

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ (ED 502)

Année 2015

N° attribué par la bibliothèque

													10
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

**APPLICATION DES NOUVELLES STRATEGIES DE CRIBLAGE
GENETIQUE AUX TROUBLES DE LA CONDUCTION
CARDIAQUE**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Science de la vie et de la santé

Spécialité : Génétique moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Xavier DAUMY

Le 10 avril 2015, devant le jury ci-dessous

- Rapporteurs :* Mme Pascale GUICHENEY, Directeur de Recherche, Paris
M. Philippe MABO, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,
Université de Rennes
- Examineurs :* M. Hugues ABRIEL, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,
Université de Berne
M. Vincent PROBST, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier,
Université de Nantes
- Directeur de thèse :* M. Richard REDON, Directeur de Recherche, Nantes
- Co-directeur :* M. Jean-Jacques SCHOTT, Directeur de Recherche, Nantes

Remerciements

Je voudrais remercier beaucoup de personnes qui m'ont aidé au cours de cette thèse. Vous voulez qu'j'vous l'dise ? Ben j'vais vous l'dire.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je souhaite tout d'abord exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Hervé Le Marec, directeur de l'institut du thorax, pour m'avoir accueilli au sein de son unité, d'abord en stage en 2010 puis en thèse en 2011.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je voudrais remercier le Docteur Pascale Guicheney et le Professeur Philippe Mabo qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail en tant que rapporteurs. Leurs remarques et commentaires ont largement contribué à améliorer ce manuscrit. Je tiens également à remercier le Professeur Hugues Abriel et le Professeur Vincent Probst qui, eux aussi, m'ont fait l'honneur d'accepter d'être membres du jury et de consacrer du temps à l'examen de cette thèse.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je souhaite également remercier tous les membres de la grande équipe génétique dans laquelle j'ai passé plus de 3 années magnifiques. Je suis convaincu maintenant que la réalisation d'une thèse n'a rien d'individuel, et que sans votre aide, jamais je n'aurais pu faire ce que j'ai fait.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je me considère un peu comme le fruit de la passion de deux hommes ☺ : Richard et Jean-Jacques. Merci à vous deux de m'avoir proposé cette thèse, de m'avoir accueilli dans votre équipe, de m'avoir appris et montré ce qu'est cette discipline formidable (la génétique), merci pour les discussions que l'on a eues, pour tous les conseils que vous m'avez donnés, pour la confiance que vous m'avez accordée, pour tout le temps que vous m'avez consacré, merci de m'avoir donné les moyens de mener ces projets du mieux que je le pouvais.. Merci pour tout. J'ai vraiment beaucoup appris à vos côtés et ça a été un véritable plaisir de travailler avec vous.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je tiens à remercier mes frères/sœurs de thèse, Vincent, Marta, Rimbouille, JB, Romain, Pauline, Elodie qui ont partagé mon bureau. Rimbouille, tous les jours je suis mû par le désir de te remercier d'avoir introduit le ball dans nos vies. Merci pour les post-18h mémorables. On remet ça quand tu veux, tu as le choix dans la date. Merci Marta de m'avoir appris les mots « plupartie » et « mouvais », merci JB de m'avoir offert un ordinateur Apple, merci de m'avoir montré ce qu'est le niveau international du chamboul'tout, merci Vincent pour les parties pes, pour la télécommande... Merci à tous pour les discussions scientifiques que l'on a

eues aussi, merci Vincent de m'avoir consacré beaucoup de ton temps pour me montrer ce qu'est la génétique au début de ma thèse, merci JB pour tous les ECG que tu as revus pour moi, les infos cliniques que tu m'as données ; c'est bon tu peux me retirer des spams. Merci Marta pour tout ce que tu m'as appris en plus des nouveaux mots français, pour toutes nos conversations, merci Antoine pour les discussions que l'on a eues ; prosaïquement ça m'a beaucoup apporté.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je souhaite également remercier les 5 fantastiques : Hadja, Estelle, Stéphanie, Jade et Laëtitia. Hadja, merci pour la CGH... c'était bien... t'es la meilleure !;) merci pour ton cake-managing, pour tout ce temps que tu as pris pour moi, pour ta bonne humeur communicative, les fous-rires que tu m'as provoqués, volontairement ou non et merci d'avoir toujours été réceptive à la télécommande et de t'occuper tous les jours de notre enfant☺. Merci Estelle pour ton aide inestimable, pour tout le temps que tu as pris pour m'expliquer tout le travail que tu avais déjà réalisé sur les BAV avant que je n'arrive, merci de m'avoir formé avec Hadja et Simon sur les techniques de génétique. Stéphanie, merci pour ta bonne humeur chaque jour, pour les fous-rires que tu m'as provoqués également, presque tous les jours quand nos bureaux étaient côte à côte, merci de m'avoir aidé à réaliser de nombreuses validations capillaires, pour sans cesse m'avoir dit « qu'est-ce que je peux faire pour toi, dis-moi, j'peux manipuler pour toi si tu veux ». Merci Jade pour ta grande disponibilité, pour ton aide précieuse, pour ta participation active à ce travail, pour toutes les validations capillaires que tu as faites toi aussi. Merci Chups pour les discussions qu'on a eues, de m'avoir formé à mon arrivée en thèse, de m'avoir permis de mettre au point les techniques de NGS avec toi... Ça a été très enrichissant pour moi. Merci à toutes pour votre aide, pour vos conseils, pour tout le temps que vous m'avez consacré, pour votre bonne humeur et pour les discussions enrichissantes que l'on a eues, scientifiques ou non. Vous avez toutes toujours été là dès que j'avais une question... Vous m'avez très largement facilité la tâche et sans vous, il est évident que cette thèse ne serait pas ce qu'elle est.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je voudrais chaleureusement remercier Simon, oui n'est-ce pas ? Merci pour tes conseils, pour ton aide, pour les primers, pour tout ce que tu m'as donné à l'œil (oui n'est-ce pas ?). Merci pour m'avoir formé avec Estelle et Hadja. Merci pour les soirées au Delirium et les parties PES endiablées, les soirées mi-bière, mi-foot et re-me-bière derrière... J'espère qu'il y en aura beaucoup d'autres. Et merci à Cristiano d'être meilleur que Messi d'ailleurs ☺. Merci à Eric pour ton aide pour améliorer mes mini-scripts java, pour ton outil CGH, merci pour les soirées jeux, films, coupe du monde, patinage artistique, Dirty Dancing, la reine des neiges et pour ce débat capital : quelle est sa plus jolie robe ? ... Merci Pierre pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tout le temps que tu as consacré pour m'apprendre le bash et la

bioinformatique de manière plus générale, merci pour ton aide quotidienne, pour tous les fichiers que je te demandais de générer et/ou re-générer. Merci aussi pour les chansons que tu as chantées. Je ne les avais plus entendues depuis 1989. Merci aussi à Pierre-François que c'est un bioinformaticien, merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et les soirées. Merci à Madame Croque Monsieur...

Moi étudiant soutenant ma thèse, je tiens à remercier Floriane, Matilde et Christian. Merci pour votre aide précieuse, pour toutes les explications que vous m'avez données, pour le temps que vous m'avez consacré à m'expliquer les statistiques, les probabilités, les tests que vous utilisez. Merci Christian d'avoir continué les pronos Scorecast jusqu'au bout... Merci à vous trois pour toutes les conversations scientifiques ou non que l'on a eues et qui m'ont beaucoup apporté. Merci Floriane pour ces soirées que l'on a passées au labo pendant lesquelles tu m'as expliqué plein de trucs, mais pas que les GWAS ☺... Et merci Floriane de ne pas avoir continué les pronos Scorecast jusqu'au bout, tu m'aurais sûrement battu grrrrr ;)...

