHU de Nantes.

#### I.1.1.3. Enquête généalogique ascendante

Une enquête généalogique approfondie pour certaines familles de Brugada et de troubles de la conduction cardiaque progressif, a été réalisée en collaboration avec le Professeur André Chaventré, spécialiste de génétique des populations à l'Université de Bordeaux II pour rechercher un ancêtre commun entre différentes familles. Pour cela, il a fallu consulter les archives des registres d'état civil des communes du nord de Nantes. Jusqu'à la Révolution Française, les informations

sont facilement accessibles, mais certaines données antérieures sont manquantes. Seul le Professeur Chaventré est habilité par décision du procureur de la République à consulter les actes de moins de 100 ans.

#### I.1.1.4. Examen clinique

Dans le cadre d'une enquête familiale, chaque individu de la famille subit un examen clinique qui comprenant en général un interrogatoire approfondi à la recherche de symptômes en particulier malaises, et syncopes, un examen clinique orienté sur l'appareil cardiovasculaire, un électrocardiogramme 12 dérivations enregistré au repos (mesure du rythme cardiaque, de l'intervalle PR, du QRS, de la durée du $QT_c$, et de l'axe de l'onde P et du QRS). Pour certaines pathologies des examens complémentaires peuvent être réalisés.

##### I.1.1.4.1. Syndrome de QT Long

Dans le cas du syndrome de QT Long, sont considérés comme atteints les patients qui ont un $QT_c$ supérieur à 440ms et/ou une morphologie du segment QT anormale.

##### I.1.1.4.2. Tachycardies ventriculaires catécholaminergiques

Dans le cas des tachycardies ventriculaires catécholaminergiques, à l'examen clinique habituel, on ajoute un holter (un enregistrement continu de l'électrocardiogramme pendant 24 heures) et test d'effort (test ergométrique permettant d'évaluer l'adaptation du système cardiovasculaire à l'effort par augmentation de celui-ci par palier).

##### I.1.1.4.3. Fibrillation auriculaire

Dans le cas de fibrillation auriculaire, à l'examen clinique habituel, on ajoute une échographie cardiaque, un holter (un enregistrement continu de l'électrocardiogramme pendant 24 heures). Pour augmenter l'exactitude de la mesure de l'onde P, nous avons réalisé un électrocardiogramme haute amplification (filtre d'analyse 40-250Hz).

Sont considérés comme atteints les patients qui ont des antécédents de fibrillations auriculaires documentées ou des salves d'extrasystoles auriculaires.

#### I.1.1.4.4. Troubles de la conduction cardiaques dégénératifs

Sont considérés comme normales les valeurs de l'intervalle PR inférieures à 210 ms, celles du QRS inférieures à 115ms et celle de l'axe QRS comprises entre – 30° et +90°.

La classification des troubles de la conduction cardiaque progressifs respecte les critères des conventions internationales[331 332].

#### I.1.1.4.5. Syndrome de Brugada

Dans le cas du syndrome de Brugada, à l'examen clinique habituel, on ajoute un électrocardiogramme 14 dérivations (12 dérivations standards + 2 dérivations hautes aux 3$^{e}$ espaces intercostaux droit et gauche), un électrocardiogramme haute amplification (filtre d'analyse 40-250Hz, niveau du bruit de fond inférieur à 0,4$\mu$V, et un test à la Flécaïne® (injection de 1mg/Kg de Flécaïne® ou d'Ajmaline® avec ECG toutes les minutes (14 dérivations) pendant 5 minutes, puis nouvelle injection à la même dose et surveillance ECG identique).

Le test à la Flécaïne® n'est réalisé qu'en l'absence de contre-indication et de modifications de l'ECG évocatrice d'un syndrome de Brugada à l'état de base. Cet examen nécessite une surveillance d'une heure en cas de test négatif et de 2 heures en cas de test positif.

On effectue aussi une exploration ventriculaire programmée si les patients sont symptomatiques ou si leur ECG de base est en faveur d'un syndrome de Brugada ou si des troubles du rythme ventriculaires soutenus sont enregistrés lors de

la surveillance monitorée. La stimulation s'effectue au niveau de l'apex du ventricule droit et de l'infundibulum pulmonaire, en rythme sinusal, puis imposé (3 cycles différents : 600ms, 500ms et 400ms), avec induction de 1, 2, 3 extrastimuli ventriculaires, intervalle minimum de 200ms.

Une dysfonction du ventricule gauche et une dysplasie arythmogène du ventricule droit ont été recherchées par échocardiographie.

### *I.1.2. Analyse de Liaison*

#### I.1.2.1. Le principe

Pour étudier les facteurs génétiques responsables de ces pathologies cardiaques, on peut utiliser plusieurs approches dont les études sur génome entier. Ces études ne nécessitent aucune hypothèse physiopathologique et sont basées sur le principe de l'analyse de liaison.

L'analyse de liaison a pour but de localiser sur le génome, le gène responsable d'une pathologie en recherchant la transmission d'un marqueur génétique avec un trait phénotypique monogénique au sein d'une famille. Cette technique utilise des marqueurs génétiques polymorphes répartis sur tout le génome[333], et dont la localisation chromosomique est précisément connue. La fréquence de recombinaison qui existe entre le marqueur génétique et le gène délétère nous permet d'estimer la distance génétique qui les sépare (Figure 82). Plus cette fréquence de recombinaison est élevée plus la distance génétique est importante et inversement.

La preuve statistique d'une liaison génétique est apportée par le calcul du Lod Score.

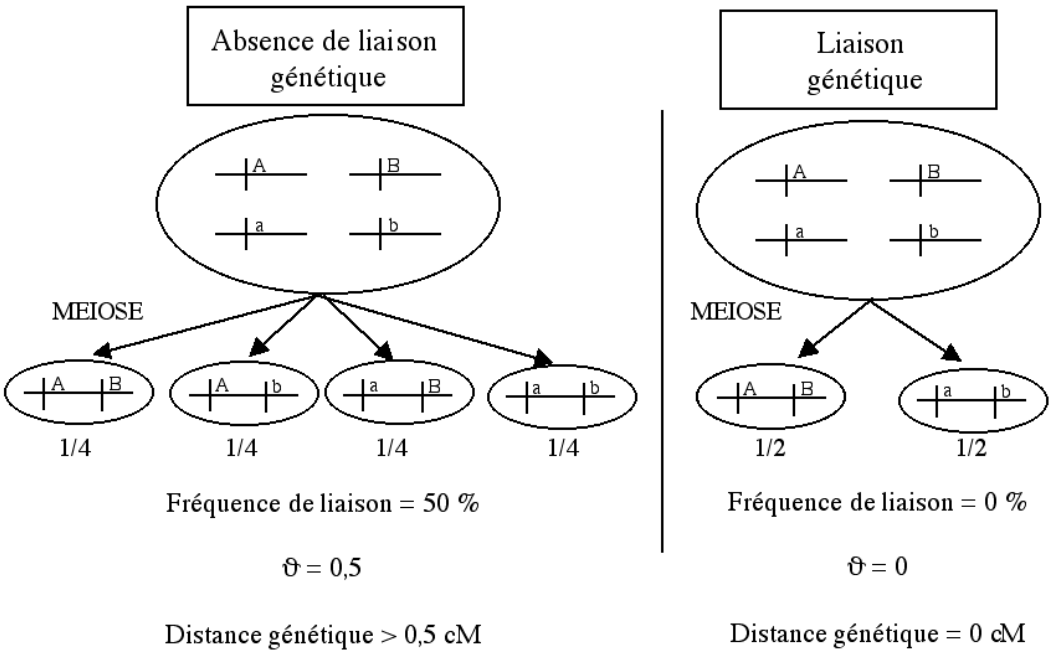



Figure 82 *: Schéma du principe de liaison génétique.*
*La liaison entre 2 locus dépend de la fréquence des recombinaisons méiotiques révélées par l'assortiment de leurs allèles sur le même chromosome.*
*(D'après JC Kaplan, biologie moléculaire et médecine)*

Soit $\theta$ la proportion de gamètes recombinés sur l'ensemble des gamètes produits. Lorsque $\theta$ est égal à 0,5, tous les types de gamètes ont la même probabilité, ce qui revient à dire que les allèles des 2 locus se transmettent de façon indépendante ou qu'ils ne sont pas liés. Plus les 2 locus sont proches plus $\theta$ est petit. Le Lod Score permet l'évaluation de ces distances génétiques. Cette méthode est basée sur un procédé de calcul statistique qui évalue le rapport de vraisemblance de 2 hypothèses opposées :

- Hypothèse I : il y a liaison et $\theta < 0,5$. La probabilité de cette hypothèse est symbolisée par $L(\theta)$.
- Hypothèse II : il n'y a pas liaison et $\theta = 0,5$. La probabilité de cette hypothèse est symbolisée par $L(\theta=0,5)$.

Le Lod Score $Z(\theta)$ en $\theta$ est le logarithme décimal du rapport de la probabilité de liaison opposée (hypothèse I) à la probabilité de non liaison (hypothèse II).

$$\text{Lod Score } Z(\theta) = \log_{10} \frac{L(\theta)}{L(\theta_{0,5})}$$

On considère un Lod Score supérieur à 3 comme une preuve de liaison statistiquement significative. Quand il est inférieur à –2 il n'y a pas de liaison génétique. Quand il est compris entre –2 et 3, on ne peut pas conclure sur l'existence d'une liaison génétique.

Il existe un certain nombre de paramètre tels que, la variabilité phénotypique et les facteurs de risque, dont on doit tenir compte lors de l'analyse.
La variabilité phénotypique se caractérise par :

- la pénétrance (la probabilité de développer la pathologie chez un sujet porteur du gène délétère). La pénétrance d'une pathologie donnée peut variée suivant l'âge et le sexe.
- l'expressivité (la variation d'expression d'une pathologie).

Quant aux facteurs de risque, il peuvent être soient d'ordre génétique, soient d'ordre environnementaux et peuvent être à l'origine de phénocopies c'est à dire de sujets présentant des signes cliniques de la pathologie mais qui ne sont pas porteurs du gène délétère.

### I.1.2.2. Méthodologie

A partir de sang veineux périphérique des patients prélevé sur tube contenant de l'EDTA, on effectue une extraction d'ADN génomique grâce au kit Nucleon (Amersham LIFE SCIENCE).
On amplifie par PCR les marqueurs génétiques grâce à des amorces spécifiques de ces derniers. Les produits de PCR sont rendus fluorescents soit par intégration de nucléotides marqués soit grâce à des amorces marquées.
Les allèles des marqueurs sont résolus sur un gel d'acrylamide (Long Ranger) à 5%. La migration est réalisée sur un séquenceur 377 ABI PRISM$^{TM}$ pendant 2h à 51°C à 124W.

Les données brutes du gel de génotypage sont analysées consécutivement par deux logiciels GENSCAN® et GENOTYPER®, pour obtenir pour chaque individu son génotype pour un marqueur génétique donné.
A partir de ces génotypes, le programme d'analyse de liaison génétique des maladies autosomiques dominantes M-LINKER calcule le LOD SCORE du marqueur génétique.

Pour la fibrillation auriculaire, nous avons effectué une analyse de liaison multipoint pour comparer la ségrégation de la pathologie et 4 marqueurs génétiques (D20S178, D20S109, D20S196 et D20S893 grâce à l'algorithme VITESSE[334 335].

## I.2. Recherche de partenaires protéiques

### *I.2.1. Double hybride*

#### I.2.1.1. Construction des plasmides utilisés pour le double hybride

Pour effectuer le crible double hybride, nous avons utilisé comme appât l'interdomaineI-II entier du canal sodique SCN5A, B1 BD-hybride (acide aminé 417 à 507, Figure 83). Puis pour déterminer plus précisément la zone d'interaction, nous réalisé des constructions contenant des fragments de l'interdomaine I-II :
- Fragment 1, F1 BD-hybride, acide aminé 417 à 507
- Fragment 2, F2 BD-hybride, acide aminé 503 à 573
- Fragment 3, F3 BD-hybride, acide aminé 559 à 633
- Fragment 4, F4 BD-hybride, acide aminé 609 à 711
- Fragment 11, F11 BD-hybride, acide aminé 417 à 466
- Fragment 12, F12 BD-hybride, acide aminé 445 à 488
- Fragment 13, F13 BD-hybride, acide aminé 467 à 507

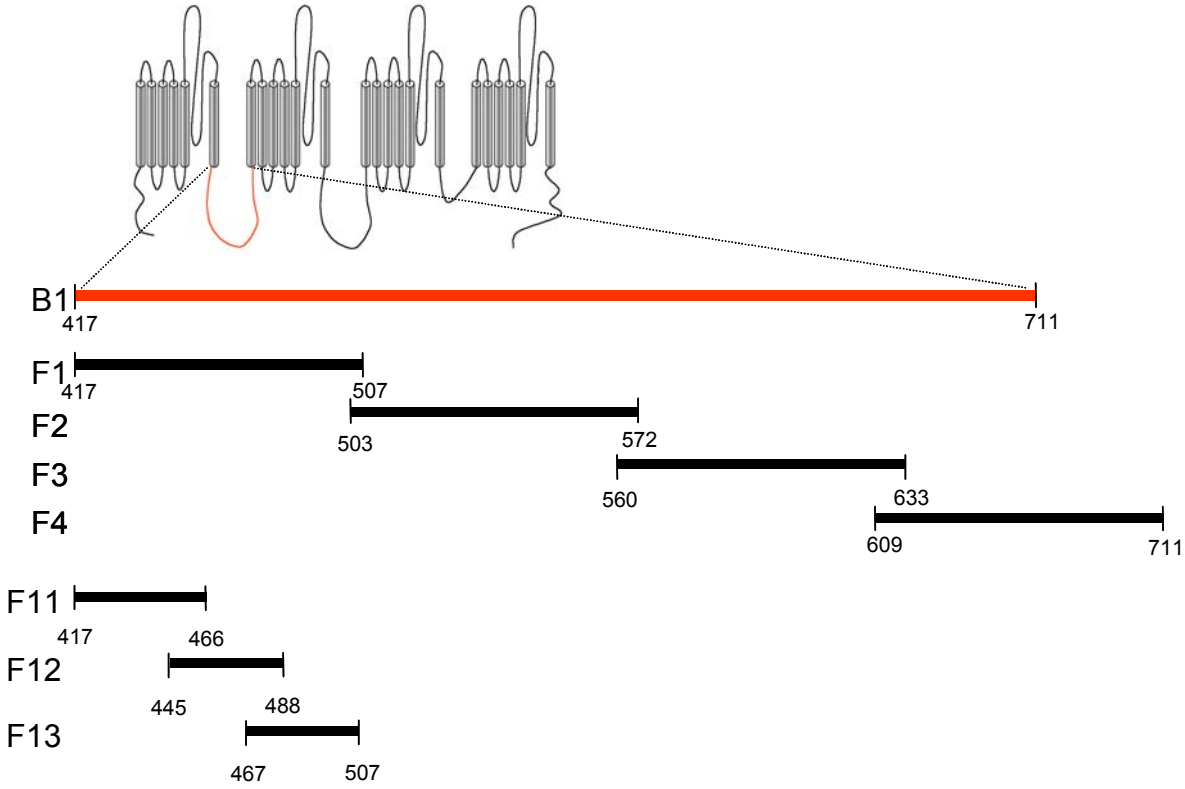



Figure *83* : *Les 8 appâts utilisés pour le double hybride.*

Les constructions ont été faites avec des produits de PCR obtenus à partir de l'ADNc de SCN5A intégré dans le plasmide SP64T[265 336]. Les amorces utilisées lors de ces PCR ont été dessinées pour contenir un site de restriction à *EcoRI* ou *SalI*. Les produits de PCR ont été insérés dans le plasmide pCR® 2.1-TOPO® en utilisant le kit TOPO® Cloning (Invitrogen) pour faciliter la digestion enzymatique. Après digestion par les enzymes de restriction *EcoRI* et *SalI*, les produits de PCR ont été insérés dans le plasmide pVJL10[337] pour créer les huit appât fusionnés avec le domaine de liaison à l'ADN BD.