Moi étudiant soutenant ma thèse, je veux dire merci à Solena, merci pour tes conseils judicieux, merci d'avoir répondu aux centaines de questions que je t'ai posées, toujours avec le sourire... Nos échanges ont tous été très intéressants et m'ont permis d'envisager les projets dont je m'occupais sous un angle différent. C'est réellement un plaisir de travailler avec toi. Merci pour tout mais surtout pour avoir accouché le 16 février... héhé pour une fois que je gagne aux pronostics... Merci également à Julien pour nos conversations scientifiques ou non. Tes conseils très précieux m'ont permis de terminer ma thèse du mieux que je le pouvais. Merci également pour les soirées films cultes même si je suis sûr que tu ne retrouveras jamais aussi culte que Dikkenek. Alors faudra r'mettre le petit frère, le même donc hein ! Merci aussi à Florence et à la grande Steph pour toutes les infos que vous m'avez apportées et pour nos discussions au sujet des BAV sur lesquels vous avez travaillé avant moi. Reprendre la suite de vos études a été très enrichissant pour moi et vous avez largement facilité ma prise en main de ces projets.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je souhaite exprimer mes sincères remerciements à l'équipe biocoll, MF, Martine et Titi. Merci à vous pour toute l'aide que vous m'avez apportée durant ces trois années, ça a vraiment facilité mon travail, pour votre bonne humeur et merci de m'avoir bien entraîné au basket ☺. Merci aux différentes plateformes, génomiques et BIRD, merci à vous tous : Françoise, Aurore, Béatrice, Audrey D, Marine, Isabelle, Catherine, Audrey B, Raluca, Edouard... et tous ceux que j'oublie.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je remercie également l'équipe clinique pour leur aide précieuse et leur réactivité. Merci beaucoup aux ARCS, Swanny, Annabelle, Sabrina, Marie... Je suis bien conscient que je vous ai saoulé avec mes nombreux mails, et toujours vous y avez répondu très rapidement... Merci également à Aurélie d'avoir fait le lien entre clinique et recherche. Merci à tous les médecins avec qui j'ai pu collaborer, notamment Vincent, JB et Alban. Sans vous tous, tous ces travaux auraient tout simplement été impossibles.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je tiens à remercier les secrétaires, Ophélie, Coco, Marie-Pierre et Aurélie. Merci notamment à Ophélie de t'être occupé de tous mes déplacements et merci pour le quart d'heure supplémentaire que tu as pris pour terminer l'impression de ma thèse ;-). Merci à l'ensemble des membres de l'institut du thorax. Tous contribuent à la bonne ambiance qui y règne et qui facilite les échanges scientifiques ou non.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je voudrais également remercier l'Ecole Centrale de Lyon pour la formation qu'elle m'a apportée, les stages que j'ai dû faire sans lesquels je n'aurais certainement jamais réalisé cette thèse.

Moi étudiant soutenant ma thèse, je ne peux pas ne pas remercier tous mes amis de m'avoir aidé de près ou de loin lors de cette thèse notamment : merci aux prez CGL, merci à tous mes copains footeux, futsaleux, merci à tous les membres du FOCL pour tous les matchs du lundi, toujours invaincus en 2015 ;). Merci aux autres non footeux...

Moi étudiant soutenant ma thèse, je voudrais également remercier toute ma famille à commencer par Jacques-François, mon oncle, qui m'a permis de trouver un stage en 2010 dans l'institut, sans lequel je n'aurais pas réalisé cette thèse. Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu, supporté, encouragé et accompagné pendant toutes mes études, à mon frère, mes sœurs, mes beaux, ma belle-sœur, mes nièces et mes grands-parents. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Merci grand-père, tu m'as probablement transmis le virus de la cardiologie... sans aucun doute c'est génétique ! Enfin merci à Floriane, merci d'être là tous les jours maintenant, merci de m'avoir soutenu (et supporté) pendant les moments moins faciles, notamment durant la rédaction ; sans toi ça aurait été beaucoup plus difficile...

Moi étudiant soutenant ma thèse, je réalise que je ne soutiens en réalité pas ma thèse, mais le travail de toute une équipe, auquel énormément de gens ont contribué, directement, indirectement voire sans le savoir... Merci à tous, et comme le disait Valéry : « Au revoir » ☺.

Table des matières

Avant-propos.....	1
A. Introduction.....	2
I. Evolution de la génétique.....	2
I.1. De l'hérédité de Gregor Mendel au génome à 1000 euros	2
I.2. De l'approche gène candidat aux études sur génomes entiers.....	4
II. Objectifs de la thèse	12
III. Bases de la physiologie cardiaque.....	14
III.1. Le cœur, une pompe biologique.....	14
III.2. L'activité électrique cardiaque normale.....	17
III.3. Echappements – foyers d'automaticité	19
III.4. Les potentiels d'action liés aux courants ioniques.....	21
III.5. Les canaux jonctionnels : les connexines.....	24
III.6. L'électrocardiogramme (ECG)	27
IV. Les troubles de la conduction (TdC) cardiaque.....	31
IV.1. Localisation du bloc	32
IV.2. Les différents degrés de blocs atrioventriculaires (BAV).....	34
IV.3. Les blocs de branches.....	37
IV.4. Traitements.....	39
IV.5. Deux pathologies.....	40
V. Génétique des BAV	45
V.1. Le premier gène, <i>SCN5A</i> :	45
V.2. <i>SCN1B</i> , régulateur de <i>SCN5A</i> :.....	53
V.3. Un autre canal ionique, <i>TRPM4</i> :.....	55
V.4. La connexine GJA5 :	61
V.5. Autres gènes impliqués	62
V.6. Variants fréquents dans les troubles du rythme et de la conduction cardiaques.....	70

B. Résultats.....	73
I. PROJET 1 : Recherche de variants rares responsables de formes familiales de BAV dégénératifs	73
I.1. Présentation du projet	73
I.2. Description clinique des familles.....	74
I.3. Résultats des analyses familiales	89
I.4. Discussion.....	100
I.5. Conclusion	108
I.6. Perspectives	108
II. PROJET 2 : Recherche de variants rares dans les gènes de susceptibilité aux TdC dégénératifs	110
II.1. Présentation du projet	110
II.2. Description clinique globale des patients	111
II.3. Résultats des analyses des cas sporadiques	112
II.4. Discussion.....	124
II.5. Conclusion	134
II.6. Perspectives	135
III. PROJET 3 : Recherche de variants rares responsables de formes congénitales de TdC137	
III.1. Présentation du projet.....	137
III.2. Description clinique globale des patients sélectionnés	137
III.3. Résultats des analyses des trios.....	140
III.4. Discussion	147
III.5. Conclusion et perspectives	149
C. Discussion générale, conclusions et perspectives.....	151
D. ANNEXES.....	159
I. Matériel et méthodes	159
I.1. Bio-collections utilisées.....	159
I.2. Séquençage capillaire	159

I.3.	Séquençage NGS	159
I.4.	Séquençage haut-débit – Illumina HiSeq 1000.....	164
I.5.	Analyses bioinformatiques primaire et secondaire.....	169
I.6.	Analyse bioinformatique tertiaire	171
I.7.	Visualisation des alignements.....	185
I.8.	Tests statistiques d’enrichissement.....	185
I.9.	Génotypage haut-débit.....	187
II.	Liste des gènes inclus dans le premier design du système de capture HaloPlex (BAVd) 190	
III.	Données cliniques des 95 patients constituant la plaque BAVd 1	193
IV.	Données de couverture des 95 patients BAV isolés séquencés à l’aide du kit HaloPlex 196	
V.	Articles publiés.....	199
V.1.	Article 2 : Revue sur les troubles de la conduction cardiaque.....	199
V.2.	Article 3 : Tests d’enrichissement sur une cohorte de patients atteints du syndrome de Brugada.....	200
E.	BIBLIOGRAPHIE.....	201

Table des figures

Figure 1 - Méthode d'identification des variants en fonction de la fréquence de l'allèle à risque et de l'intensité de son effet (odds ratio).	5
Figure 2 – Evolution du prix du séquençage d'un génome humain.....	11
Figure 3 - Schéma général du cœur humain.....	14
Figure 4 – Schéma de la circulation sanguine humaine.....	16
Figure 5 – Tissu de conduction cardiaque	18
Figure 6 – Représentation des potentiels d'action en fonction de la localisation des cellules.....	20
Figure 7 - Contribution des différents courants ioniques dans les potentiels d'action des cardiomyocytes ventriculaires (A) et des cellules pacemakers cardiaques (B).	23
Figure 8 – Structure des jonctions communicantes	25
Figure 9 – Schéma du profil d'expression des trois connexines cardiaques majoritaires.....	26
Figure 10 – Aspects caractéristiques des 12 dérivations de l'ECG	28
Figure 11 – Aspect classique de l'ECG	29
Figure 12 – Signification électrophysiologique de l'ECG.....	30
Figure 13 – Localisations des troubles de la conduction	31
Figure 14 – Localisation des blocs supra et infra-hissiens le long des voies de conduction	33
Figure 15 - Représentation électrocardiographique d'un BAV1	34
Figure 16 - Représentation électrocardiographique d'un BAV2 type Möbitz 1	35
Figure 17 - Représentation électrocardiographique d'un BAV2 type Möbitz 2.....	36
Figure 18 – Représentation électrocardiographique d'un BAV de haut degré 4/1	36
Figure 19 - Représentation électrocardiographique d'un BAV complet	37
Figure 20 – ECG avec aspects caractéristiques de blocs de branches	38
Figure 21 - ECG caractéristiques d'HBAG (A) et d'HBPG (B).....	39
Figure 22 – ECG d'un patient montrant le développement progressive des TdC.	41
Figure 23 – Topologie membranaire du canal sodique cardiaque	46
Figure 24 – Mutations <i>SCN5A</i> associées aux TdC, isolés ou non	52
Figure 25 – Topologie et mutations du canal TRPM4.....	57
Figure 26 – Représentation du gène <i>LMNA</i> et des deux isoformes majoritaires codées par le gène (Lamine A et C)	65
Figure 27 – Schéma représentant les principales atteintes liées aux laminopathies	66
Figure 28 – Répartition des 301 premières mutations du gène <i>LMNA</i> en fonction des phénotypes associés.....	67

Figure 29 - Exemple du Manhattan plot montrant l'association d'un SNP localisé dans le gène <i>SCN10A</i> avec l'intervalle PR dans une GWAS de 6543 individus.....	72
Figure 30 - Carte de la répartition des implantations de stimulateurs cardiaques pour des cas de TdC progressifs (BAVd) dans la région ouest de la France.....	73
Figure 31 – Electrocardiogramme du patient V-15 montrant un HBAG et BP.....	76
Figure 32 – Arbre de la famille A.....	77
Figure 33 – Electrocardiogramme du propositus III-6 montrant un BAV3.....	79
Figure 34 – Arbre de la famille B.....	80
Figure 35 - Locus de TdC de la famille B sur le chromosome 16.....	82
Figure 36 – Electrocardiogramme du patient VIII-10 montrant un HBAG et BP.....	84
Figure 37 – Arbre de la famille C.....	85
Figure 38 – Electrocardiogramme du propositus IV-12 montrant un BAV3 avec un échappement à morphologie QRS de BBD+HBAG.....	86
Figure 39 – Arbre de la famille D.....	87
Figure 40 – Représentation de la ségrégation du variant <i>LMNA</i> -E347K dans une partie de la famille A.....	93
Figure 41 – Ségrégation du variant G551R du gène <i>MMP2</i> dans la famille 2.....	97
Figure 42 – Variants identifiés dans le gène <i>TRPM4</i>	118
Figure 43 – Exemples de noyaux familiaux recrutés.....	120
Figure 44 – Résultats de l'étude d'association génome entier réalisé sur les 174 patients atteints de TdC.....	123
Figure 45 – Schéma de la préparation de la librairie pour un séquençage d'exome.....	161
Figure 46 – Représentation du principe de capture des régions codantes avant séquençage haut-débit.....	162
Figure 47 – Représentation des étapes du système de capture et d'enrichissement HaloPlex.....	163
Figure 48 – Matériel utilisé pour le séquençage haut-débit.....	165
Figure 49 – Génération des clusters lors du séquençage Illumina.....	166
Figure 50 – Réaction de séquençage de la technologie Illumina.....	167
Figure 51 – Etape de « flip-flap » pour le séquençage des brins anti-sens par la technologie Illumina ('paired-end').....	168
Figure 52 – Exemple de workflow Knime.....	172
Figure 53 - Workflow Knime pour les analyses familiales.....	174
Figure 54 – Workflow Knime pour les analyses HaloPlex.....	177

Figure 55 – Workflow Knime pour la recherche de variants <i>de novo</i> basée sur une approche $\text{pool}_{\text{patients}}/\text{pool}_{\text{parents}}$	180
Figure 56 – Workflow Knime pour la recherche de variants suivant l’hypothèse d’hétérozygotie composite	183
Figure 57 – Visualisation du variant <i>LMNA</i> -p.E347K.....	185

Liste des tableaux

Tableau 1 – Fréquences des principaux foyers d’automaticité	19
Tableau 2 – Gènes identifiés dans des formes isolées de BAV	45
Tableau 3 – Mutations <i>SCN5A</i> associées à des TdC, isolés ou non.....	50
Tableau 4 – Exemples de mutations <i>SCN5A</i> associées à des syndromes chevauchants, sans TdC	53
Tableau 5 – Mutations <i>SCN1B</i> associées à des TdC.....	55
Tableau 6 – Mutations <i>TRPM4</i> associées à des TdC isolés ou non	59
Tableau 7 – Mutations <i>TRPM4</i> associées à un BrS	60
Tableau 8 – Types de troubles de conduction identifiés chez les membres atteints des 4 familles recrutées (données de 2012).....	75
Tableau 9 – Caractéristiques cliniques des patients atteints de la famille A	78
Tableau 10 – Caractéristiques cliniques des patients atteints de la famille B.....	81
Tableau 11 – Caractéristiques cliniques des patients atteints de la famille C.....	83
Tableau 12 – Caractéristiques cliniques des patients atteints de la famille D	88
Tableau 13 – Tableau récapitulatif de la sélection des variants dans la famille A à l’aide de différents filtres mis en application à l’aide de Knime4Bio	90
Tableau 14 – Tableau récapitulatif de l’ensemble des 22 variants d’intérêt identifiés dans la famille A.....	91
Tableau 15 – Tableau récapitulatif du test de validation du variant E347K de <i>LMNA</i> dans la famille A.....	92
Tableau 16 – Tableau récapitulatif de la sélection des variants dans la famille B à l’aide de différents filtres mis en application à l’aide de Knime4Bio	95
Tableau 17 – Variant identifié sur le chromosome 16 à l’état hétérozygote chez 4 ou 5 patients de la famille B par GATK et/ou Samtools.....	96
Tableau 18 – Tableau récapitulatif du test de validation du variant G551R de <i>MMP2</i> dans la famille B.....	96
Tableau 19 – Tableau récapitulatif de la sélection des variants dans les familles C et D à l’aide de différents filtres mis en application à l’aide de Knime4Bio	99
Tableau 20 – Nombres de gènes inclus dans le design du kit HaloPlex 1	110
Tableau 21 – Tableau récapitulatif des 11 variants novels identifiés	113
Tableau 22 – Tableau récapitulatif des 34 variants rares identifiés	116
Tableau 23 – Tableau récapitulatif du nombre de patients et de variants identifiés	117

Tableau 24 – Tableau récapitulatifs des tests CAST pour les gènes significatifs et les gènes impliqués dans les TdC	121
Tableau 25 – Patients porteurs d’un variant dans le gène <i>JUP</i>	125
Tableau 26 – Patients de la plaque BAVd 1 chez qui plusieurs variants ont été identifiés	133
Tableau 27 – Données cliniques des 15 patients atteints de BAV congénital	138
Tableau 28 – Données cliniques des parents des 15 patients atteints de BAV congénital	139
Tableau 29 – Tableau récapitulatif des 19 variants <i>de novo</i> identifiés	141
Tableau 30 – Validations des variants d’intérêt chez les 15 enfants atteints de BAVc	142
Tableau 31 – Récapitulatif du nombre de variants identifiés à l’aide de cette hypothèse d’hétérozygotie composite	144
Tableau 32 – Récapitulatif des 66 variants validés par inspection visuelle grâce à l’outil IGV...	146
Tableau 33 – Tableau récapitulatif des voies physiopathologiques pouvant mener aux TdC	154
Tableau 34 – Liste des 163 gènes inclus dans le premier design du kit HaloPlex.....	192
Tableau 35 – Données cliniques des 95 patients sélectionnés pour constituer la plaque BAVd 1	195
Tableau 36 – Données de couverture des 95 patients BAV isolés séquencés à l’aide du kit HaloPlex.....	198

Liste des abréviations

BAV	Bloc AtrioVentriculaire
BAVc	BAV congénital
BAVd	BAV dégénératif
BAVX	BAV d'ordre X (X=1, 2 ou 3)
BBD	Bloc de Branche Droit
BBG	Bloc de Branche Gauche
BP	Bloc Pariétal
bpm	battement par minute
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i> (Hybridation génomique comparative)
CMD	CardioMyopathie Dilatée
CNV	<i>Copy Number Variation</i> (Variation de nombre de copies)
DS	Dysfonction Sinusale
ECG	ElectroCardioGramme
FA	Fibrillation Atriale
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i> (Etude d'association sur génome entier)
HB	HémiBloc
HBAG	HémiBloc Antérieur Gauche
HBPG	HémiBloc Postérieur Gauche
kb	kilobases
Mb	Mégabases
NAV ou nœud AV	Nœud AtrioVentriculaire
NSA ou nœud SA	Nœud Sinusal
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Nouvelle Génération de Séquençage)
PA	Potentiel d'Action
pb	paires de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction de polymérisation en chaîne)
PM	PaceMaker
SBr	Syndrome de Brugada

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polymorphisme d'un nucléotide unique)
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i> (Variant nucléotidique simple)
SQTL	Syndrome du QT Long
UTR	<i>UnTranslated Region</i> (Région non traduite)
TdC	Troubles de la Conduction
VCF (fichiers)	<i>Variant Call Format</i> (Format de fichiers listant l'ensemble des variants détectés lors d'un run NGS)