La banque d'ADNc utilisée pour le crible double hybride a été réalisée à partir d'ARN poly(A) de cerveau de souris nouveau née BALB/c fusionnée au domaine d'activation de GAL4 par insertion dans le plasmide pGAD 1318[338].

Les séquences nucléotidiques codant pour les protéines entières 14-3-3 $\eta$, $\tau$ et $\zeta$ de souris ont été introduites dans le pGAD 1318 par F. Sladeczeket coll. lors d'une autre étude.

#### I.2.1.2. Crible double hybride

Après transformation avec le plasmide pVJL10 B1-SCN5A puis avec la banque de cerveau de souris selon la méthode à l'acétate de lithium[339-340], les levures sont étalées sur un milieu synthétique (milieu SD) dépourvu de tryptophane, de leucine et d'histidine. Après une incubation de 2 à 6 jours à 30°C, l'ADN plasmidique est extrait à partir des colonies obtenues, et on l'utilise pour transformer des bactéries DH5$\alpha$. Les bactéries contenant le plasmide pGAD1318 ont été sélectionnées par PCR et on en extrait l'ADN plasmidique pour co-transformer à nouveau des levures L40 avec ce plasmide et pVJL10 B1-SCN5A ou pVJL10-PCTAIRE-1[341] pour vérifier la spécificité de l'interaction des protéines.

### *I.2.2. Système d'expression transitoire*

#### I.2.2.1. Cellules et transfection

Nous avons utilisés des cellules COS-7 qui sont dérivées de fibroblastes de reins de singe vert africaine immortalisés par transformation avec SV40[342] provenant de l'American Type Culture Collection. Elles sont cultivées à 37°C dans un incubateur humidifié en présence de 5% de CO2. Tous les éléments nécessaires au développement des cellules sont contenus dans le milieu de culture DMEN (Dubelcco's Modified Eagle Medium-Gibco BRL) supplémenté en sérum de voeau foetal (10%), en L-Glutamine (2mM) et en streptomycine (100µg/ml). Ces cellules ont été transfectées transitoirement par des vecteurs en utilisant du BGTC-DOPE[343] comme agent transfectant. La transfection débute 24 heures après la tryspinisation, quand les cellules ont atteint 50% de confluence. On enlève le milieu de culture pour ajouter une solution contenant pour 100 µl de milieu de culture 4 ng de BGTC-DOPE pour 1 µg d'ADN. Après 2h d'incubation, on ajoute 1 ou 2 ml de milieu de culture en fonction de la taille des puits.

### I.2.2.2. Plasmides utilisés

Pour réaliser nos systèmes d'expression transitoire, nous avons utilisé plusieurs types de plasmides :

- le vecteur d'expression pCI, pCI-SCN5A-GFP[178], pCI 14-3-3η.
- Et le vecteur d'expression pcDNA$_3$ : pcDNA$_3$-SCN5A-GFP, pcDNA$_3$-F1, pcDNA$_3$-14-3-3η.
- le vecteur d'expression bicistronique pIRES (Clontech). Ce vecteur poosède 2 sites multiples de clonage et permettant donc l'insertion de deux ADNc et l'expression de deux protéines différentes.

Nous avons réalisé 3 constructions à partir du plasmide pIRES. Les 3 constructions possèdent SCN5A fusionné à la GFP dans le deuxième site de clonage. Les inserts 14-3-3η et F1 marqués par l'étiquette peptidique YPYDVPDYA (HA), ont été obtenus par PCR en utilisant des amorces contenant des sites de restriction. Ces inserts ont été digérés puis introduits dans le plasmide pIRES au niveau du premier site de clonage.
Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage direct.

### *I.2.3. Co-immunoprecipitation et Western Blot*

Deux jours après co-transfection transitoire avec les vecteurs d'expression pCI SCN5A-GFP et pCI 14-3-3η avec du BGTC-DOPE , les cellules COS-7 sont incubées dans 500 µl de tampon de lyse froid (150 mM NaCl, 1% IGEPAL (Sigma), 50 mM tris-HCl, pH 8.0) contenant 1 pastille d'inhibiteurs des protéases (Roche) et 1mM PMSF (phénylméthylsulfonyl fluoride, Sigma) pendant 1h à 4°C. Le même protocole a été utilisé pour les coeurs de souris sinon que, avant l'incubation à 4°C chaque coeur est broyé dans un potter en verre dans 1ml de tampon de lyse. Après centrifugation de l'extrait à 20.000 x g pendant 30 minutes, le surnageant est incubé avec 1 µl d'anti-corps monoclonal de souris anti-14-3-3 (Santa Cruz Biotechnology) ou d'anti-corps polyclonal de lapin anti-Nav1.5 (Alomone Labs) pendant 16 h à 4°C. On ajoute ensuite 15 µl de protein-G sépharose (Amersham Biosciences). Après une

incubation d'une heure à 4°C en rotation constante, les billes de sépharose sont centrifugées et lavées trois fois avec du tampon de lyse ne comprenant pas d'IGEPAL. Le culot est remis en suspension dans du tampon de Laemmli[344] puis dénaturé 5 min à 95°C et soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes. Les protéines sont détectées par Western Blot en utilisant un kit de détection ECL (Amersham Bioscience).

### *I.2.4. Immunocytochimie*

#### I.2.4.1. Immunocytochimie sur cellules COS-7

Trente six à 48 h après transfection, les cellules COS-7 cultivées sur lamelles de verre, sont lavées avec du tampon PBS (4 mM KH2PO4, 16 mM Na2HPO4, 115 mM NaCl) et rapidement fixées avec une solution de PBS contenant 3,7% de formaldéhyde. Après trois rinçages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées pendant 10 min à température ambiante avec du Triton X-100 0.2% dans du PBS. Les cellules sont ensuite équilibrées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de PBS contenant 1% de BSA. Elles sont incubées toute la nuit à 4°C avec 0.5 μg d'anti-corps polyclonal anti-HA de lapin (Clontech). Les cellules sont rincées avec du PBS puis incubées 1 h à température ambiante avec un anti-corps anti-lapin conjugué à de l'Alexa A568 dilué au 1/5000. Les lamelles sont rincées avec du PBS et montées avec du liquide montage préservant la fluorescence (Vectashield Clontech). Les observations sont réalisées avec un microscope confocale Leica TCS-SP1. L'acquisition des images est effectuée avec un logiciel de traitement d'image TCS NT (Leica).

#### I.2.4.2. Immunocytochimie sur cardiomyocytes de lapin

Le marquage des cardiomyocytes de lapin a été effectué selon la technique utilisée par Mohler et coll.[281] avec de légères modifications. Les cardiomyocytes fraichement isolés sont fixés dans l'éthanol pendant 10 minutes, puis sont rincées

avec une solution de PBS à pH 7,4 et incubées dans un  solution de blocage (PBS contenant 0.025% de Triton X-100 ; 3% de gelatine et 0.001% d'azide de sodium) pendant 3h. Les cellules sont ensuite incubées dans 1 ml de solution de saturation contenant l'anticorps primaire (soit 5µg anti-Nav1.5 (SCN5A) (Alomone Labs) et 1µg anti-14-3-3 (Santa Cruz biotechnology) ou 1 unitée Phalloïdin-Texas-Red) pendant la nuit à température ambiante. Après les différents lavages réalisés avec la solution de saturation, les cellules sont marquées avec un anticorps secondaire fluorescent (Alexa Fluor 488 et 568) pendant 1h à température ambiante. Pour réalisées les controles, les cellules ont été incubées qu'avec l'anticorps secondaire. Après les différents lavages, les lamelles sont montées et sont observées.

### *I.2.5. Electrophysiologie ou patch clamp*

La technique de patch clamp permet de mesurer, en condition de potentiel imposé, le courant engendré par le passage des ions au travers des canaux ioniques présents dans la membrane plasmique. Le patch clamp en configuration cellule entière permet l'enregistrement du courant traversant les canaux de l'ensemble de la membrane cellulaire. Le courant mesuré est donc la somme de courants unitaires et ses propriétés correspondent donc à l'intégration des propriétés des canaux.

Trente six à 48 h après la transfection, les courants sont mesurés à température ambiante grâce à la technique de patch clamp en configuration cellule entière. Le milieu contenu dans la pipette est une solution de 10 mM NaCl, 64,5 mM CsCl, 70,5 mM d'acide aspartique, 5 mM HEPES à pH 7,2 et le milieu extracellulaire utilisé pour enregistrer les courants sodiques est une solution de 145 mM de NaCl, 4 mM CsCl, 1 mM de $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, 5 mM de glucose à pH 7,4.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Voir thèse papier pour les références bibliographiques

**Approches génétiques et moléculaires des pathologies du rythme cardiaque**

Les pathologies du rythme cardiaque forment un groupe de maladies complexes et génétiquement hétérogènes. Depuis 1995, plusieurs gènes codant essentiellement pour des canaux ioniques ont été identifiés, mais leur physiopathologie reste mal connue.

À partir de plusieurs grandes familles atteintes d'un syndrome de Brugada ou de fibrillation auriculaire non liés à aucun gène connu, j'ai identifié 2 nouveaux locus qui devraient permettre de mieux comprendre la physiopathologie de ces troubles du rythme. Des approches similaires, menées sur 2 familles présentant des formes atypiques de syndrome du QT long congénital associé à un syndrome de Marfan ou de tachycardies ventriculaires catécholergiques, m'ont permis d'identifier la mutation causale respectivement dans les gènes *KCNH2* et *RyR2*.

Les troubles de la conduction cardiaque dégénératifs ainsi que le syndrome de Brugada ont été associés à des mutations dans le gène *SCN5A*. Toutefois, l'hétérogénéité phénotypique, ainsi que la faible pénétrance du syndrome de Brugada ou encore l'âge tardif d'apparition des troubles de conduction complique les analyses génétiques. J'ai identifié par la technique du double hybride un nouveau partenaire de SCN5A : la protéine 14-3-3. Il s'agit d'une protéine chaperone qui, en interagissant directement avec SCN5A, module sa sensibilité au voltage. Une caractérisation exhaustive des partenaires des principaux canaux ioniques cardiaques associés à une approche de génétique moléculaire devrait permettre, dans un avenir proche de mieux cerner la physiopathologie des maladies du rythme cardiaque.

**Molecular genetics of cardiac arrhythmias**

Life-threatening cardiac arrhythmias represent a clinically and genetically heterogenous group of disorders. Since 1995, several genes encoding mostly ionic channels have been identified but their pathophysiology remains poorly understood.

Starting from several families affected by either Brugada syndrome or atrial fibrillation, I have identified, using a linkage analysis approach, two new loci for these diseases. A similar approach performed on 2 families diagnosed with long QT syndrome associated with Marfan syndrome or atypical ventricular catecholaminergic tachycardia, allowed the identification of the disease mutation respectively in *KCNH2* and *RyR2* genes.

Phenotypical heterogeneity combined with low penetrance in Brugada syndrome or with late onset of the disease in progressive cardiac conduction defect challenges classical familial-based linkage analysis. Since these two pathologies have been associated with mutations in *SCN5A* gene, we speculate that proteins associated with cardiac sodium channel are good candidates for these conditions. Using a two hybrid screening approach, I identified the 14-3-3 protein as a new SCN5A cytosolic partner. 14-3-3 is known to act as a chaperon and preliminary results indicate that its interaction with SCN5A alters the voltage-sensitivity of the Na+ channel. Molecular screening of this new partner but also the still non-identified proteins should allow a better understanding and handling of cardiac arrhythmias.

Mots-clés:

Syndrome du QT long ; tachycardies ventriculaires catécholergiques ; fibrillation auriculaire ; syndrome de Brugada ; troubles de la conduction cardiaque ; canal sodique cardiaque SCN5A ; 14-3-3.

[1] Boyett,M.R., Honjo,H., et Kodama,I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular Research,* 47, 658-687.

[2] Nabauer,M., Beuckelmann,D.J., Uberfuhr,P., et Steinbeck,G. (1996). Regional Differences in Current Density and Rate-Dependent Properties of the Transient Outward Current in Subepicardial and Subendocardial Myocytes of Human Left Ventricle. *Circulation,* 93, 168-177.