Liste des publications

- **Xavier Daumy***, Mohamed-Yassine Amarouch* *et al.* (* Equal contribution)
Basic Res Cardiol. « **A novel TRPM4 gain-of-function mutation is associated with human progressive familial heart block type I** »
(Manuscrit en préparation)
- **X. Daumy**, F. Kyndt, V. Probst, R. Redon, J.-J. Schott. 2014. « **Aspect génétique des troubles de la conduction cardiaque** » ***Archives des Maladies du Cœur et des Vaisseaux – Pratique*** 01/2014;2014(224):28–32.doi:10.1016/S1261-94X(14)70587-5
- S. Le Scouarnec, M. Karakachoff, J.-B. Gourraud, P. Lindenbaum, S. Bonnaud, V. Portero, L. Duboscq-Bidot, **X. Daumy**, F. Simonet, R. Teusan, E. Baron, J. Violleau, E. Persyn, L. Bellanger, J. Barc, S. Chatel, R. Martins, P. Mabo, F. Sacher, M. Haïssaguerre, F. Kyndt, S. Schmitt, S. Bézieau, H. Le Marec, C. Dina, J.-J. Schott, V. Probst, R. Redon. « **Testing the burden of rare variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for Brugada syndrome** », ***Hum Mol Genet.*** 2015 Feb 3. pii: ddv036. [Epub ahead of print], PMID: 25650408.
- Haloplex (en cours d'écriture)
- *LMNA* (article en préparation)

Avant-propos

Blaise Pascal a écrit "Le cœur a ses raisons que la raison ne connaît point". Cette phrase doit évidemment être prise au sens figuré. Mais est-il également possible d'accepter son sens propre ? Le cœur en tant qu'organe peut-il réagir à des mécanismes physiopathologiques qui le font accélérer, ralentir ou s'arrêter quelquefois sans que nous voulions en comprendre la cause et sans que nous le puissions surtout ?

De multiples pathologies très diverses associées au cœur ont été décrites : des inflammations (péricardite, endocardite...), des pathologies structurales (cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique...), des pathologies du rythme (syndrome de Brugada, syndrome de repolarisation précoce...), des pathologies de la conduction cardiaque (blocs atrioventriculaires...)... Ces pathologies peuvent intervenir à un stade avancé de la vie ou bien être présente dès les étapes les plus précoces de la cardiogénèse.

Bien que les causes de beaucoup de ces pathologies aient déjà largement été explorées, il reste encore trop de maladies inexplicées. C'est notamment le cas des troubles de la conduction (TdC) cardiaque, et plus précisément des blocs atrioventriculaires (BAV) qui constituent le sujet de cette thèse. Ils peuvent toucher les enfants – ce sont les BAV congénitaux que l'on peut diagnostiquer *in-utero* – et plus fréquemment les adultes, particulièrement les personnes âgées – ce sont les BAV dégénératifs.

Plusieurs gènes ont déjà été décrits dans cette pathologie permettant d'avancer certaines hypothèses physiopathologiques, mais la majorité des cas reste encore inexplicée justifiant mon travail de thèse. Pour cela, de nouvelles technologies de génétique générant des quantités énormes de données sont désormais à notre disposition. Le défi principal, le « data mining », consiste à hiérarchiser et à traiter ces données afin d'en tirer l'information désirée.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon projet de thèse. L'utilisation de ces nouvelles technologies nous a permis d'envisager de nouvelles stratégies de criblage génétique, bien éloignées des premières heures de la génétique.

A. Introduction

I. Evolution de la génétique

I.1. De l'hérédité de Gregor Mendel au génome à 1000 euros

La génétique naît au XIX^{ème} siècle avec les travaux sur l'hérédité de Gregor Mendel. Un temps oubliés, ces travaux, redécouverts en 1900, sont, avec la découverte des chromosomes, à l'origine de multiples travaux qui contribuent encore aujourd'hui à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de nombreuses maladies.

En 1915, Thomas Morgan démontra l'existence des gènes situés sur les chromosomes, véritables entités d'information génétique permettant la transmission des caractères génétiques. Ce n'est qu'un demi-siècle plus tard, en 1953, que la base de la structure en double hélice de l'ADN fut décrite. Dans les années 1960, François Jacob et Jacques Monod élucidèrent le mécanisme de la synthèse des protéines (Jacob et Monod 1961) et le principe de code génétique fut admis.

A la fin des années 70, Frederick Sanger et son équipe mirent au point une technique révolutionnaire permettant le séquençage de l'ADN par synthèse enzymatique (Sanger, Nicklen, et Coulson 1977). C'est à cette période que les premières régions chromosomiques impliquées dans des pathologies ont été identifiées. Au cours des années 80, les généticiens se sont surtout intéressés aux maladies dont ils connaissaient ou suspectaient les mécanismes en isolant la protéine responsable et en remontant au gène. Les gènes étaient alors massivement séquencés à l'aide de la technique développée par Sanger améliorée à la fin des années 80 avec l'avènement de la PCR (en anglais *Polymerase Chain Reaction*).

Les travaux réalisés restaient alors individuels et ne faisaient pas progresser la communauté scientifique dans sa compréhension générale du génome humain. C'est en 1990 que le Projet Génome Humain (PGH) vit le jour. Il s'agissait d'un projet international, doté d'un budget global estimé à 3 milliards de dollars et piloté par le NIH américain (*National Institutes of Health*), qui visait à établir la séquence complète du génome humain dont les ébauches ont été publiées en 2001 (Lander et al. 2001) dans la revue *Nature*, et finalement complétée en 2004 (I. H. G. S. Consortium 2004). Une compagnie privée, Celera Genomics, publia également en 2001, dans la revue *Science*, les séquences brutes du génome humain, utilisant ses propres données ainsi que celles publiées au fur et à mesure par le consortium international (Venter et al. 2001).

Suite au PGH, un nouveau projet a vu le jour, ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*), dont le but était d'étudier la fonction des 25 000 gènes humains découverts par le PGH. Ce projet a montré que sur les 3 milliards de paires de bases de l'ADN humain, seuls 1,5 % constituent les gènes codants, et a supposé que 80 % du reste du génome pourrait avoir une fonction biochimique (T. E. P. Consortium 2012).

Suite à la complétion de la séquence du premier génome humain, la demande de méthodes de séquençage plus rapides et moins onéreuses s'est fait entendre. C'est ainsi qu'en 2004 est apparu le séquençage haut-débit (NGS pour *next-generation sequencing*) avec la présentation du 454 FLX Pyrosequencer de Roche (Margulies et al. 2005), basé sur le pyroséquençage, 500 fois plus rapide et 50 fois moins cher que la méthode Sanger. D'autres technologies ont suivi parmi lesquelles le Solexa 1G Genetic Analyzer d'Illumina, le SOLiD System d'Applied Biosystems, l'HeliScope d'Helicos BioSciences, le PacBIO RS de Pacific Biosciences et l'Ion Torrent de Life Technologies, basées sur l'une des quatre principales méthodes : le pyroséquençage, le séquençage par synthèse, le séquençage par ligation ou le séquençage en temps réel (Metzker 2010). Aujourd'hui, le séquenceur NGS le plus utilisé est l'HiSeq d'Illumina qui peut générer 600 millions de reads (petites séquences issues du séquençage NGS) pouvant aller jusqu'à 200 pb de long. Le principe de séquençage par synthèse utilisé par cette technologie sera expliqué dans le paragraphe D.I.4 Séquençage haut-débit – Illumina page 164 de cette thèse.

Ces technologies, qui ont permis la publication de plus de mille papiers, modifient les approches utilisées par les chercheurs en leur fournissant des outils toujours plus précis et plus performants et permettent également d'ouvrir de nouveaux domaines de recherche biologique avec un large éventail d'applications pour de nombreux types d'échantillons. Alors qu'il a fallu près de dix ans et 3 milliards de dollars pour séquencer le premier génome humain, il est maintenant possible d'en séquencer un pour mille dollars en quelques heures grâce à l'HiSeq X Ten d'Illumina qui serait capable de séquencer près de 18 000 génomes par an selon la firme californienne (16 génomes en un run de trois jours (Check Hayden 2014a), et certains prédisent des prix de 200 à 300 dollars pour bientôt.

Ces technologies ne cessent d'évoluer et l'on voit aujourd'hui apparaître la troisième génération de séquençage dont l'un des principaux avantages est de n'utiliser qu'une molécule d'ADN, sans amplification nécessaire, et cela permettrait d'obtenir des reads plus longs avec moins d'erreurs (Branton et al. 2008; Mardis 2011). Une de ces technologies est basée sur l'utilisation de nanopores capables de séquencer de l'ADN avec une préparation minimale des échantillons, sans amplification et avec le potentiel de reads mesurant de 10 000 à 50 000 pb (Branton et al.

2008). L'ADN, en passant dans ces nanopores, subit une modification de son état électrique qui dépend de la forme, de la taille et de la longueur de la séquence d'ADN, pendant un certain laps de temps dépendant lui de chacun des nucléotides (Branton et al. 2008). Une amélioration de cette technologie jugée trop lente (Manrao et al. 2012) a été proposée. Elle est basée sur l'effet tunnel dépendant de la structure électronique des bases par rapport à l'électrode de mesure (position relative, géométrie, état d'énergie des électrons...) et permet une différenciation statistique et rapide des différentes bases constituant l'ADN (Ventra 2013). La détection de bases d'ADN (S. Chang et al. 2010), la différenciation entre une cytosine méthylée et une cytosine non-méthylée (Tsutsui et al. 2011) et le séquençage de plusieurs oligomères d'ADN et de micro-ARN ont été récemment réalisés en utilisant cette approche basée sur l'effet tunnel (Ohshiro et al. 2012). On peut alors imaginer dans un avenir proche l'avènement d'une véritable médecine personnalisée avec des pratiques médicales (diagnostic et choix de la procédure thérapeutique) sur mesure appropriées au génome du patient (Tsuji 2010). C'est dans cette optique que travaillent aujourd'hui deux entreprises récemment fondées : Quantum Biosystems (<http://www.quantumbiosystems.com/>) et Oxford Nanopore Technologies (<http://www.nanoporetech.com>). Cette start-up britannique a d'ailleurs déjà développé un prototype de séquenceur pas plus gros qu'une clé USB qui coûte à peine 1000 euros (Check Hayden 2014b).

I.2. De l'approche gène candidat aux études sur génomes entiers

Avec l'évolution incessante de ces technologies, des projets comme Ensembl, Exome Variant Server, 1000 Genomes, HapMap, UK10K ont vu le jour en même temps que se développent des bases de données telles que dbSNP de NCBI, qui recense les variations nucléotidiques soumises par de nombreux organismes, Human Gene Mutation Database de l'institut de génétique médicale de Cardiff, qui recense un grand nombre de mutations responsables de pathologies humaines héréditaires, et plus récemment la base de l'Exome Aggregation Consortium (ExAC) du Broad Institute qui liste l'ensemble des variants retrouvés sur un ensemble de 60 706 individus non apparentés dont l'exome a été séquencé. Toutes les informations de ces bases permettent de faciliter la compréhension du génome humain et de déterminer les gènes responsables des quelques 5000 maladies génétiques humaines répertoriées.

Les variants responsables de pathologies génétiques plus ou moins complexes ont été classés en trois catégories (Manolio et al. 2009) (Figure 1) :

- les variants rares à effet fort présentant une pénétrance élevée. Un patient possédant ce variant présente de grands risques de développer la pathologie.
- les variants fréquents à effet faible présentant une pénétrance faible ;
- les variants de fréquence intermédiaire présentant un effet modéré.

Les approches et stratégies employées par les généticiens, spécifiques à la recherche d'un type de variants, ont également évolué au fur et à mesure de l'évolution des technologies et des bases de données disponibles, ces dernières leur ouvrant de plus en plus de possibilités afin d'identifier les gènes en cause (Manolio et al. 2009; Tsuji 2010).

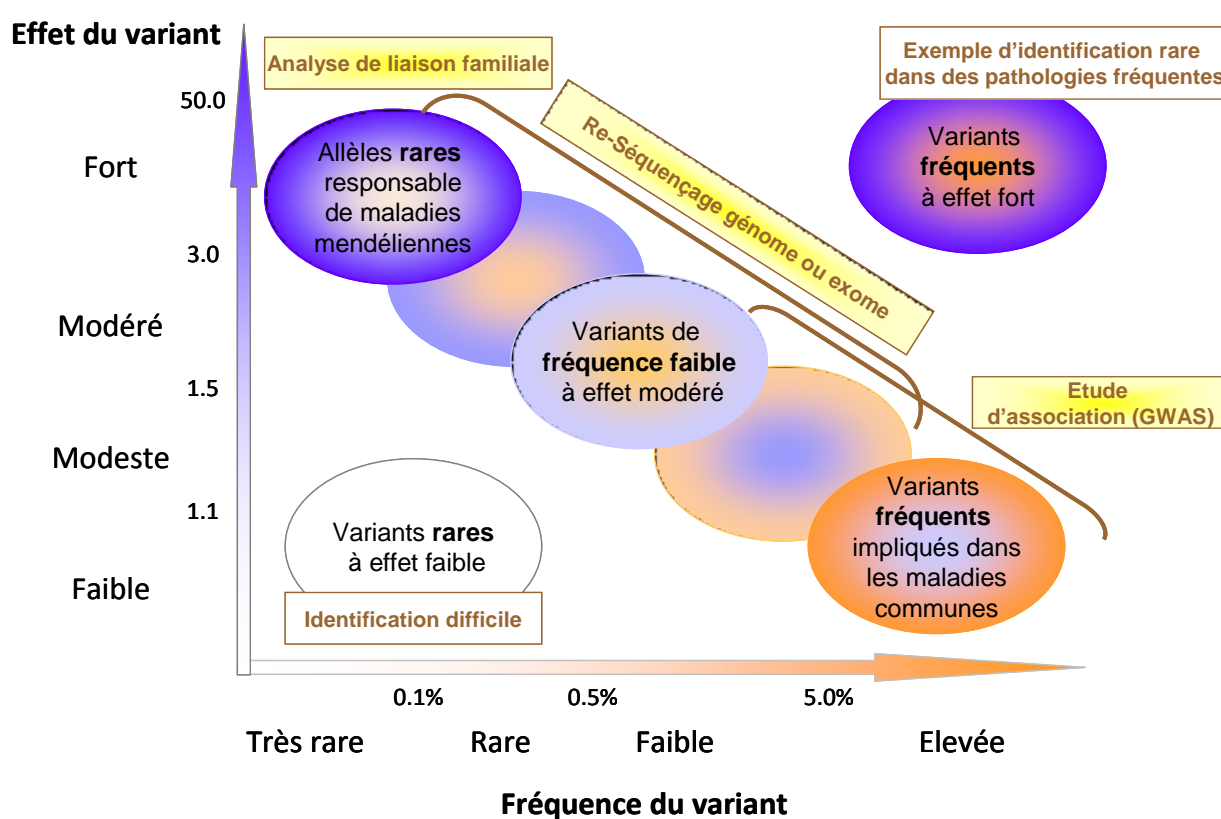


Figure 1 - Méthode d'identification des variants en fonction de la fréquence de l'allèle à risque et de l'intensité de son effet (odds ratio).

Les mutations rares dans la population générale avec un effet fort sur le phénotype et présentant une pénétrance élevée sont identifiables par des approches familiales. Les variants fréquents à effet faible sont identifiables par des études d'association. Les variants de fréquence moyenne ayant un effet modéré peuvent entre autres être identifiés par des approches hybrides couplant des analyses statistiques et du séquençage ciblé de régions codantes de gènes.

Modifié d'après (Manolio et al. 2009; Tsuji 2010)

➤ *Approches « classiques » - variants rares*

La première approche utilisée pour identifier des gènes responsables de pathologies est l'approche gène candidat. Elle consiste à émettre l'hypothèse de l'implication d'un gène en fonction de son rôle et de la protéine qu'il code, cette dernière pouvant, en cas de dysfonction, induire le phénotype observé. Mais malgré toutes les données de la littérature disponibles, cette approche reste limitée car les connaissances des mécanismes sous-jacents à de nombreuses pathologies sont encore inconnues.

Cette approche a ensuite été complétée par l'approche d'analyse de liaison. Cette dernière s'appuie sur l'existence de marqueurs génétiques permettant de faciliter l'identification de la localisation chromosomique plus ou moins précise du gène impliqué. Les principaux marqueurs utilisés sont les microsatellites, séquences répétitives d'un motif de di- ou trinuécléotides, et les SNP (en anglais « *Single Nucleotide Polymorphisms* »), variation d'un unique nucléotide fréquent dans la population générale (> 1 %). Avec le temps et l'amélioration des bases de données, les cartes constituées par ces marqueurs sont devenues de plus en plus denses ce qui a permis d'améliorer la résolution de la méthode.