[3] Fabiato,A. (1985). Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol,* 85, 291-320.

[4] Luo,C.H. et Rudy,Y. (1994). A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ. Res.,* 74, 1071-1096.

[5] Gros,D.B. et Jongsma,H.J. (1996). Connexins in mammalian heart function. *Bioessays,* 18, 719-730.

[6] Goodenough,D.A., Goliger,J.A., et Paul,D.L. (1996). Connexins, Connexons, and Intercellular Communication. *Annual Review of Biochemistry,* 65, 475-502.

[7] Saffitz J. E., Laing J. G., et Yamada K. A. (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ.Res.* 86, 723-728.

[8] Rohr,S. (2004). Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovasc. Res.,* 62, 309-322.

[9] Lo,C.W. (2000). Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ Res,* 87, 346-348.

[10] Priori,S.G., Barhanin,J., Hauer,R.N.W., Haverkamp,W., Jongsma,H.J., Kleber,A.G., McKenna,W.J., Roden,D.M., Rudy,Y., Schwartz,K., Schwartz,P.J., Towbin,J.A., et Wilde,A. (1999). Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: Impact on clinical management. *Eur Heart J,* 20, 174-195.

[11] Jervell,A. et Lange-Nielsen,F. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am. Heart J,* 54, 59-68.

[12] Romano,C. (1965). Congenital Cardiac Arrhythmia. *Lancet,* 17, 658-659.

[13] Ward OC. (1964). New familial cardiac syndrome in children. *J. Irish Med. Assoc*., 54, 103-106.

[14] Donger,C., Denjoy,I., Berthet,M., Neyroud,N., Cruaud,C., Bennaceur,M., Chivoret,G., Schwartz,K., Coumel,P., et Guicheney,P. (1997). KVLQT1 C-Terminal Missense Mutation Causes a Forme Fruste Long-QT Syndrome. *Circulation,* 96, 2778-2781.

[15] Moss,A.J. et Robinson,J.L. (1992). Clinical aspects of the idiopathic long QT syndrome. *Ann. N Y. Acad. Sci,* 644, 103-111.

[16] Keating,M., Atkinson,D., Dunn,C., Timothy,K., Vincent,G.M., et Leppert,M. (1991). Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science,* 252, 704-706.

[17] Wang,Q., Curran,M.E., Splawski,I., Burn,T.C., Millholland,J.M., VanRaay,T.J., Shen,J., Timothy,K.W., Vincent,G.M., de Jager,T., Schwartz,P.J., Toubin,J.A., Moss,A.J., Atkinson,D.L., Landes,G.M., Connors,T.D., et Keating,M.T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.,* 12, 17-23.

[18] Jiang,C., Atkinson,D., Towbin,J.A., Splawski,I., Lehmann,M.H., Li,H., Timothy,K., Taggart,R.T., Schwartz,P.J., Vincent,G.M., et . (1994). Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat. Genet.,* 8, 141-147.

[19] Curran,M.E., Splawski,I., Timothy,K.W., Vincent,G.M., Green,E.D., et Keating,M.T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell,* 80, 795-803.

[20] Wang,Q., Shen,J., Splawski,I., Atkinson,D., Li,Z., Robinson,J.L., Moss,A.J., Towbin,J.A., et Keating,M.T. (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell,* 80, 805-811.

[21] Schott,J.J., Charpentier,F., Peltier,S., Foley,P., Drouin,E., Bouhour,J.B., Donnelly,P., Vergnaud,G., Bachner,L., Moisan,J.P., Le Marec,H., et Pascal,O. (1995). Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am. J Hum. Genet.,* 57, 1114-1122.

[22] 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., et Bennett,V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature,* 421, 634-639.

[23] Splawski,I., Tristani-Firouzi,M., Lehmann,M.H., Sanguinetti,M.C., et Keating,M.T. (1997). Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat. Genet.,* 17, 338-340.

[24] Schulze-Bahr,E., Wang,Q., Wedekind,H., Haverkamp,W., Chen,Q., Sun,Y., Rubie,C., Hordt,M., Towbin,J.A., Borggrefe,M., Assmann,G., Qu,X., Somberg,J.C., Breithardt,G., Oberti,C., et Funke,H. (1997). KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat. Genet.,* 17, 267-268.

[25] Tyson,J., Tranebjaerg,L., Bellman,S., Wren,C., Taylor,J.F., Bathen,J., Aslaksen,B., Sorland,S.J., Lund,O., Malcolm,S., Pembrey,M., Bhattacharya,S., et Bitner-Glindzicz,M. (1997). IsK and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Hum. Mol. Genet.,* 6, 2179-2185.

[26] Abbott,G.W., Sesti,F., Splawski,I., Buck,M.E., Lehmann,M.H., Timothy,K.W., Keating,M.T., et Goldstein,S.A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell,* 97, 175-187.

[27] Plaster,N.M., Tawil,R., Tristani-Firouzi,M., Canun,S., Bendahhou,S., Tsunoda,A., Donaldson,M.R., Iannaccone,S.T., Brunt,E., Barohn,R., Clark,J., Deymeer,F., George,A.L., Jr., Fish,F.A., Hahn,A., Nitu,A., Ozdemir,C., Serdaroglu,P., Subramony,S.H., Wolfe,G., Fu,Y.H., et Ptacek,L.J. (2001). Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell,* 105, 511-519.

[28] Tristani-Firouzi,M., Jensen,J.L., Donaldson,M.R., Sansone,V., Meola,G., Hahn,A., Bendahhou,S., Kwiecinski,H., Fidzianska,A., Plaster,N., Fu,Y.H., Ptacek,L.J., et Tawil,R. (2002). Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin. Invest,* 110, 381-388.

[29] Splawski,I., Timothy,K.W., Sharpe,L.M., Decher,N., Kumar,P., Bloise,R., Napolitano,C., Schwartz,P.J., Joseph,R.M., Condouris,K., Tager-Flusberg,H., Priori,S.G., Sanguinetti,M.C., et Keating,M.T. (2004). Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell,* 119, 19-31.

[30] Splawski,I., Shen,J., Timothy,K.W., Lehmann,M.H., Priori,S., Robinson,J.L., Moss,A.J., Schwartz,P.J., Towbin,J.A., Vincent,G.M., et Keating,M.T. (2000). Spectrum of Mutations in Long-QT Syndrome Genes : KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation,* 102, 1178-1185.

[31] Schwartz,P.J., Priori,S.G., Spazzolini,C., Moss,A.J., Vincent,G.M., Napolitano,C., Denjoy,I., Guicheney,P., Breithardt,G., Keating,M.T., Towbin,J.A., Beggs,A.H., Brink,P., Wilde,A.A.M., Toivonen,L., Zareba,W., Robinson,J.L., Timothy,K.W., Corfield,V., Wattanasirichaigoon,D., Corbett,C., Haverkamp,W., Schulze-Bahr,E., Lehmann,M.H., Schwartz,K., Coumel,P., et Bloise,R. (2001). Genotype-Phenotype Correlation in the Long-QT Syndrome : Gene-Specific Triggers for Life-Threatening Arrhythmias. *Circulation,* 103**,** 89-95.

[32] Barhanin,J., Lesage,F., Guillemare,E., Fink,M., Lazdunski,M., et Romey,G. (1996). K(V)LQT1 and lsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature,* 384, 78-80.

[33] Towbin JA. (2001). Molecular genetic basis of sudden cardiac death. *Cardiovasc. Pathol.,*10, 283-295.

[34] Dumaine,R. et Antzelevitch,C. (2002). Molecular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.,* 17, 36-42.

[35] Wollnik,B., Schroeder,B.C., Kubisch,C., Esperer,H.D., Wieacker,P., et Jentsch,T.J. (1997). Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K+ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Hum. Mol. Genet.,* 6, 1943-1949.

[36] Sesti,F. et Goldstein,S.A.N. (1998). Single-Channel Characteristics of Wild-Type IKs Channels and Channels formed with Two MinK Mutants that Cause Long QT Syndrome. *J. Gen. Physiol.,* 112, 651-663.

[37] Bianchi,L., Shen,Z., Dennis,A.T., Priori,S.G., Napolitano,C., Ronchetti,E., Bryskin,R., Schwartz,P.J., et Brown,A.M. (1999). Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome. *Hum. Mol. Genet.,* 8, 1499-1507.

[38] Duggal,P., Vesely,M.R., Wattanasirichaigoon,D., Villafane,J., Kaushik,V., et Beggs,A.H. (1998). Mutation of the Gene for IsK Associated With Both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward Forms of Long-QT Syndrome. *Circulation,* 97, 142-146.

[39] Sanguinetti,M.C., Jiang,C., Curran,M.E., et Keating,M.T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell,* 81, 299-307.

[40] Clancy,C.E. et Rudy,Y. (2001). Cellular consequences of HERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death. *Cardiovasc. Res.,* 50, 301-313.

[41] Sanguinetti,M.C. et Xu,Q.P. (1999). Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in Xenopus oocytes. *J Physiol (Lond),* 514, 667-675.

[42] Sanguinetti,M.C., Curran,M.E., Spector,P.S., et Keating,M.T. (1996). Spectrum of HERG K+-channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *PNAS,* 93, 2208-2212.

[43] Kagan,A., Yu,Z., Fishman,G.I., et McDonald,T.V. (2000). The Dominant Negative LQT2 Mutation A561V Reduces Wild-type HERG Expression. *J. Biol. Chem.,* 275, 11241-11248.

[44] Hayashi,K., Shimizu,M., Ino,H., Yamaguchi,M., Mabuchi,H., Hoshi,N., et Higashida,H. (2002). Characterization of a novel missense mutation E637K in the pore-S6 loop of HERG in a patient with long QT syndrome. *Cardiovasc. Res.,* 54, 67-76.

[45] Furutani,M., Trudeau,M.C., Hagiwara,N., Seki,A., Gong,Q., Zhou,Z., Imamura,S.i., Nagashima,H., Kasanuki,H., Takao,A., Momma,K., January,C.T., Robertson,G.A., et Matsuoka,R. (1999). Novel Mechanism Associated With an Inherited Cardiac Arrhythmia : Defective Protein Trafficking by the Mutant HERG (G601S) Potassium Channel. *Circulation,* 99, 2290-2294.

[46] Zhou,Z., Gong,Q., Epstein,M.L., et January,C.T. (1998). HERG Channel Dysfunction in Human Long QT Syndrome. Intracellular Transport and Functional Defects. *J. Biol. Chem.,* 273, 21061-21066.

[47] Lees-Miller,J.P., Duan,Y., Teng,G.Q., Thorstad,K., et Duff,H.J. (2000). Novel Gain-of-Function Mechanism in K+ Channel-Related Long-QT Syndrome: : Altered Gating and Selectivity in the HERG1 N629D Mutant. *Circ Res,* 86, 507-513.

[48] McDonald,T.V., Yu,Z., Ming,Z., Palma,E., Meyers,M.B., Wang,K.W., Goldstein,S.A.N., et Fishman,G.I. (1997). A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current IKr. *Nature,* 388, 289-292.

[49] Isbrandt,D., Friederich,P., Solth,A., Haverkamp,W., Ebneth,A., Borggrefe,M., Funke,H., Sauter,K., Breithardt,G., Pongs,O., et Schulze-Bahr,E. (2002). Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *Journal of Molecular Medicine,* 80, 524-532.

[50] Tinel,N., Diochot,S., Borsotto,M., Lazdunski,M., et Barhanin,J. (2000). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J,* 19, 6326-6330.

[51] Wei,J., Wang,D.W., Alings,M., Fish,F., Wathen,M., Roden,D.M., et George,A.L., Jr. (1999). Congenital Long-QT Syndrome Caused by a Novel Mutation in a Conserved Acidic Domain of the Cardiac Na+ Channel. *Circulation,* 99, 3165-3171.

[52] Wang,D., Yazawa,K., George,A., et Bennett,P. (1996). Characterization of human cardiac Na+ channel mutations in the congenital long QTásyndrome. *PNAS,* 93, 13200-13205.

[53] Dumaine,R., Wang,Q., Keating,M.T., Hartmann,H.A., Schwartz,P.J., Brown,A.M., et Kirsch,G.E. (1996). Multiple Mechanisms of Na+ Channelû Linked Long-QT Syndrome. *Circ Res,* 78, 916-924.

[54] Clancy,C.E. et Rudy,Y. (1999). Linking a genetic defect to its cellular phenotype in a cardiac arrhythmia. *Nature,* 400, 566-569.

[55] Tian,X.L., Yong,S.L., Wan,X., Wu,L., Chung,M.K., Tchou,P.J., Rosenbaum,D.S., Van Wagoner,D.R., Kirsch,G.E., et Wang,Q. (2004). Mechanisms by which SCN5A mutation N1325S causes cardiac arrhythmias and sudden death in vivo. *Cardiovasc. Res,* **61,** 256-267.

[56] Makita,N., Shirai,N., Nagashima,M., Matsuoka,R., Yamada,Y., Tohse,N., et Kitabatake,A. (1998). A de novo missense mutation of human cardiac Na+ channel exhibiting novel molecular mechanisms of long QT syndrome. *FEBS Lett.,* 423, 5-9.

[57] An,R.H., Wang,X.L., Kerem,B., Benhorin,J., Medina,A., Goldmit,M., et Kass,R.S. (1998). Novel LQT-3 Mutation Affects Na+ Channel Activity Through Interactions Between α and β1-Subunits. *Circ Res,* 83, 141-146.

[58] Luo,C.H. et Rudy,Y. (1994). A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ. Res.,* 74, 1071-1096.

[59] Wehrens,X.H.T., Abriel,H., Cabo,C., Benhorin,J., et Kass,R.S. (2000). Arrhythmogenic Mechanism of an LQT-3 Mutation of the Human Heart Na+ Channel {alpha}-Subunit : A Computational Analysis. *Circulation,* 102, 584-590.

[60] Abriel,H., Cabo,C., Wehrens,X.H.T., Rivolta,I., Motoike,H.K., Memmi,M., Napolitano,C., Priori,S.G., et Kass,R.S. (2001). Novel Arrhythmogenic Mechanism Revealed by a Long-QT Syndrome Mutation in the Cardiac Na+ Channel. *Circ Res,* 88, 740-745.