Ces approches « classiques », complémentaires, – l'une permettant de séquencer les gènes candidats présents dans l'intervalle de liaison d'intérêt déterminé par l'autre – ont permis d'élucider au moins une partie des mécanismes physiopathologiques de centaines de maladies monogéniques, comme par exemple l'implication du gène *TRPM4* dans les TdC (de Meeus et al. 1995; P. A. Brink et al. 1995; Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010) (voir le paragraphe A.V.3 sur l'implication de *TRPM4* dans les TdC page 55). Ces approches ont néanmoins leurs limites : les loci identifiés contiennent généralement trop de gènes et si les gènes candidats ne donnent pas de résultat probant, la technologie de séquençage capillaire Sanger n'offre ni un débit ni un coût adéquat pour le séquençage de l'ensemble des gènes restants. La deuxième limite de ces méthodes réside dans le fait qu'elles reposent sur l'hypothèse que la pathologie étudiée est monogénique, recherchant un variant rare à effet fort, ce qui n'est pas toujours le cas (Figure 1).

En effet, l'application systématique de l'hypothèse selon laquelle les pathologies rares sont dues à des variants rares et les pathologies fréquentes à des variants plus fréquents est largement remise en question. L'étiologie génétique des pathologies semble plus complexe et l'on voit actuellement la notion de continuum se développer entre les formes monogéniques et polygéniques. Si un variant rare peut être responsable d'une pathologie rare, des variants fréquents peuvent en moduler l'effet et expliquer ainsi des défauts de pénétrance. On peut aussi

supposer qu'une combinaison rare de variants fréquents à odds ratio (score caractérisant le risque de l'impact physiopathologique du variant) élevé peut être à l'origine de pathologies rares. En outre une étude a montré qu'un certain nombre de variants rares peuvent causer une pathologie commune selon l'hypothèse '*common disease–multiple rare variants*' ('pathologie commune – multiples variants rares') (Tsuji 2010).

S'il est relativement peu difficile de trouver un variant rare à effet fort avec les approches « classiques » décrites précédemment combinées au recrutement de grandes familles génétiquement informatives (Mitsui et Tsuji 2014), il est beaucoup plus compliqué, avec ces mêmes méthodes, d'identifier des variants fréquents pouvant être responsables de pathologies fréquentes selon l'hypothèse '*common disease-common variants*' ('pathologie commune – variants communs') (Manolio et al. 2009).

➤ *Approche « statistiques des populations » - variants fréquents*

Pour des maladies communes et/ou non monogéniques, les approches « classiques » ne sont donc pas adaptées et une approche « population » a été développée au milieu des années 2000 ; il s'agit des études d'association sur génome entier (GWAS pour *Genome-Wide Association Study*) (Figure 1). Ces études d'association reposent justement sur l'hypothèse que les pathologies communes sont dues à des variants communs ('*common disease-common variants*') présentant un effet plus faible que les variants rares identifiés dans des analyses familiales. Elles consistent à tester un nombre très important de marqueurs génétiques présentant plusieurs allèles fréquents (microsatellites ou SNP, les microsatellites étant de moins en moins utilisés) répartis sur l'ensemble du génome dans des grandes séries de cas et de contrôles. Le nombre d'individus nécessaires dépend non seulement du risque de l'impact physiopathologique de l'allèle morbide, caractérisé par l'odds ratio, mais aussi de sa fréquence dans la population (Manolio et al. 2009; Tsuji 2010).

L'objectif est d'identifier des marqueurs pour lesquels on observe une différence statistiquement significative de fréquences alléliques entre les cas et les contrôles. La présence de l'allèle variant de ce marqueur prédispose statistiquement son porteur à la pathologie. Tout comme pour l'approche d'analyse de liaison développée au-dessus, cette approche permet d'obtenir un intervalle chromosomique d'intérêt, statistiquement lié à la pathologie.

Les GWAS ont déjà permis l'identification de centaines de variants génétiques associés à des pathologies ou caractères chez l'Homme et a permis de mieux comprendre leur architecture génétique (Manolio et al. 2009; Tsuji 2010). Cependant, la plupart des variants identifiés à ce jour présentent un odds ratio relativement faible (pour le porteur, l'augmentation du risque de développer la pathologie reste limitée) et ne permettent d'expliquer qu'une faible proportion de l'héritabilité estimée (Tsuji 2010; Eichler et al. 2010). Beaucoup de discussions sont actuellement en cours à ce sujet et nombreux sont ceux qui proposent des mécanismes reposant sur l'hérédité épigénétique pour expliquer, au moins en partie la '*missing heritability*' (héritabilité manquante) (Slatkin 2009; Eichler et al. 2010).

De plus, dans le cadre de travaux sur la maladie de Parkinson, il a été montré que les GWAS sont incapables d'identifier un locus présentant de multiples variants rares associés à la pathologie étudiée (Mitsui J et al. 2009; Satake et al. 2009). Il est difficile de détecter des variants rares en se basant sur des marqueurs génétiques fréquents (SNP dans ce cas). Ces résultats montrent les limites de cette approche et le caractère indispensable des stratégies de séquençage pour l'identification de ce genre de variants (Tsuji 2010).

➤ *Approches « haut-débit » - variants fréquents et rares*

La première génération de séquençage correspond au séquençage capillaire basé sur la méthode Sanger publiée à la fin des années 70 (Sanger, Nicklen, et Coulson 1977). Au milieu des années 2000 sont ensuite apparues les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS). Ces dernières permettent de réduire considérablement le prix du séquençage par base ainsi que le temps de séquençage et permettent d'envisager de nouvelles stratégies afin d'identifier des gènes responsables de pathologies communes et rares. La majorité de ces technologies sont basées des étapes successives communes : préparation des échantillons, séquençage et imagerie, puis traitement bioinformatique durant lequel les reads (petites séquences générées par les NGS de 100 à 500 pb en moyenne) sont alignés sur un génome de référence afin de détecter l'existence de SNV (Metzker 2010; Grada et Weinbrecht 2013).

En effet, avec ces technologies, il est possible de séquencer le génome, l'exome, le transcriptome des patients ou encore de réaliser le séquençage systématique d'un nombre important de gènes chez un grand nombre de patients (Metzker 2010; Grada et Weinbrecht 2013). Elles peuvent ainsi constituer une automatisation de l'approche classique basée sur le séquençage capillaire Sanger sans avoir à préjuger de l'implication de gènes subjectivement

supposés candidats. Elles facilitent également le diagnostic génétique en permettant le séquençage d'un nombre important de gènes impliqués dans une pathologie (Metzker 2010). Elles peuvent également compléter les approches d'analyse de liaison ou d'étude d'association en permettant le séquençage complet de l'ensemble des gènes présents dans l'intervalle de liaison ou dans le locus d'intérêt.

Les applications de ces technologies ne cessent de se développer (catalogage du transcriptome de cellules, tissus et organismes (séquençage d'ARN) (Z. Wang, Gerstein, et Snyder 2009), détection de CNV¹ (M. Zhao et al. 2013), assemblage *de novo* du génome de bactéries ou d'eucaryotes inférieurs, étude des marques épigénétiques et de la chromatine en utilisant d'autres méthodes basées sur le séquençage (CHIP-Seq, méthyl-Seq) (Wold et Myers 2008), classification phylogénétique d'espèces et découvertes de gènes par des études métagénomiques (Petrosino et al. 2009). On observe aussi l'émergence d'études d'association variants rares-pathologies complexes basées sur le séquençage haut-débit pour lesquelles de nombreuses méthodes ont été développées afin d'analyser simultanément des SNVs en les regroupant dans une région (par exemple un gène) (G. T. Wang et al. 2014).

Mais ces technologies et toutes leurs applications génèrent énormément de données qu'il faut ensuite stocker mais surtout traiter afin d'en sortir l'information recherchée. C'est là le principal défi qui accompagne les NGS. L'analyse bioinformatique se décline en trois plans :

- l'analyse primaire : elle correspond au traitement des fichiers images générées lors du séquençage et aboutit à la génération de fichiers fastq répertoriant les séquences des reads ;
- l'analyse secondaire : elle correspond à l'alignement de ces reads contre un génome de référence, à la détection de variants et à leur annotation générant au final des fichiers VCF² ;
- l'analyse tertiaire : elle consiste à l'application de filtres basés notamment sur les bases de données disponibles afin d'identifier le ou les variant(s) intéressant(s) parmi tous ceux listés dans le fichier VCF. A titre d'exemple, pour une analyse du séquençage de l'exome d'un patient, un fichier VCF brut, issu de l'analyse

¹ CNV : *Copy Number Variation* pour variation du nombre de copies. Il s'agit d'une forme de polymorphismes correspondant à des réarrangements chromosomiques de plus de 1 kb tels que des insertions ou des délétions. Plus de 12 % du génome humain serait concerné par le polymorphisme de nombre de copies géniques (Redon et al. 2006).