[61] Rivolta,I., Clancy,C.E., Tateyama,M., Liu,H., Priori,S.G., et Kass,R.S. (2002). A novel SCN5A mutation associated with long QT-3: altered inactivation kinetics and channel dysfunction. *Physiol. Genomics,* 10, 191-197.

[62] Bennett,V. et Baines,A.J. (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev.,* 81, 1353-1392.

[63] Bennett,V. et Chen,L. (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr. Opin. Cell Biol.,* 13, 61-67.

[64] Scotland,P., Zhou,D., Benveniste,H., et Bennett,V. (1998). Nervous System Defects of AnkyrinB (-/-) Mice Suggest Functional Overlap between the Cell Adhesion Molecule L1 and 440-kD AnkyrinB in Premyelinated Axons. *J. Cell Biol.,* 143, 1305-1315.

[65] Tuvia,S., Buhusi,M., Davis,L., Reedy,M., et Bennett,V. (1999). Ankyrin-B Is Required for Intracellular Sorting of Structurally Diverse Ca2+ Homeostasis Proteins. *J. Cell Biol.,* 147, 995-1008.

[66] Chauhan,V.S., Tuvia,S., Buhusi,M., Bennett,V., et Grant,A.O. (2000). Abnormal Cardiac Na+ Channel Properties and QT Heart Rate Adaptation in Neonatal AnkyrinB Knockout Mice. *Circ Res,* 86, 441-447.

[67] Mohler,P.J., Splawski,I., Napolitano,C., Bottelli,G., Sharpe,L., Timothy,K., Priori,S.G., Keating,M.T., et Bennett,V. (2004). A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *PNAS,* 101, 9137-9142.

[68] Canun,S., Perez,N., et Beirana,L.G. (1999). Andersen syndrome autosomal dominant in three generations. *Am. J Med Genet.,* 85, 147-156.

[69] Sansone,V., Griggs,R.C., Meola,G., Ptacek,L.J., Barohn,R., Iannaccone,S., Bryan,W., Baker,N., Janas,S.J., Scott,W., Ririe,D., et Tawil,R. (1997). Andersen's syndrome: a distinct periodic paralysis. *Ann. Neurol.,* 42, 305-312.

[70] Donaldson,M.R., Jensen,J.L., Tristani-Firouzi,M., Tawil,R., Bendahhou,S., Suarez,W.A., Cobo,A.M., Poza,J.J., Behr,E., Wagstaff,J., Szepetowski,P., Pereira,S., Mozaffar,T., Escolar,D.M., Fu,Y.H., et Ptacek,L.J. (2003). PIP2 binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology,* 60, 1811-1816.

[71] Tristani-Firouzi,M., Jensen,J.L., Donaldson,M.R., Sansone,V., Meola,G., Hahn,A., Bendahhou,S., Kwiecinski,H., Fidzianska,A., Plaster,N., Fu,Y.H., Ptacek,L.J., et Tawil,R. (2002). Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin. Invest,* 110, 381-388.

[72] Preisig-Muller,R., Schlichthorl,G., Goerge,T., Heinen,S., Bruggemann,A., Rajan,S., Derst,C., Veh,R.W., et Daut,J. (2002). Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *PNAS,* 99, 7774-7779.

[73] Fodstad,H., Swan,H., Auberson,M., Gautschi,I., Loffing,J., Schild,L., et Kontula,K. (2004). Loss-of-function mutations of the K+ channel gene KCNJ2 constitute a rare cause of long QT syndrome. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology,* 37, 593-602.

[74] Lopes,C.M., Zhang,H., Rohacs,T., Jin,T., Yang,J., et Logothetis,D.E. (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron,* 34, 933-944.

[75] Bendahhou,S., Donaldson,M.R., Plaster,N.M., Tristani-Firouzi,M., Fu,Y.H., et Ptacek,L.J. (2003). Defective Potassium Channel Kir2.1 Trafficking Underlies Andersen-Tawil Syndrome. *J. Biol. Chem.,* 278, 51779-51785.

[76] Priori,S.G., Pandit,S.V., Rivolta,I., Berenfeld,O., Ronchetti,E., Dhamoon,A., Napolitano,C., Anumonwo,J., di Barletta,M.R., Gudapakkam,S., Bosi,G., Stramba-Badiale,M., et Jalife,J. (2005). A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res,* 96, 800-807.

[77] Marks,M.L., Whisler,S.L., Clericuzio,C., et Keating,M. (1995). A new form of long QT syndrome associated with syndactyly. *J Am. Coll. Cardiol.,* 25, 59-64.

[78] Jondeau,G., Boileau,C., Chevallier,B., Delorme,G., Digne,F., Guiti,C., Milleron,O., de SaintJean,M., Le Parc,J.M., et Moura,B. (2003). Syndrome de Marfan. *Arch Mal Coeur Vaiss.,* 96, 1081-1088.

[79] Beighton P., de Paepe A., Danks D., Finidori G., Gedde-Dahl T., Goodman R., Hall J. G., Hollister D. W., Horton W., McKusick V. A., et . International Nosology of Heritable Disorders of Connective Tissue, Berlin, 1986. (1988). *Am.J.Med.Genet.* 29, 581-594.

[80] Dietz,H.C., Cutting,G.R., Pyeritz,R.E., Maslen,C.L., Sakai,L.Y., Corson,G.M., Puffenberger,E.G., Hamosh,A., Nanthakumar,E.J., Curristin,S.M., et . (1991). Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature,* 352, 337-339.

[81] Kainulainen K., Pulkkinen L., Savolainen A., Kaitila I., et Peltonen L. (1990) .Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome. *N.Engl.J.Med.* 323, 935-939.

[82] Dietz H. C., Pyeritz R. E., Hall B. D., Cadle R. G., Hamosh A., Schwartz J., Meyers D. A., et Francomano C. A. (1991). The Marfan syndrome locus: confirmation of assignment to chromosome 15 and identification of tightly linked markers at 15q15-q21.3. *Genomics* 9, 355-361.

[83] Mizuguchi T., Collod-Beroud G., Akiyama T., Abifadel M., Harada N., Morisaki T., Allard D., Varret M., Claustres M., Morisaki H., Ihara M., Kinoshita A., Yoshiura K., Junien C., Kajii T., Jondeau G., Ohta T., Kishino T., Furukawa Y., Nakamura Y., Niikawa N., Boileau C., et Matsumoto N. (2004). Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat.Genet.* 36,855-860.

[84] Collod G., Babron M. C., Jondeau G., Coulon M., Weissenbach J., Dubourg O., Bourdarias J. P., Bonaiti-Pellie C., Junien C., et Boileau C. (1994). A second locus for Marfan syndrome maps to chromosome 3p24.2-p25. *Nat.Genet.* 8, 264-268.

[85] Lee B., Godfrey M., Vitale E., Hori H., Mattei M. G., Sarfarazi M., Tsipouras P., Ramirez F., et Hollister D. W. (1991) .Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature* 352, 330-334.

[86] Rashba,E.J., Zareba,W., Moss,A.J., Hall,W.J., Robinson,J., Locati,E.H., Schwartz,P.J., et Andrews,M. (1998). Influence of Pregnancy on the Risk for Cardiac Events in Patients With Hereditary Long QT Syndrome. *Circulation,* 97, 451-456.

[87] Leenhardt,A., Lucet,V., Denjoy,I., Grau,F., Ngoc,D.D., et Coumel,P. (1995). Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Children : A 7-Year Follow-up of 21 Patients. *Circulation,* 91, 1512-1519.

[88] Tester,D.J., Spoon,D.B., Valdivia,H.H., Makielski,J.C., et Ackerman,M.J. (2004). Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases. *Mayo Clin. Proc.,* 79, 1380-1384.

[89] Swan,H., Piippo,K., Viitasalo,M., Heikkila,P., Paavonen,T., Kainulainen,K., Kere,J., Keto,P., Kontula,K., et Toivonen,L. (1999). Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *Journal of the American College of Cardiology,* 34, 2035-2042.

[90] Laitinen,P.J., Brown,K.M., Piippo,K., Swan,H., Devaney,J.M., Brahmbhatt,B., Donarum,E.A., Marino,M., Tiso,N., Viitasalo,M., Toivonen,L., Stephan,D.A., et Kontula,K. (2001). Mutations of the Cardiac Ryanodine Receptor (RyR2) Gene in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation,* 103, 485-490.

[91] Lahat,H., Pras,E., Olender,T., Avidan,N., Ben Asher,E., Man,O., Levy-Nissenbaum,E., Khoury,A., Lorber,A., Goldman,B., Lancet,D., et Eldar,M. (2001). A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am. J Hum. Genet.,* 69, 1378-1384.

[92] Tunwell,R.E., Wickenden,C., Bertrand,B.M., Shevchenko,V.I., Walsh,M.B., Allen,P.D., et Lai,F.A. (1996). The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. *Biochem. J,* 318 ( Pt 2), 477-487.

[93] Otsu,K., Willard,H.F., Khanna,V.K., Zorzato,F., Green,N.M., et MacLennan,D.H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca2+ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.,* 265, 13472-13483.

[94] Lehnart,S.E., Wehrens,X.H.T., Laitinen,P.J., Reiken,S.R., Deng,S.X., Cheng,Z., Landry,D.W., Kontula,K., Swan,H., et Marks,A.R. (2004). Sudden Death in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia Associated With Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Leak. *Circulation,* 109, 3208-3214.

[95] Priori,S.G., Napolitano,C., Tiso,N., Memmi,M., Vignati,G., Bloise,R., Sorrentino,V., et Danieli,G.A. (2001). Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene (hRyR2) Underlie Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation,* 103, 196-200.

[96] Marks,A.R. (2001). Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol. Cell Cardiol.,* 33, 615-624.

[97] Wehrens,X.H.T., Lehnart,S.E., Huang,F., Vest,J.A., Reiken,S.R., Mohler,P.J., Sun,J., Guatimosim,S., Song,L.S., et Rosemblit,N. (2003). FKBP12.6 Deficiency and Defective Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Function Linked to Exercise-Induced Sudden Cardiac Death. *Cell,* 113, 829-840.

[98] Wehrens,X.H.T., Lehnart,S.E., Reiken,S.R., Deng,S.X., Vest,J.A., Cervantes,D., Coromilas,J., Landry,D.W., et Marks,A.R. (2004). Protection from Cardiac Arrhythmia Through Ryanodine Receptor-Stabilizing Protein Calstabin2. *Science,* 304, 292-296.

[99] George,C.H., Higgs,G.V., et Lai,F.A. (2003). Ryanodine Receptor Mutations Associated With Stress-Induced Ventricular Tachycardia Mediate Increased Calcium Release in Stimulated Cardiomyocytes. *Circ Res,* 93, 531-540.

[100] Jiang,D., Xiao,B., Zhang,L., et Chen,S.R.W. (2002). Enhanced Basal Activity of a Cardiac Ca2+ Release Channel (Ryanodine Receptor) Mutant Associated With Ventricular Tachycardia and Sudden Death. *Circ Res,* 91, 218-225.

[101] Thomas,L.N., George,C.H., et Lai,F.A. (2004). Functional heterogeneity of ryanodine receptor mutations associated with sudden cardiac death. *Cardiovasc. Res,* 64, 52-60.

[102] Tiso,N., Stephan,D.A., Nava,A., Bagattin,A., Devaney,J.M., Stanchi,F., Larderet,G., Brahmbhatt,B., Brown,K., Bauce,B., Muriago,M., Basso,C., Thiene,G., Danieli,G.A., et Rampazzo,A. (2001). Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum. Mol. Genet.,* 10, 189-194.

[103] Rampazzo,A., Nava,A., Erne,P., Eberhard,M., Vian,E., Slomp,P., Tiso,N., Thiene,G., et Danieli,G.A. (1995). A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43. *Hum. Mol. Genet.,* 4, 2151-2154.

[104] Bauce,B., Nava,A., Rampazzo,A., Daliento,L., Muriago,M., Basso,C., Thiene,G., et Danieli,G.A. (2000). Familial effort polymorphic ventricular arrhythmias in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy map to chromosome 1q42-43. *Am. J Cardiol.,* 85, 573-579.

[105] Bauce,B., Rampazzo,A., Basso,C., Bagattin,A., Daliento,L., Tiso,N., Turrini,P., Thiene,G., Danieli,G.A., et Nava,A. (2002). Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death: Early diagnosis of asymptomatic carriers. *Journal of the American College of Cardiology,* 40, 341-349.

[106] Lahat,H., Eldar,M., Levy-Nissenbaum,E., Bahan,T., Friedman,E., Khoury,A., Lorber,A., Kastner,D.L., Goldman,B., et Pras,E. (2001). Autosomal Recessive Catecholamine- or Exercise-Induced Polymorphic Ventricular Tachycardia : Clinical Features and Assignment of the Disease Gene to Chromosome 1p13-21. *Circulation,* 103, 2822-2827.

[107] Postma,A.V., Denjoy,I., Hoorntje,T.M., Lupoglazoff,J.M., Da Costa,A., Sebillon,P., Mannens,M.M.A.M., Wilde,A.A.M., et Guicheney,P. (2002). Absence of Calsequestrin 2 Causes Severe Forms of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ Res,* 91, 21e-226.

[108] Wang,S., Trumble,W.R., Liao,H., Wesson,C.R., Dunker,A.K., et Kang,C.H. (1998). Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat. Struct. Biol.,* 5, 476-483.

[109] Viatchenko-Karpinski,S., Terentyev,D., Gyorke,I., Terentyeva,R., Volpe,P., Priori,S.G., Napolitano,C., Nori,A., Williams,S.C., et Gyorke,S. (2004). Abnormal Calcium Signaling and Sudden Cardiac Death Associated With Mutation of Calsequestrin. *Circ Res,* 94, 471-477.

[110] Terentyev,D., Viatchenko-Karpinski,S., Gyorke,I., Volpe,P., Williams,S.C., et Gyorke,S. (2003). Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *PNAS,* 100, 11759-11764.

[111] Laitinen P. J., Swan H., et Kontula K. (2003). Molecular genetics of exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia: identification of three novel cardiac ryanodine receptor mutations and two common calsequestrin 2 amino-acid polymorphisms. *Eur.J.Hum.Genet.* 11, 888-891.

[112] Nattel,S. (2002). New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature,* 415, 219-226.

[113] Chugh,S.S., Blackshear,J.L., Shen,W.K., Hammill,S.C., et Gersh,B.J. (2001). Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J Am. Coll. Cardiol.,* 37, 371-378.

[114] Brugada,R., Tapscott,T., Czernuszewicz,G.Z., Marian,A.J., Iglesias,A., Mont,L., Brugada,J., Girona,J., Domingo,A., Bachinski,L.L., et Roberts,R. (1997). Identification of a Genetic Locus for Familial Atrial Fibrillation. *N Engl J Med,* 336, 905-911.

[115] Ellinor,P.T., Shin,J.T., Moore,R.K., Yoerger,D.M., et MacRae,C.A. (2003). Locus for Atrial Fibrillation Maps to Chromosome 6q14-16. *Circulation,* 107, 2880-2883.

[116] Chen,Y.H., Xu,S.J., Bendahhou,S., Wang,X.L., Wang,Y., Xu,W.Y., Jin,H.W., Sun,H., Su,X.Y., Zhuang,Q.N., Yang,Y.Q., Li,Y.B., Liu,Y., Xu,H.J., Li,X.F., Ma,N., Mou,C.P., Chen,Z., Barhanin,J., et Huang,W. (2003). KCNQ1 Gain-of-Function Mutation in Familial Atrial Fibrillation. *Science,* 299, 251-254.

[117] Lai,L.P., Su,M.J., Yeh,H.M., Lin,J.L., Chiang,F.T., Hwang,J.J., Hsu,K.L., Tseng,C.D., Lien,W.P., Tseng,Y.Z., et Huang,S.K. (2002). Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am. Heart J.,* 144, 485-490.

[118] Yang,Y., Xia,M., Jin,Q., Bendahhou,S., Shi,J., Chen,Y., Liang,B., Lin,J., Liu,Y., Liu,B., Zhou,Q., Zhang,D., Wang,R., Ma,N., Su,X., Niu,K., Pei,Y., Xu,W., Chen,Z., Wan,H., Cui,J., Barhanin,J., et Chen,Y. (2004). Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am. J Hum. Genet.,* 75, 899-905.

[119] Oberti,C., Wang,L., Li,L., Dong,J., Rao,S., Du,W., et Wang,Q. (2004). Genome-Wide Linkage Scan Identifies a Novel Genetic Locus on Chromosome 5p13 for Neonatal Atrial Fibrillation Associated With Sudden Death and Variable Cardiomyopathy. *Circulation,* 110, 3753-3759.

[120] Olson,T.M. et Keating,M.T. (1996). Mapping a Cardiomyopathy Locus to Chromosome 3p22-p25. *J. Clin. Invest.,* 97, 528-532.

[121] McNair,W.P., Ku,L., Taylor,M.R.G., Fain,P.R., Dao,D., Wolfel,E., Mestroni,L., et the Familial Cardiomyopathy Registry Research Group (2004). SCN5A Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy, Conduction Disorder, and Arrhythmia. *Circulation,* 110, 2163-2167.

[122] Olson,T.M., Michels,V.V., Ballew,J.D., Reyna,S.P., Karst,M.L., Herron,K.J., Horton,S.C., Rodeheffer,R.J., et Anderson,J.L. (2005). Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA,* 293, 447-454.

[123] Yu,H., Wu,J., Potapova,I., Wymore,R.T., Holmes,B., Zuckerman,J., Pan,Z., Wang,H., Shi,W., Robinson,R.B., El Maghrabi,M.R., Benjamin,W., Dixon,J., McKinnon,D., Cohen,I.S., et Wymore,R. (2001). MinK-Related Peptide 1 : A {beta} Subunit for the HCN Ion Channel Subunit Family Enhances Expression and Speeds Activation. *Circ Res,* 88, 84e-887.

[124] 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., et Wang Q. (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392, 293-296.

[125] Brugada,R., Hong,K., Dumaine,R., Cordeiro,J., Gaita,F., Borggrefe,M., Menendez,T.M., Brugada,J., Pollevick,G.D., Wolpert,C., Burashnikov,E., Matsuo,K., Sheng Wu,Y., Guerchicoff,A., Bianchi,F., Giustetto,C., Schimpf,R., Brugada,P., et Antzelevitch,C. (2004). Sudden Death Associated With Short-QT Syndrome Linked to Mutations in HERG. *Circulation,* 109, 30-35.

[126] Lai,L.P., Su,M.J., Yeh,H.M., Lin,J.L., Chiang,F.T., Hwang,J.J., Hsu,K.L., Tseng,C.D., Lien,W.P., Tseng,Y.Z., et Huang,S.K. (2002). Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am. Heart J.,* 144, 485-490.

[127] Lathrop,G.M., Lalouel,J.M., Julier,C., et Ott,J. (1985). Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am. J. Hum. Genet.,* 37, 482-498.

[128] O'Connell,J.R. et Weeks,D.E. (1995). The VITESSE algorithm for rapid exact multilocus linkage analysis via genotype set-recoding and fuzzy inheritance. *Nat. Genet.,* 11, 402-408.

[129] Takeshima,H., Komazaki,S., Nishi,M., Iino,M., et Kangawa,K. (2000). Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell,* 6, 11-22.

[130] Minamisawa,S., Oshikawa,J., Takeshima,H., Hoshijima,M., Wang,Y., Chien,K.R., Ishikawa,Y., et Matsuoka,R. (2004). Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochem. Biophys. Res Commun.,* 325, 852-856.

[131] Di Paola,R., Frittitta,L., Miscio,G., Bozzali,M., Baratta,R., Centra,M., Spampinato,D., Santagati,M.G., Ercolino,T., Cisternino,C., Soccio,T., Mastroianno,S., Tassi,V., Almgren,P., Pizzuti,A., Vigneri,R., et Trischitta,V. (2002). A variation in 3' UTR of hPTP1B increases specific gene expression and associates with insulin resistance. *Am. J Hum. Genet,* 70, 806-812.

[132] Echwald,S.M., Bach,H., Vestergaard,H., Richelsen,B., Kristensen,K., Drivsholm,T., Borch-Johnsen,K., Hansen,T., et Pedersen,O. (2002). A P387L variant in protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) is associated with type 2 diabetes and impaired serine phosphorylation of PTP-1B in vitro. *Diabetes,* 51, 1-6.

[133] Brugada,P. et Brugada,J. (1992). 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.,* 20, 1391-1396.

[134] Gotoh,K. (1976). A histopathological study on the conduction system of the so-called "Pokkuri disease" (sudden unexpected cardiac death of unknown origin in Japan). *Jpn. Circ J,* 40, 753-768.

[135] Priori,S.G., Aliot,E., Blomstrom-Lundqvist,C., Bossaert,L., Breithardt,G., Brugada,P., Camm,A.J., Cappato,R., Cobbe,S.M., Di Mario,C., Maron,B.J., McKenna,W.J., Pedersen,A.K., Ravens,U., Schwartz,P.J., Trusz-Gluza,M., Vardas,P., Wellens,H.J.J., et Zipes,D.P. (2001). Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J,* 22, 1374-1450.

[136] Grace,A.A. (1999). Brugada syndrome. *Lancet,* 354, 445-446.

[137] Alings,M. et Wilde,A. (1999). "Brugada" Syndrome : Clinical Data and Suggested Pathophysiological Mechanism. *Circulation,* 99, 666-673.

[138] 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., et Wang,Q. (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature,* 392, 293-296.

[139] Osher,H.L. et Wolff,L. (1953). Electrocardiographic pattern simulating acute myocardial injury. *Am. J Med Sci,* 226, 541-545.

[140] Martini,B., Nava,A., Thiene,G., Buja,G.F., Canciani,B., Scognamiglio,R., Daliento,L., et Dalla,V.S. (1989). Ventricular fibrillation without apparent heart disease: description of six cases. *Am. Heart J,* 118, 1203-1209.

[141] Martini,B., Nava,A., Canciani,B., et Thiene,G. (1993). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death. *J Am. Coll. Cardiol.,* 22, 633.

[142] Corrado,D., Nava,A., Buja,G., Martini,B., Fasoli,G., Oselladore,L., Turrini,P., et Thiene,G. (1996). Familial cardiomyopathy underlies syndrome of right bundle branch block, ST segment elevation and sudden death. *J Am. Coll. Cardiol.,* 27, 443-448.

[143] Wilde,A.A.M., Antzelevitch,C., Borggrefe,M., Brugada,J., Brugada,R., Brugada,P., Corrado,D., Hauer,R.N.W., Kass,R.S., Nademanee,K., Priori,S.G., et Towbin,J.A. (2002). Proposed Diagnostic Criteria for the Brugada Syndrome. *Eur Heart J,* 23, 1648-1654.

[144] Antzelevitch,C., Brugada,P., Borggrefe,M., Brugada,J., Brugada,R., Corrado,D., Gussak,I., LeMarec,H., Nademanee,K., Perez Riera,A.R., Shimizu,W., Schulze-Bahr,E., Tan,H., et Wilde,A. (2005). Brugada Syndrome. Report of the Second Consensus Conference. Endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation,* 01.

[145] Matsuo,K., Shimizu,W., Kurita,T., Inagaki,M., Aihara,N., et Kamakura,S. (1998). Dynamic changes of 12-lead electrocardiograms in a patient with Brugada syndrome. *J Cardiovasc. Electrophysiol.,* 9, 508-512.

[146] Rouleau,F., Asfar,P., Boulet,S., Dube,L., Dupuis,J.M., Alquier,P., et Victor,J. (2001). Transient ST segment elevation in right precordial leads induced by psychotropic drugs: relationship to the Brugada syndrome. *J Cardiovasc. Electrophysiol.,* 12, 61-65.

[147] Nishizaki,M.I.T.S., Sakurada,H.A.R.U., Ashikaga,T.A.K.A., Yamawake,N.O.R.I., Fujii,H.I.R.O., Arita,M.A.S.A., Isobe,M.I.T.S., et Hiraoka,M.A.S.A. (2003). Effects of Glucose-Induced Insulin Secretion on ST Segment Elevation in the Brugada Syndrome. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology,* 14, 243-249.

[148] Brugada,R., Brugada,J., Antzelevitch,C., Kirsch,G.E., Potenza,D., Towbin,J.A., et Brugada,P. (2000). Sodium Channel Blockers Identify Risk for Sudden Death in Patients With ST-Segment Elevation and Right Bundle Branch Block but Structurally Normal Hearts. *Circulation,* 101, 510-515.

[149] 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., et Ohe,T. (2002). Atrial fibrillation and atrial vulnerability in patients with Brugada syndrome. *J Am. Coll. Cardiol.,* 40, 1437-1444.

[150] Bordachar,P., Reuter,S., Garrigue,S., Cai,X., Hocini,M., Jais,P., Haissaguerre,M., et Clementy,J. (2004). Incidence, clinical implications and prognosis of atrial arrhythmias in brugada syndrome. *Eur Heart J,* 25, 879-884.

[151] Eckardt,L., Kirchhof,P., Johna,R., Haverkamp,W., Breithardt,G., et Borggrefe,M. (2001). Wolff-Parkinson-White syndrome associated with Brugada syndrome. *Pacing Clin. Electrophysiol.,* 24, 1423-1424.

[152] Morita,H., Fukushima-Kusano,K., Nagase,S., Miyaji,K., Hiramatsu,S., Banba,K., Nishii,N., Watanabe,A., Kakishita,M., Takenaka-Morita,S., Nakamura,K., Saito,H., Emori,T., et Ohe,T. (2004). Sinus node function in patients with Brugada-type ECG. *Circ J,* 68, 473-476.

[153] Takehara,N., Makita,N., Kawabe,J., Sato,N., Kawamura,Y., Kitabatake,A., et Kikuchi,K. (2004). A cardiac sodium channel mutation identified in Brugada syndrome associated with atrial standstill. *Journal of Internal Medicine,* 255, 137-142.

[154] Tomcsanyi,J., Simor,T., et Papp,L. (2002). Haemopericardium and Brugada-like ECG pattern in rheumatoid arthritis. *Heart,* 87, 234.

[155] Viskin,S., Fish,R., Eldar,M., Zeltser,D., Lesh,M.D., Glick,A., et Belhassen,B. (2000). Prevalence of the Brugada sign in idiopathic ventricular fibrillation and healthy controls. *Heart,* 84, 31-36.

[156] Corrado,D., Basso,C., Buja,G., Nava,A., Rossi,L., et Thiene,G. (2001). Right Bundle Branch Block, Right Precordial ST-Segment Elevation, and Sudden Death in Young People. *Circulation,* 103, 710-717.

[157] Brugada,J., Brugada,R., et Brugada,P. (1998). Right Bundle-Branch Block and ST-Segment Elevation in Leads V1 Through V3 : A Marker for Sudden Death in Patients Without Demonstrable Structural Heart Disease. *Circulation,* 97, 457-460.

[158] Kasanuki,H., Ohnishi,S., Ohtuka,M., Matsuda,N., Nirei,T., Isogai,R., Shoda,M., Toyoshima,Y., et Hosoda,S. (1997). Idiopathic Ventricular Fibrillation Induced With Vagal Activity in Patients Without Obvious Heart Disease. *Circulation,* 95, 2277-2285.

[159] Di Diego,J.M., Cordeiro,J.M., Goodrow,R.J., Fish,J.M., Zygmunt,A.C., Perez,G.J., Scornik,F.S., et Antzelevitch,C. (2002). Ionic and Cellular Basis for the Predominance of the Brugada Syndrome Phenotype in Males. *Circulation,* 106, 2004-2011.

[160] Matsuo,K., Kurita,T., Inagaki,M., Kakishita,M., Aihara,N., Shimizu,W., Taguchi,A., Suyama,K., Kamakura,S., et Shimomura,K. (1999). The circadian pattern of the development of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Eur Heart J,* 20, 465-470.