² VCF pour *variant call format* : il s'agit d'un format de fichiers créé pour le projet 1000 Genomes et collectivement adopté par la suite par la communauté scientifique. Ces fichiers sont générés lors de l'ultime étape de l'analyse secondaire bioinformatique des données issues d'un run NGS et listent l'ensemble des variants détectés (Danecek et al. 2011).

secondaire et sans aucun filtre de qualité, peut contenir jusqu'à plus de 100000 variants. La difficulté consiste à choisir et utiliser les bons filtres en fonction de plusieurs critères qu'il faut hiérarchiser (rareté de la pathologie, mode de transmission et mécanismes physiopathologiques supposés...), afin de retrouver le ou les quelques variant(s) qui nous intéresse(nt).

De plus en plus de bases de données et d'outils sont développés afin de faciliter ces recherches comme par exemple Knime4Bio, outil développé par notre équipe et utilisé lors de cette thèse (Lindenbaum et al. 2011), dont le principe d'utilisation sera développé en annexe au paragraphe D.I.6 – Analyse bioinformatique tertiaire page 171.

Le développement des NGS est tel que la baisse du prix du séquençage est plus importante que celle du stockage des NGS (Baker 2010) et de nouvelles idées de stockage, incluant l'utilisation de clouds dédiés, sont proposées (Stein 2010).

De plus, bien qu'elles soient moins coûteuses en temps et en argent que la première génération de séquençage et malgré la chute continue des coûts (Figure 2), les NGS restent trop coûteuses pour beaucoup de laboratoires qui doivent investir plus de 100 000 dollars pour acquérir un séquenceur NGS. Une autre limite de cette seconde génération de séquençage consiste en l'utilisation de reads de faible longueur (de 100 à 500 pb en moyenne) qui peuvent poser des problèmes d'alignement, notamment dans des zones répétées de l'ADN, et générer des erreurs de séquences (Grada et Weinbrecht 2013). Enfin, l'utilisation de NGS pose de nouveaux problèmes éthiques avec une probabilité plus importante de réaliser des découvertes fortuites par rapport aux techniques classiques de séquençage capillaire (Davey 2014). Le recrutement de volontaires, pour la constitution de biobanques publiques notamment, soulève également de nombreuses questions concernant le type de consentement à utiliser et leur confidentialité. Dans ce débat, deux principales positions peuvent être discernées : une politique de divulgation restrictive (*'no feedback except life-saving data'* c'est-à-dire pas de retour sauf pour des données vitales) et une politique de divulgation (*'feedback if the results meet certain conditions'* c'est-à-dire retour d'informations si les résultats répondent à certaines critères). L'enjeu de ce débat est de trouver le meilleur équilibre possible entre les avantages éventuels de la divulgation et les méfaits d'empêcher indûment la recherche biomédicale (Bredenoord et al. 2011).

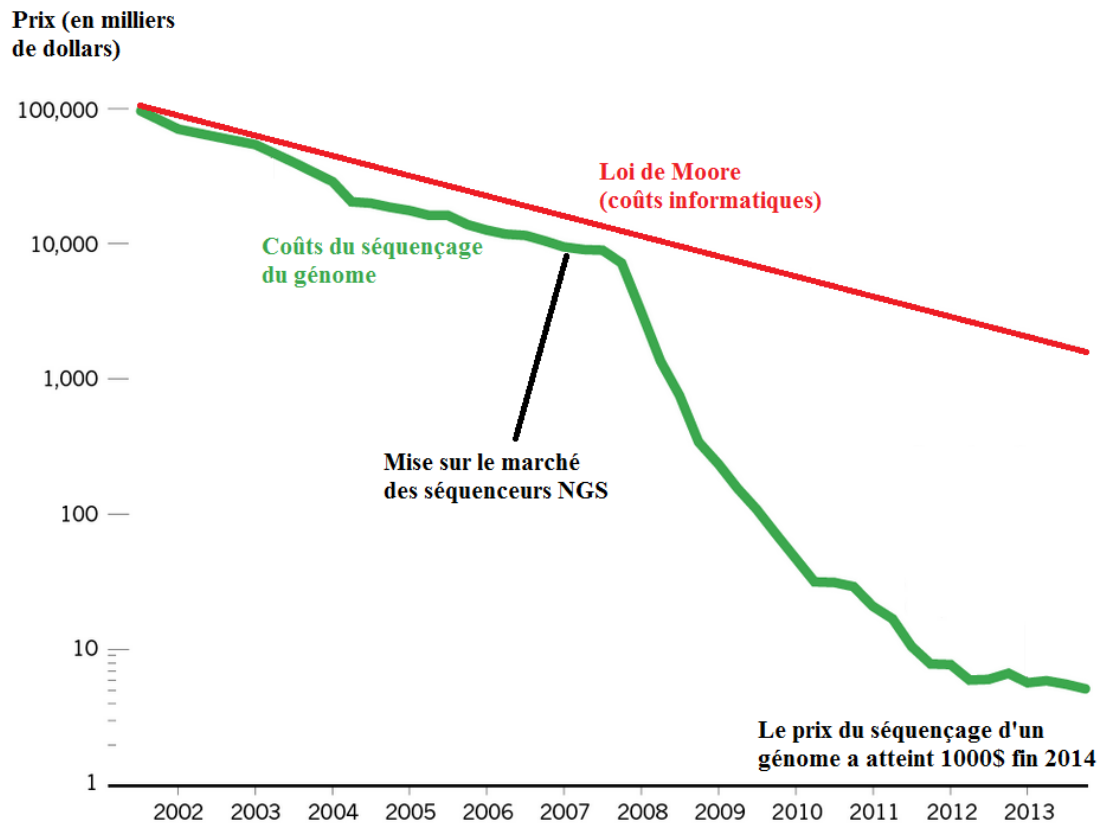


Figure 2 – Evolution du prix du séquençage d’un génome humain

Les coûts du séquençage du génome n’ont cessé de diminuer, notamment avec la mise sur le marché des premiers séquenceurs NGS.

Modifié d’après (Check Hayden 2014c)

II. Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse vise à identifier de nouveaux variants génétiques responsables de troubles de la conduction (TdC) cardiaque, en particulier les blocs atrioventriculaires dégénératifs (BAVd) et congénitaux (BAVc). En effet, si plusieurs gènes ont déjà été décrits dans ces pathologies et permettent d'avancer certaines hypothèses physiopathologiques, la majorité des cas reste encore inexplicée.

Afin d'identifier ces nouveaux variants, de nouvelles stratégies basées sur l'utilisation des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) ont été utilisées. Ces dernières génèrent d'énormes quantités de données et le principal défi, le « *data mining* », consiste à hiérarchiser et à traiter ces données afin d'en tirer l'information utile. Ces technologies nous permettent néanmoins d'adopter des approches originales en fonction des pathologies étudiées et des hypothèses physiopathologiques émises.

➤ *BAVd - approche familiale :*

Une enquête épidémiologique réalisée par notre équipe a permis le recrutement de quatre grandes familles dans la région nantaise dont plusieurs membres sont atteints de BAVd. Les exomes de quatre à cinq patients par famille ont été séquencés. Les analyses ont été réalisées afin de rechercher des variants rares partagés par tous les individus atteints au sein d'une même famille.

➤ *BAVd – étude cas sporadiques*

En plus des quatre familles recrutées, une cohorte de plus de 300 patients isolés a pu être recrutée. Le screening de 163 gènes à implication cardiaque potentielle ou avérée a été entrepris sur 95 patients grâce à un système de capture dédié basé sur la technologie HaloPlex d'Agilent.

Cette technique permet une double approche :

- Approche gène candidat à haut-débit visant à identifier des variants rares dans des gènes d'intérêt chez un grand nombre de patients ;
- Approche statistique visant à identifier un enrichissement de variants rares dans une cohorte de patients atteints de BAVd par rapport à des populations contrôles.

➤ *BAVc – approche trios*

Notre équipe a constitué depuis 2009 la plus grande cohorte mondiale de 141 enfants atteints d'un BAVc non lupique. Parmi ces patients, 15 trios (enfant - père - mère) ont été sélectionnés suivant plusieurs critères (3 ADN disponibles, parents sains, pas d'antécédent familial). Les 45 exomes constituant ces trios ont été séquencés et les données ont été analysées suivant deux hypothèses :

- une hypothèse *de novo* recherchant un variant apparu chez l'enfant ;
- une hypothèse d'hétérozygotie composite recherchant deux variants dans un même gène chez l'enfant, chacun ayant été hérité d'un de ses parents.

L'ensemble des variants candidats a été testé et validé ou invalidé par séquençage capillaire.

III. Bases de la physiologie cardiaque

III.1. Le cœur, une pompe biologique

Le cœur est un organe fibromusculaire creux composé de quatre cavités, deux oreillettes et deux ventricules. Son rôle principal consiste à assurer la circulation du sang dans l'ensemble de l'organisme. Le cœur droit est composé de l'oreillette droite et du ventricule droit (Figure 3).