[161] Priori,S.G., Napolitano,C., Giordano,U., Collisani,G., et Memmi,M. (2000). Brugada syndrome and sudden cardiac death in children. *Lancet,* 355, 808-809.

[162] Nademanee,K., Veerakul,G., Nimmannit,S., Chaowakul,V., Bhuripanyo,K., Likittanasombat,K., Tunsanga,K., Kuasirikul,S., Malasit,P., Tansupasawadikul,S., et Tatsanavivat,P. (1997). Arrhythmogenic Marker for the Sudden Unexplained Death Syndrome in Thai Men. *Circulation,* 96, 2595-2600.

[163] Vatta,M., Dumaine,R., Varghese,G., Richard,T.A., Shimizu,W., Aihara,N., Nademanee,K., Brugada,R., Brugada,J., Veerakul,G., Li,H., Bowles,N.E., Brugada,P., Antzelevitch,C., et Towbin,J.A. (2002). Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum. Mol. Genet.,* 11, 337-345.

[164] Gussak,I., Antzelevitch,C., Bjerregaard,P., Towbin,J.A., et Chaitman,B.R. (1999). The Brugada syndrome: clinical, electrophysiologic and genetic aspects. *J Am. Coll. Cardiol.,* 33, 5-15.

[165] Priori,S.G., Napolitano,C., Gasparini,M., Pappone,C., Della,B.P., Brignole,M., Giordano,U., Giovannini,T., Menozzi,C., Bloise,R., Crotti,L., Terreni,L., et Schwartz,P.J. (2000). Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: A prospective evaluation of 52 families. *Circulation,* 102, 2509-2515.

[166] Atarashi,H., Ogawa,S., Harumi,K., Sugimoto,T., Inoue,H., Murayama,M., Toyama,J., et Hayakawa,H. (2001). 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.,* 37, 1916-1920.

[167] Brugada,J., Brugada,R., Antzelevitch,C., Towbin,J., Nademanee,K., et Brugada,P. (2002). 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,* 105, 73-78.

[168] Brugada,J., Brugada,R., et Brugada,P. (2003). Determinants of Sudden Cardiac Death in Individuals With the Electrocardiographic Pattern of Brugada Syndrome and No Previous Cardiac Arrest. *Circulation,* 108, 3092-3096.

[169] Hermida,J.S., Jandaud,S., Lemoine,J.L., Rodriguez-Lafrasse,C., Delonca,J., Bertrand,C., Jarry,G., Rochette,J., et Rey,J.L. (2004). Prevalence of drug-induced electrocardiographic pattern of the Brugada syndrome in a healthy population. *Am. J Cardiol.,* 94, 230-233.

[170] Eckardt,L., Probst,V., Smits,J.P.P., Bahr,E.S., Wolpert,C., Schimpf,R., Wichter,T., Boisseau,P., Heinecke,A., Breithardt,G., Borggrefe,M., LeMarec,H., Bocker,D., et Wilde,A.A.M. (2005). Long-Term Prognosis of Individuals With Right Precordial ST-Segment-Elevation Brugada Syndrome. *Circulation,* 111**,** 257-263.

[171] 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., et Nastoli,J. (2002). Natural History of Brugada Syndrome: Insights for Risk Stratification and Management. *Circulation,* 105, 1342-1347.

[172] Brugada,P., Geelen,P., Brugada,R., Mont,L., et Brugada,J. (2001). Prognostic value of electrophysiologic investigations in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol,* 12, 1004-1007.

[173] Belhassen,B., Glick,A., et Viskin,S. (2004). Efficacy of Quinidine in High-Risk Patients With Brugada Syndrome. *Circulation,* 110, 1731-1737.

[174] Balser,J.R. (2001). The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol. Cell Cardiol.,* 33, 599-613.

[175] Tan,H.L., Bezzina,C.R., Smits,J.P., Verkerk,A.O., et Wilde,A.A. (2003). Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc Res,* 57**,** 961-973.

[176] Baroudi,G., Pouliot,V., Denjoy,I., Guicheney,P., Shrier,A., et Chahine,M. (2001). Novel Mechanism for Brugada Syndrome : Defective Surface Localization of an SCN5A Mutant (R1432G). *Circ Res,* 88, 78e-83.

[177] Baroudi,G., Acharfi,S., Larouche,C., et Chahine,M. (2002). Expression and Intracellular Localization of an SCN5A Double Mutant R1232W/T1620M Implicated in Brugada Syndrome. *Circ Res,* 90, 11e-16.

[178] Kyndt F., Probst V., Potet F., Demolombe S., Chevallier J. C., Baro I., Moisan J. P., Boisseau P., Schott J. J., Escande D. et Le Marec H. (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 104, 3081-6.

[179] Vatta,M., Dumaine,R., Antzelevitch,C., Brugada,R., Li,H., Bowles,N.E., Nademanee,K., Brugada,J., Brugada,P., et Towbin,J.A. (2002). Novel mutations in domain I of SCN5A cause Brugada syndrome. *Mol. Genet. Metab,* 75, 317-324.

[180] Weiss,R., Barmada,M.M., Nguyen,T., Seibel,J.S., Cavlovich,D., Kornblit,C.A., Angelilli,A., Villanueva,F., McNamara,D.M., et London,B. (2002). Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation,* 105, 707-713.

[181] Antzelevitch,C. (2001). The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol,* 12, 268-272.

[182] Yan,G.X. et Antzelevitch,C. (1999). Cellular Basis for the Brugada Syndrome and Other Mechanisms of Arrhythmogenesis Associated With ST-Segment Elevation. *Circulation,* 100, 1660-1666.

[183] Dumaine,R., Towbin,J.A., Brugada,P., Vatta,M., Nesterenko,D.V., Nesterenko,V.V., Brugada,J., Brugada,R., et Antzelevitch,C. (1999). Ionic Mechanisms Responsible for the Electrocardiographic Phenotype of the Brugada Syndrome Are Temperature Dependent. *Circ Res,* 85, 803-809.

[184] Antzelevitch,C. (1999). Ion channels and ventricular arrhythmias: cellular and ionic mechanisms underlying the Brugada syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.,* 14, 274-279.

[185] 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., et Wilde,A.A. (2002). Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am. Coll. Cardiol.,* 40, 350-356.

[186] Miyazaki,T., Mitamura,H., Miyoshi,S., Soejima,K., Aizawa,Y., et Ogawa,S. (1996). Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J Am. Coll. Cardiol.,* 27**,** 1061-1070.

[187] Wichter,T., Matheja,P., Eckardt,L., Kies,P., Schafers,K., Schulze-Bahr,E., Haverkamp,W., Borggrefe,M., Schober,O., Breithardt,G., et Schafers,M. (2002). Cardiac Autonomic Dysfunction in Brugada Syndrome. *Circulation,* 105, 702-706.

[188] Kies,P., Wichter,T., Schafers,M., Paul,M., Schafers,K.P., Eckardt,L., Stegger,L., Schulze-Bahr,E., Rimoldi,O., Breithardt,G., Schober,O., et Camici,P.G. (2004). Abnormal Myocardial Presynaptic Norepinephrine Recycling in Patients With Brugada Syndrome. *Circulation,* 110, 3017-3022.

[189] Nagase,S., Kusano,K.F., Morita,H., Fujimoto,Y., Kakishita,M., Nakamura,K., Emori,T., Matsubara,H., et Ohe,T. (2002). Epicardial electrogram of the right ventricular outflow tract in patients with the Brugada syndrome: using the epicardial lead. *J Am. Coll. Cardiol.,* 39, 1992-1995.

[190] Antzelevitch,C. (2002). Late potentials and the Brugada syndrome. *J Am. Coll. Cardiol.,* 39, 1996-1999.

[191] Takagi,M., Aihara,N., Kuribayashi,S., Taguchi,A., Shimizu,W., Kurita,T., Suyama,K., Kamakura,S., Hamada,S., et Takamiya,M. (2001). Localized right ventricular morphological abnormalities detected by electron-beam computed tomography represent arrhythmogenic substrates in patients with the Brugada syndrome. *Eur Heart J,* 22, 1032-1041.

[192] Takagi,M., Aihara,N., Kuribayashi,S., Taguchi,A., Kurita,T., Suyama,K., Kamakura,S., et Takamiya,M. (2003). Abnormal response to sodium channel blockers in patients with Brugada syndrome: augmented localised wall motion abnormalities in the right ventricular outflow tract region detected by electron beam computed tomography. *Heart,* 89, 169-174.

[193] Groenewegen,W.A., Firouzi,M., Bezzina,C.R., Vliex,S., van Langen,I.M., Sandkuijl,L., Smits,J.P.P., Hulsbeek,M., Rook,M.B., Jongsma,H.J., et Wilde,A.A.M. (2003). A Cardiac Sodium Channel Mutation Cosegregates With a Rare Connexin40 Genotype in Familial Atrial Standstill. *Circ Res,* **92,** 14-22.

[194] 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., Der Hout,A.H., Mannens,M.M., et Wilde,A.A. (1999). A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ. Res.,* 85, 1206-1213.

[195] Chang,C.C., Acharfi,S., Wu,M.H., Chiang,F.T., Wang,J.K., Sung,T.C., et Chahine,M. (2004). A novel SCN5A mutation manifests as a malignant form of long QT syndrome with perinatal onset of tachycardia/bradycardia. *Cardiovascular Research,* 64, 268-278.

[196] Grant,A.O., Carboni,M.P., Neplioueva,V., Starmer,C.F., Memmi,M., Napolitano,C., et Priori,S. (2002). Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin. Invest,* 110, 1201-1209.

[197] Brugada,J., Brugada,P., et Brugada,R. (1999). The syndrome of right bundle branch block ST segment elevation in V1 to V3 and sudden death--the Brugada syndrome. *Europace.,* 1, 156-166.

[198] Matsuo,K., Akahoshi,M., Seto,S., et Yano,K. (2003). Disappearance of the Brugada-type electrocardiogram after surgical castration: a role for testosterone and an explanation for the male preponderance. *Pacing Clin. Electrophysiol,* 26, 1551-1553.

[199] Song,M., Helguera,G., Eghbali,M., Zhu,N., Zarei,M.M., Olcese,R., Toro,L., et Stefani,E. (2001). Remodeling of Kv4.3 Potassium Channel Gene Expression under the Control of Sex Hormones. *J. Biol. Chem.,* 276, 31883-31890.

[200] Yang,P., Kanki,H., Drolet,B., Yang,T., Wei,J., Viswanathan,P.C., Hohnloser,S.H., Shimizu,W., Schwartz,P.J., Stanton,M., Murray,K.T., Norris,K., George,A.L., Jr., et Roden,D.M. (2002). Allelic Variants in Long-QT Disease Genes in Patients With Drug-Associated Torsades de Pointes. *Circulation,* 105, 1943-1948.

[201] Viswanathan,P.C., Benson,D.W., et Balser,J.R. (2003). A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J. Clin. Invest.,* 111, 341-346.

[202] Splawski,I., Timothy,K.W., Tateyama,M., Clancy,C.E., Malhotra,A., Beggs,A.H., Cappuccio,F.P., Sagnella,G.A., Kass,R.S., et Keating,M.T. (2002). Variant of SCN5A sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science,* 297, 1333-1336.

[203] Chen,S., Chung,M.K., Martin,D., Rozich,R., Tchou,P.J., et Wang,Q. (2002). SNP S1103Y in the cardiac sodium channel gene SCN5A is associated with cardiac arrhythmias and sudden death in a white family. *J Med Genet.,* 39, 913-915.

[204] Mangrum,J.M. et DiMarco,J.P. (2000). The Evaluation and Management of Bradycardia. *N Engl J Med,* 342, 703-709.

[205] Da Costa,D., Brady,W.J., et Edhouse,J. (2002). ABC of clinical electrocardiography: Bradycardias and atrioventricular conduction block. *BMJ,* 324, 535-538.

[206] Aplin,M., Engstrom,T., Vejlstrup,N.G., Clemmensen,P., Torp-Pedersen,C., et Kober,L. (2003). Prognostic importance of complete atrioventricular block complicating acute myocardial infarction. *Am. J Cardiol.,* 92, 853-856.

[207] Lenègre,J. et Moreau,P. (1963). Le bloc auriculo-ventriculaire chronique. Etude anatomique, clinique et histologique. *Arch. Mal Coeur Vaiss.,* 56, 867-888.

[208] Lev,M. (1964). Anatomic Basis For Atrioventricular Block. *Am. J Med,* 37, 742-748.

[209] Lev,M., Kinare,S.G., et Pick,A. (1970). The pathogenesis of atrioventricular block in coronary disease. *Circulation,* 42, 409-425.

[210] Greenspahn,B.R., Denes,P., Daniel,W., et Rosen,K.M. (1976). Chronic bifascicular block: evaluation of familial factors. *Ann. Intern Med,* 84, 521-525.

[211] Buyon,J.P., Hiebert,R., Copel,J., Craft,J., Friedman,D., Katholi,M., Lee,L.A., Provost,T.T., Reichlin,M., Rider,L., Rupel,A., Saleeb,S., Weston,W.L., et Skovron,M.L. (1998). Autoimmune-

associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *J Am. Coll. Cardiol.,* 31, 1658-1666.

[212] Moak,J.P., Barron,K.S., Hougen,T.J., Wiles,H.B., Balaji,S., Sreeram,N., Cohen,M.H., Nordenberg,A., Van Hare,G.F., Friedman,R.A., Perez,M., Cecchin,F., Schneider,D.S., Nehgme,R.A., et Buyon,J.P. (2001). Congenital heart block: development of late-onset cardiomyopathy, a previously underappreciated sequela. *J Am. Coll. Cardiol.,* 37, 238-242.

[213] Smith,N.M. et Ho,S.Y. (1994). Heart block and sudden death associated with fibrosis of the conduction system at the margin of a ventricular septal defect. *Pediatr. Cardiol.,* 15, 139-142.

[214] Lev,M., Paul,M.H., et Cassels,D.E. (1967). Complete atrioventricular block associated with atrial septal defect of the fossa ovalis (secundum) type. A histopathologic study of the conduction systems. *Am. J Cardiol.,* 19, 266-274.

[215] Sarachek,N.S. et Leonard,J.L. (1972). Familial heart block and sinus bradycardia. Classification and natural history. *Am. J Cardiol.,* 29, 451-458.

[216] Lev,M., Cuadros,H., et Paul,M.H. (1971). Interruption of the atrioventricular bundle with congenital atrioventricular block. *Circulation,* 43, 703-710.

[217] Kearns,T.P. et Sayre,G.P. (1958). Retinitis pigmentosa, external ophthalmophegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA. Arch. Ophthalmol.,* 60, 280-289.

[218] Emery,A.E. et Dreifuss,F.E. (1966). Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry,* 29, 338-342.

[219] Tokgozoglu,L.S., Ashizawa,T., Pacifico,A., Armstrong,R.M., Epstein,H.F., et Zoghbi,W.A. (1995). Cardiac involvement in a large kindred with myotonic dystrophy. Quantitative assessment and relation to size of CTG repeat expansion. *JAMA,* 274, 813-819.

[220] Lynch,H.T., Mohiuddin,S., Sketch,M.H., Krush,A.J., Carter,S., et Runco,V. (1973). Hereditary progressive atrioventricular conduction defect. A new syndrome? *JAMA,* 225, 1465-1470.

[221] Kennel,A.J., Callahan,J.A., Maloney,J.D., et Zajarias,A. (1981). Adult-onset familial infra-Hisian block. *Am. Heart J,* 102, 447-452.

[222] Lynch,H.T., Mohiuddin,S., Moran,J., Kaplan,A., Sketch,M., Zencka,A., et Runco,V. (1975). Hereditary progressive atrioventricular conduction defect. *Am. J Cardiol.,* 36, 297-301.

[223] Stephan,E., Aftimos,G., et Allam,C. (1985). Familial fascicular block: histologic features of Lev's disease. *Am. Heart J,* 109, 1399-1401.

[224] Lenègre,J., Deparis,M., Auzepy,P., et Gay,J. (1970). Deux cas (l'un anatomo-clinique) de bloc auriculo-ventriculaire probablement congénital et d'évolution régressive. *Arch. Mal Coeur Vaiss.,* 63**,** 749-763.

[225] Song,Y., Yao,Q., Zhu,J., Luo,B., et Liang,S. (1999). Age-related variation in the interstitial tissues of the cardiac conduction system; and autopsy study of 230 Han Chinese. *Forensic Sci Int.,* 104, 133-142.

[226] Shaw,R.M. et Rudy,Y. (1997). 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,* 81, 727-741.

[227] Fast,V.G. et Kleber,A.G. (1997). Role of wavefront curvature in propagation of cardiac impulse. *Cardiovasc Res,* 33, 258-271.

[228] Rohr,S., Kucera,J.P., et Kleber,A.G. (1998). Slow Conduction in Cardiac Tissue, I : Effects of a Reduction of Excitability Versus a Reduction of Electrical Coupling on Microconduction. *Circ Res,* 83, 781-794.

[229] Kucera,J.P., Kleber,A.G., et Rohr,S. (1998). Slow conduction in cardiac tissue, II: effects of branching tissue geometry. *Circ Res,* 83, 795-805.

[230] Probst,V., Kyndt,F., Potet,F., Trochu,J.N., Mialet,G., Demolombe,S., Schott,J.J., Baro,I., Escande,D., et Le Marec,H. (2003). Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am. Coll. Cardiol.,* 41, 643-652.

[231] Cheng,G., Litchenberg,W.H., Cole,G.J., Mikawa,T., Thompson,R.P., et Gourdie,R.G. (1999). Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development,* 126, 5041-5049.

[232] Gros,D., Dupays,L., Alcolea,S., Meysen,S., Miquerol,L., et Theveniau-Ruissy,M. (2004). Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart-new models for cardiovascular research. *Cardiovasc. Res,* 62, 299-308.

[233] Schott,J.J., Benson,D.W., Basson,C.T., Pease,W., Silberbach,G.M., Moak,J.P., Maron,B.J., Seidman,C.E., et Seidman,J.G. (1998). Congenital Heart Disease Caused by Mutations in the Transcription Factor NKX2-5. *Science,* 281, 108-111.

[234] 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., et Kugler,J.D. (1999). Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J. Clin. Invest.,* 104, 1567-1573.

[235] Pashmforoush,M., Lu,J.T., Chen,H., Amand,T.S., Kondo,R., Pradervand,S., Evans,S.M., Clark,B., Feramisco,J.R., Giles,W., Ho,S.Y., Benson,D.W., Silberbach,M., Shou,W., et Chien,K.R. (2004). Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell,* 117, 373-386.

[236] 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., et Chien,K.R. (2000). A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. *Cell,* 102, 671-682.

[237] Michalak,M., Corbett,E.F., Mesaeli,N., Nakamura,K., et Opas,M. (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J,* 344 Pt 2, 281-292.

[238] Mesaeli,N., Nakamura,K., Zvaritch,E., Dickie,P., Dziak,E., Krause,K.H., Opas,M., MacLennan,D.H., et Michalak,M. (1999). Calreticulin Is Essential for Cardiac Development. *J. Cell Biol.,* 144, 857-868.

[239] Nakamura,K., Robertson,M., Liu,G., Dickie,P., Nakamura,K., Guo,J.Q., Duff,H.J., Opas,M., Kavanagh,K., et Michalak,M. (2001). Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *J. Clin. Invest.,* 107, 1245-1253.

[240] Guo,L., Lynch,J., Nakamura,K., Fliegel,L., Kasahara,H., Izumo,S., Komuro,I., Agellon,L.B., et Michalak,M. (2001). COUP-TF1 Antagonizes Nkx2.5-mediated Activation of the Calreticulin Gene during Cardiac Development. *J. Biol. Chem.,* 276, 2797-2801.

[241] Wei,L., Taffet,G.E., Khoury,D.S., Bo,J., Li,Y., Yatani,A., Delaughter,M.C., Klevitsky,R., Hewett,T.E., Robbins,J., Michael,L.H., Schneider,M.D., Entman,M.L., et Schwartz,R.J. (2004). Disruption of Rho signaling results in progressive atrioventricular conduction defects while ventricular function remains preserved. *FASEB J.,* 03-0664fje.

[242] Molkentin,J.D., Lu,J.R., Antos,C.L., Markham,B., Richardson,J., Robbins,J., Grant,S.R., et Olson,E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell,* 93, 215-228.

[243] Dong,D., Duan,Y., Guo,J., Roach,D.E., Swirp,S.L., Wang,L., Lees-Miller,J.P., Sheldon,R.S., Molkentin,J.D., et Duff,H.J. (2003). Overexpression of calcineurin in mouse causes sudden cardiac death associated with decreased density of K+ channels. *Cardiovasc. Res,* 57, 320-332.

[244] Gillis,A.M., Kavanagh,K.M., Mathison,H.J., Somers,J.R., Zhan,S., et Duff,H.J. (2004). Heart block in mice overexpressing calcineurin but not NF-AT3. *Cardiovasc. Res,* 64, 488-495.

[245] Fatkin,D., MacRae,C., Sasaki,T., Wolff,M.R., Porcu,M., Frenneaux,M., Atherton,J., Vidaillet,H.J., Spudich,S., De Girolami,U., Seidman,J.G., Seidman,C.E., Muntoni,F., Muehle,G., Johnson,W., et McDonough,B. (1999). 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,* 341, 1715-1724.

[246] Dalakas,M.C., Park,K.Y., Semino-Mora,C., Lee,H.S., Sivakumar,K., et Goldfarb,L.G. (2000). Desmin Myopathy, a Skeletal Myopathy with Cardiomyopathy Caused by Mutations in the Desmin Gene. *N Engl J Med,* 342**,** 770-780.

[247] Undrovinas,A.I., Shander,G.S., et Makielski,J.C. (1995). Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 269, H203-H214.

[248] Undrovinas,A.I. et Maltsev,V.A. (1998). Cytochalasin D alters kinetics of Ca2+ transient in rat ventricular cardiomyocytes: an effect of altered actin cytoskeleton? *J Mol. Cell Cardiol.,* 30, 1665-1670.

[249] Ou Y., Strege P., Miller S. M., Makielski J., Ackerman M., Gibbons S. J. et Farrugia G. (2003). Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction, *J Biol Chem*, 278, 1915-23.

[250] Stephan,E., de Meeus,A., et Bouvagnet,P. (1997). Hereditary bundle branch defect: right bundle branch blocks of different causes have different morphologic characteristics. *Am. Heart J,* 133, 249-256.

[251] Schott J. J., Alshinawi C., Kyndt F., Probst V., Hoorntje T. M., Hulsbeek M., Wilde A. A., Escande D., Mannens M. M., et Le Marec H. (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat.Genet.* 23, 20-21.

[252] Tan,H.L., Bink-Boelkens,M.T.E., Bezzina,C.R., Viswanathan,P.C., Beaufort-Krol,G.C.M., van Tintelen,P.J., van den Berg,M.P., Wilde,A.A.M., et Balser,J.R. (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. Nature, 409, 1043-1047.

[253] Wang,D.W., Viswanathan,P.C., Balser,J.R., George,A.L., Jr., et Benson,D.W. (2002). Clinical, Genetic, and Biophysical Characterization of SCN5A Mutations Associated With Atrioventricular Conduction Block. *Circulation,* 105, 341-346.

[254] 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.M., et Mannens,M.M.A.M. (2003). Compound Heterozygosity for Mutations (W156X and R225W) in SCN5A Associated With Severe Cardiac Conduction Disturbances and Degenerative Changes in the Conduction System. *Circ Res,* 92, 159-168.

[255] Brink,A.J. and Torrington,M. (1977). Progressive familial heart block--two types. *S. Afr. Med. J,* **52,** 53-59.

[256] Stephan,E. (1978). Hereditary bundle branch system defect: survey of a family with four affected generations. *Am. Heart J,* 95, 89-95.

[257] de Meeus A., Stephan E., Debrus S., Jean M. K., Loiselet J., Weissenbach J., Demaille J., et Bouvagnet P. (1995). An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Circ.Res.* 77, 735-740.

[258] Brink P. A., Ferreira A., Moolman J. C., Weymar H. W., van der Merwe P. L., et Corfield V. A. (1995). Gene for progressive familial heart block type I maps to chromosome 19q13. *Circulation* 91, 1633-1640.

[259] Lynch,H.T., Mohiuddin,S., Moran,J., Kaplan,A., Sketch,M., Zencka,A., et Runco,V. (1975). Hereditary progressive atrioventricular conduction defect. *Am. J Cardiol.,* **36,** 297-301.

[260] Saffitz J. E., Laing J. G., et Yamada K. A. (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ.Res.* 86, 723-728.

[261] Eriksson,P., Hansson,P.O., Eriksson,H., et Dellborg,M. (1998). Bundle-Branch Block in a General Male Population : The Study of Men Born 1913. *Circulation,* 98, 2494-2500.

[262] Abriel,H. et Kass,R.S. (2005). Regulation of the Voltage-Gated Cardiac Sodium Channel Na(v)1.5 by Interacting Proteins. *Trends Cardiovasc Med,* 15, 35-40.

[263] Gros,D.B. et Jongsma,H.J. (1996). Connexins in mammalian heart function. *Bioessays,* 18, 719-730.

[264] Balser,J.R. (1999). Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovasc Res,* 42, 327-338.

[265] Gellens,M.E., George,A.L., Jr., Chen,L.Q., Chahine,M., Horn,R., Barchi,R.L., et Kallen,R.G. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A,* 89, 554-558.

[266] Catterall,W.A. (1992). Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Rev.,* 72, 15S-48.

[267] Hanlon,M.R. et Wallace,B.A. (2002). Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry,* 41, 2886-2894.

[268] Fahmi,A.I., Patel,M., Stevens,E.B., Fowden,A.L., John,J.E., III, Lee,K., Pinnock,R., Morgan,K., Jackson,A.P., et Vandenberg,J.I. (2001). The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *J Physiol,* 537, 693-700.

[269] Yu,F.H., Westenbroek,R.E., Silos-Santiago,I., McCormick,K.A., Lawson,D., Ge,P., Ferriera,H., Lilly,J., DiStefano,P.S., Catterall,W.A., Scheuer,T., et Curtis,R. (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci.,* 23, 7577-7585.

[270] Qu,Y., Curtis,R., Lawson,D., Gilbride,K., Ge,P., DiStefano,P.S., Silos-Santiago,I., Catterall,W.A., et Scheuer,T. (2001). Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Mol Cell Neurosci.,* 18, 570-580.

[271] Herfst,L.J., Rook,M.B., et Jongsma,H.J. (2004). Trafficking and functional expression of cardiac Na+ channels. *J. Mol. Cell Cardiol.,* 36, 185-193.

[272] Kim,P.S. et Arvan,P. (1998). Endocrinopathies in the Family of Endoplasmic Reticulum (ER) Storage Diseases: Disorders of Protein Trafficking and the Role of ER Molecular Chaperones. *Endocr Rev,* 19, 173-202.

[273] Zhou,J., Shin,H.G., Yi,J., Shen,W., Williams,C.P., et Murray,K.T. (2002). Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ Res,* 91, 540-546.

[274] Barlowe,C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol,* 13, 295-300.

[275] Ma,D. et Jan,L.Y. (2002). ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.,* 12, 287-292.

[276] Stockklausner,C. et Klocker,N. (2003). Surface Expression of Inward Rectifier Potassium Channels Is Controlled by Selective Golgi Export. *J. Biol. Chem.,* 278, 17000-17005.

[277] Zimmer,T., Biskup,C., Dugarmaa,S., Vogel,F., Steinbis,M., B+,T., Wu,Y.S., Dumaine,R., et Benndorf,K. (2002). Functional Expression of GFP-linked Human Heart Sodium Channel (hH1) and Subcellular Localization of the a Subunit in HEK293 Cells and Dog Cardiac Myocytes. *Journal of Membrane Biology,* 186, 1-12.

[278] Kucera,J.P., Rohr,S., et Rudy,Y. (2002). Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ Res,* 91, 1176-1182.

[279] Yarbrough,T.L., Lu,T., Lee,H.C., et Shibata,E.F. (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res,* 90, 443-449.

[280] Lemaillet,G., Walker,B., et Lambert,S. (2003). Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J. Biol. Chem.,* 278, 27333-27339.

[281] Mohler,P.J., Rivolta,I., Napolitano,C., Lemaillet,G., Lambert,S., Priori,S.G., et Bennett,V. (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A,* 101, 17533-17538.

[282] Liu,C.j., Dib-Hajj,S.D., et Waxman,S.G. (2001). Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 1B Binds to the C Terminus of the Tetrodotoxin-resistant Sodium Channel rNav1.9a (NaN). *J. Biol. Chem.,* 276, 18925-18933.

[283] Liu C. J., Dib-Hajj S. D., Renganathan M., Cummins T. R. et Waxman S. G. (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B, *J Biol Chem*, 278, 1029-36.

[284] Saimi,Y. et Kung,C. (2002). Calmodulin as an Ion Channel Subunit. *Annual Review of Physiology,* 64, 289-311.

[285] Maier,L.S. et Bers,D.M. (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol.,* 34, 919-939.

[286] Herzog,R.I., Liu,C., Waxman,S.G., et Cummins,T.R. (2003). Calmodulin Binds to the C Terminus of Sodium Channels Nav1.4 and Nav1.6 and Differentially Modulates Their Functional Properties. *J. Neurosci.,* 23, 8261-8270.

[287] Mori,M., Konno,T., Ozawa,T., Murata,M., Imoto,K., et Nagayama,K. (2000). Novel interaction of the voltage-dependent sodium channel (VDSC) with calmodulin: does VDSC acquire calmodulin-mediated Ca2+-sensitivity? *Biochemistry,* 39, 1316-1323.

[288] Tan H. L., Kupershmidt S., Zhang R., Stepanovic S., Roden D. M., Wilde A. A., Anderson M. E. et Balser J. R. (2002). A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability, *Nature*, 415 442-7.

[289] Deschenes,I., Neyroud,N., DiSilvestre,D., Marban,E., Yue,D.T., et Tomaselli,G.F. (2002). Isoform-Specific Modulation of Voltage-Gated Na+ Channels by Calmodulin. *Circ Res,* 90, 49e-57.

[290] Kim,J., Ghosh,S., Liu,H., Tateyama,M., Kass,R.S., et Pitt,G.S. (2004). Calmodulin Mediates Ca2+ Sensitivity of Sodium Channels. *J. Biol. Chem.,* 279, 45004-45012.

[291] Motoike,H.K., Liu,H., Glaaser,I.W., Yang,A.S., Tateyama,M., et Kass,R.S. (2004). The Na+ Channel Inactivation Gate Is a Molecular Complex: A Novel Role of the COOH-terminal Domain. *J. Gen. Physiol.,* 123, 155-165.

[292] Staub,O., Dho,S., Henry,P., Correa,J., Ishikawa,T., McGlade,J., et Rotin,D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na+ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J,* 15, 2371-2380.

[293] Hicke,L. et Dunn,R. (2003). Regulation of Membrane Protein Transport by Ubiquitin and Ubiquitin-Binding Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology,* **19,** 141-172.

[294] Einbond,A. et Sudol,M. (1996). Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Letters,* 384, 1-8.

[295] Abriel,H., Kamynina,E., Horisberger,J.D., et Staub,O. (2000). Regulation of the cardiac voltage-gated Na+ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett.,* 466, 377-380.

[296] van Bemmelen,M.X., Rougier,J.S., Gavillet,B., Apotheloz,F., Daidie,D., Tateyama,M., Rivolta,I., Thomas,M.A., Kass,R.S., Staub,O., et Abriel,H. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ. Res.,* 95, 284-291.

[297] Rougier,J.S., van Bemmelen,M.X., Bruce,M.C., Jespersen,T., Gavillet,B., Apotheloz,F., Cordonier,S., Staub,O., Rotin,D., et Abriel,H. (2004). Molecular Determinants of Voltage-Gated Sodium Channel Regulation by the Nedd4/Nedd4-like Proteins. *Am. J. Physiol Cell Physiol*.

[298] Gee,S.H., Madhavan,R., Levinson,S.R., Caldwell,J.H., Sealock,R., et Froehner,S.C. (1998). Interaction of Muscle and Brain Sodium Channels with Multiple Members of the Syntrophin Family of Dystrophin-Associated Proteins. *J. Neurosci.,* 18, 128-137.

[299] Bridges,D. et Moorhead,G.B.G. (2004). 14-3-3 Proteins: A Number of Functions for a Numbered Protein. *Science's STKE,* 2004, re10.

[300] Aitken,A., Baxter,H., Dubois,T., Clokie,S., Mackie,S., Mitchell,K., Peden,A., et Zemlickova,E. (2002). Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.,* 30**,** 351-360.

[301] Muslin,A.J., Tanner,J.W., Allen,P.M., et Shaw,A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 84, 889-897.

[302] Kucera,J.P., Rohr,S., et Rudy,Y. (2002). Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ Res,* 91, 1176-1182.

[303] Thorson,J.A., Yu,L.W., Hsu,A.L., Shih,N.Y., Graves,P.R., Tanner,J.W., Allen,P.M., Piwnica-Worms,H., et Shaw,A.S. (1998). 14-3-3 Proteins Are Required for Maintenance of Raf-1 Phosphorylation and Kinase Activity. *Mol. Cell. Biol.,* **18,** 5229-5238.

[304] Moore,B.W., Perez,V.J., et Gehring,M. (1968). Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system. *J. Neurochem.,* 15, 265-272.

[305] Bridges,D. et Moorhead,G.B.G. (2004). 14-3-3 Proteins: A Number of Functions for a Numbered Protein. *Science's STKE,* 2004, re10.

[306] Jin,J., Smith,F.D., Stark,C., Wells,C.D., Fawcett,J.P., Kulkarni,S., Metalnikov,P., O'Donnell,P., Taylor,P., Taylor,L., Zougman,A., Woodgett,J.R., Langeberg,L.K., Scott,J.D., et Pawson,T. (2004). Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr. Biol.,* 14, 1436-1450.

[307] Meek,S.E.M., Lane,W.S., et Piwnica-Worms,H. (2004). Comprehensive Proteomic Analysis of Interphase and Mitotic 14-3-3-binding Proteins. *J. Biol. Chem.,* 279, 32046-32054.

[308] Luk,S.C., Ngai,S.M., Tsui,S.K., Fung,K.P., Lee,C.Y., et Waye,M.M. (1999). In vivo and in vitro association of 14-3-3 epsilon isoform with calmodulin: implication for signal transduction and cell proliferation. *J. Cell Biochem.,* 73, 31-35.

[309] Xing,H., Zhang,S., Weinheimer,C., Kovacs,A., et Muslin,A.J. (2000). 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J.,* 19, 349-358.

[310] Zhai,J., Lin,H., Shamim,M., Schlaepfer,W.W., et Canete-Soler,R. (2001). Identification of a novel interaction of 14-3-3 with p190RhoGEF. *J. Biol. Chem.,* 276, 41318-41324.

[311] Diviani,D., Abuin,L., Cotecchia,S., et Pansier,L. (2004). Anchoring of both PKA and 14-3-3 inhibits the Rho-GEF activity of the AKAP-Lbc signaling complex. *EMBO J.,* 23, 2811-2820.

[312] Peng,C.Y., Graves,P.R., Thoma,R.S., Wu,Z., Shaw,A.S., et Piwnica-Worms,H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science,* 277, 1501-1505.

[313] Margolis,S.S., Walsh,S., Weiser,D.C., Yoshida,M., Shenolikar,S., et Kornbluth,S. (2003). PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *EMBO J.,* 22, 5734-5745.

[314] Zha,J., Harada,H., Yang,E., Jockel,J., et Korsmeyer,S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell,* 87, 619-628.

[315] Tzivion,G., Shen,Y.H., et Zhu,J. (2001). 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene,* 20, 6331-6338.

[316] Tan,Y., Ruan,H., Demeter,M.R., et Comb,M.J. (1999). p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.,* 274, 34859-34867.

[317] Brunet,A., Bonni,A., Zigmond,M.J., Lin,M.Z., Juo,P., Hu,L.S., Anderson,M.J., Arden,K.C., Blenis,J., et Greenberg,M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell,* 96, 857-868.

[318] Pan,S., Sehnke,P.C., Ferl,R.J., et Gurley,W.B. (1999). Specific Interactions with TBP and TFIIB in Vitro Suggest That 14-3-3 Proteins May Participate in the Regulation of Transcription When Part of a DNA Binding Complex. *Plant Cell,* 11, 1591-1602.

[319]Kagan,A., Melman,Y.F., Krumerman,A., et McDonald,T.V. (2002). 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K+ channel activity. *EMBO J.,* 21, 1889-1898.

[320] Chan,H.C., Wu,W.L., So,S.C., Chung,Y.W., Tsang,L.L., Wang,X.F., Yan,Y.C., Luk,S.C., Siu,S.S., Tsui,S.K., Fung,K.P., Lee,C.Y., et Waye,M.M. (2000). Modulation of the Ca(2+)-activated Cl(-) channel by 14-3-3epsilon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 270, 581-587.

[321] Yuan,H., Michelsen,K., et Schwappach,B. (2003). 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr. Biol.,* 13, 638-646.

[322] Rajan,S., Preisig-Muller,R., Wischmeyer,E., Nehring,R., Hanley,P.J., Renigunta,V., Musset,B., Schlichthorl,G., Derst,C., Karschin,A., et Daut,J. (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiol,* 545, 13-26.

[323] O'Kelly,I., Butler,M.H., Zilberberg,N., et Goldstein,S.A. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell,* 111, 577-588.

[324] Ichimura,T., Yamamura,H., Sasamoto,K., Tominaga,Y., Taoka,M., Kakiuchi,K., Shinkawa,T., Takahashi,N., Shimada,S., et Isobe,T. (2005). 14-3-3 Proteins Modulate the Expression of Epithelial

Na+ Channels by Phosphorylation-dependent Interaction with Nedd4-2 Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.,* 280, 13187-13194.

[325] Schwartz,P.J., Priori,S.G., Dumaine,R., Napolitano,C., Antzelevitch,C., Stramba-Badiale,M., Richard,T.A., Berti,M.R., et Bloise,R. (2000). A Molecular Link between the Sudden Infant Death Syndrome and the Long-QT Syndrome. *N Engl J Med,* 343, 262-267.

[326] Benson,D.W., Wang,D.W., Dyment,M., Knilans,T.K., Fish,F.A., Strieper,M.J., Rhodes,T.H., et George,A.L., Jr. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J. Clin. Invest.,* 112, 1019-1028.

[327] Zhang,S., Ren,J., Zhang,C.E., Treskov,I., Wang,Y., et Muslin,A.J. (2003). Role of 14-3-3-mediated p38 mitogen-activated protein kinase inhibition in cardiac myocyte survival. *Circ Res,* 93, 1026-1028.

[328] Liao,W., Wang,S., Han,C., et Zhang,Y. (2005). 14-3-3 Proteins regulate glycogen synthase 3beta phosphorylation and inhibit cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS Journal,* 272, 1845-1854.

[329] Jonsson,S., Thorsteinsdottir,U., Gudbjartsson,D.F., Jonsson,H.H., Kristjansson,K., Arnason,S., Gudnason,V., Isaksson,H.J., Hallgrimsson,J., Gulcher,J.R., Amundadottir,L.T., Kong,A., and Stefansson,K. (2004). Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population. *JAMA,* **292,** 2977-2983.

[330] Sveinbjornsdottir,S., Hicks,A.A., Jonsson,T., Petursson,H., Guethmundsson,G., Frigge,M.L., Kong,A., Gulcher,J.R., and Stefansson,K. (2000). Familial Aggregation of Parkinson's Disease in Iceland. *N Engl J Med,* **343,** 1765-1770.

[331] Rosenbaum,M.B. The hemiblocks: diagnostic criteria and clinical significance. *Mod. Concepts Cardiovasc. Dis*., 39 (1970), 141-146.

[332] Criteria comitte of the New York Association. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Disease of the Heart and Great Vessels. Sth. ed. Boston, Mass, Little, Brown & Co. 1979

[333] 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., et Weissenbach,J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature,* 380, 152-154.

[334] Lathrop,G.M., Lalouel,J.M., Julier,C., et Ott,J. (1985). Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am. J. Hum. Genet.,* 37, 482-498.

[335] O'Connell,J.R. et Weeks,D.E. (1995). The VITESSE algorithm for rapid exact multilocus linkage analysis via genotype set-recoding and fuzzy inheritance. *Nat. Genet.,* 11, 402-408.

[336] Makita,N., Bennett,P.B., Jr., and George,A.L., Jr. (1996). Multiple domains contribute to the distinct inactivation properties of human heart and skeletal muscle Na+ channels. *Circ. Res.,* 78, 244-252.

[337] Sladeczek F., Camonis J. H., Burnol A. F. and Le Bouffant F. (1997). The Cdk-like protein PCTAIRE-1 from mouse brain associates with p11 and 14-3-3 proteins. *Mol Gen Genet*. 254, 571-7.

[338] Benichou,S., Bomsel,M., Bodeus,M., Durand,H., Doute,M., Letourneur,F., Camonis,J., and Benarous,R. (1994). Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J. Biol. Chem.,* 269, 30073-30076.

[339] Rose MD., Winston F. and Hieter P. (1990). Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

[340] Vojtek A. B., Hollenberg S. M. and Cooper J. A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. 74, 205-14.

[341] Le Bouffant F., Capdevielle J., Guillemot J. C. and Sladeczek F. (1998). Characterization of brain PCTAIRE-1 kinase immunoreactivity and its interactions with p11 and 14-3-3 proteins. *Eur J Biochem*. 257, 112-20.

[342] Gluzman,Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell,* 23, 175-182.

[343] Pitard,B., Oudrhiri,N., Vigneron,J.P., Hauchecorne,M., Aguerre,O., Toury,R., Airiau,M., Ramasawmy,R., Scherman,D., Crouzet,J., Lehn,J.M., and Lehn,P. (1999). Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A,* 96, 2621-2626.

[344] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-85.