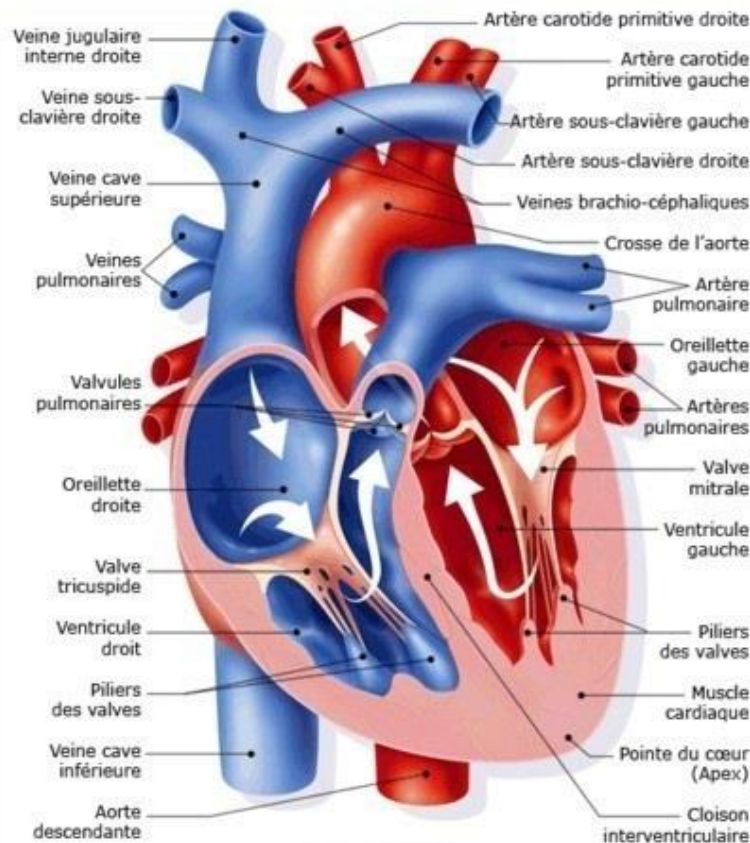


Figure 3 - Schéma général du cœur humain

Le cœur est composé de quatre chambres : deux oreillettes et deux ventricules, droits et gauches.

L'oreillette droite éjecte le sang dans le ventricule droit qui l'envoie dans la circulation pulmonaire. Le sang oxygéné arrive ensuite au niveau de l'oreillette gauche et est ensuite éjecté dans le ventricule gauche qui l'envoie assurer la circulation systémique.

Illustration tirée du site <http://associationpourlasanteetlenvironnement.skynetblogs.be/archive/2006/04/18/conference-systeme-cardiovasculaire-anatomie.html>

Il participe à la décarboxylation et la réoxygénation du sang en le faisant passer dans les poumons. De même, le cœur gauche est composé de l'oreillette gauche et du ventricule gauche. Plus puissant, il permet au sang de circuler dans tout le corps (Figure 4). Le cœur droit et le cœur gauche fonctionnent de façon synchrone, au sein d'une double circulation séquentielle, pulmonaire et systémique. Le sang pauvre en oxygène arrive au niveau du cœur par les veines caves supérieure et inférieure. Il est ensuite éjecté en passant la valve tricuspide dans le ventricule droit. Ce dernier, en se contractant, envoie le sang par l'artère pulmonaire dans les poumons, où il se débarrasse du dioxyde de carbone et se charge en dioxygène au niveau des alvéoles pulmonaires. Il revient ensuite au niveau de l'oreillette gauche par les quatre veines pulmonaires puis passe par la valve mitrale dans le ventricule gauche. La contraction de ce dernier éjecte enfin le sang dans l'aorte et permet d'assurer la circulation corporelle générale qui permet aux cellules des organes d'être en toutes circonstances approvisionnées en dioxygène et en nutriments.

Circulation pulmonaire

Le sang passe par les poumons pour s'y débarrasser du dioxyde de carbone et s'y charger d'oxygène.

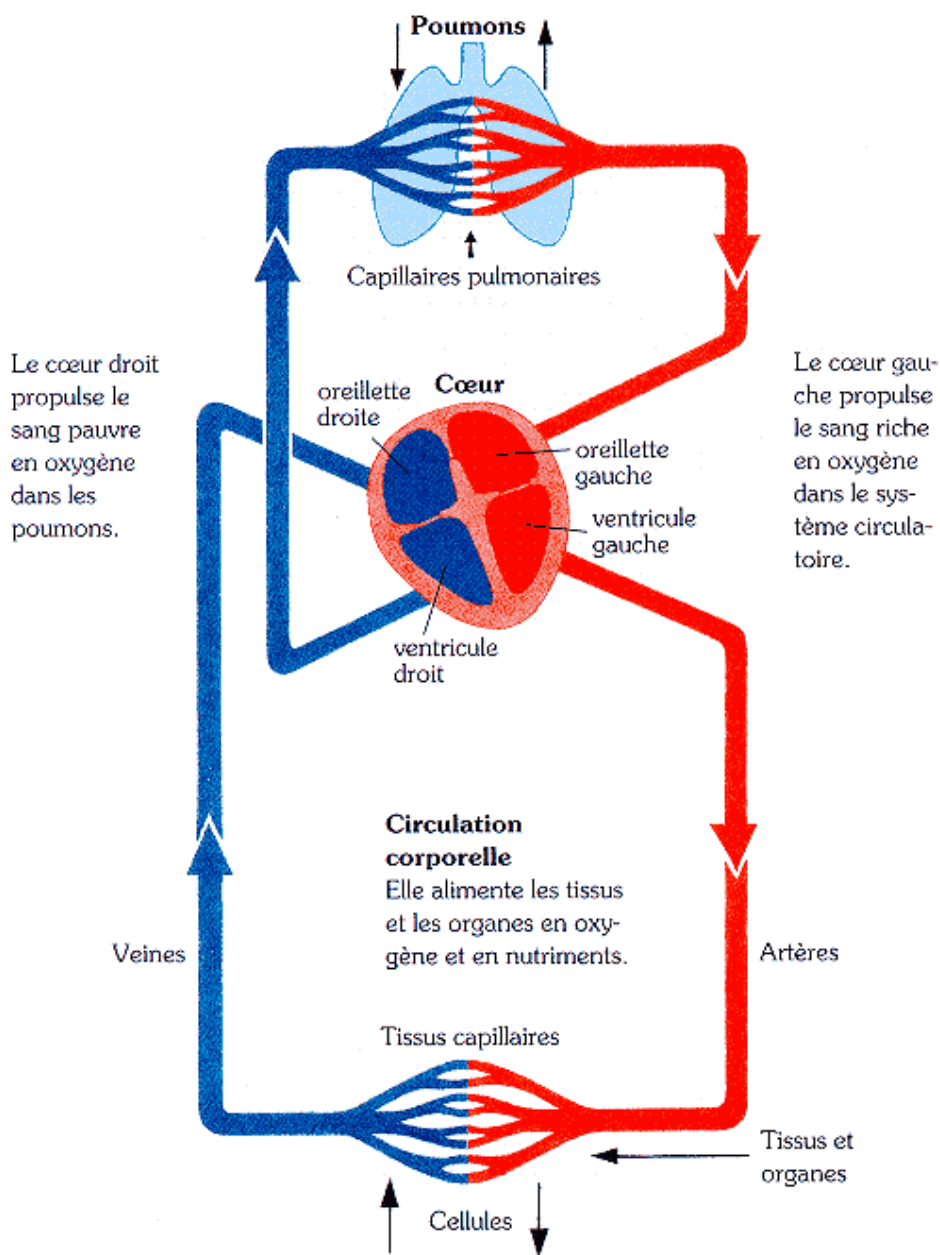


Figure 4 – Schéma de la circulation sanguine humaine

La circulation pulmonaire permettant l'oxygénation sanguine est assurée par le cœur droit et la circulation systémique, alimentant les tissus et les organes en oxygène et en nutriments, est assurée par le cœur gauche.

Modifié d'après <http://tperecuperation.unblog.fr/category/quest-ce-quun-effort-physique>

III.2. L'activité électrique cardiaque normale

La synchronisation des contractions oreillettes-ventricules est sous commande électrique. Le muscle cardiaque (ou myocarde) comporte en effet deux populations de myocytes : les myocytes contractiles, largement majoritaires, capables de se contracter en réponse à un stimulus électrique (excitabilité), et les myocytes formant le tissu nodal, capables de générer un tel stimulus (automaticité).

Ces myocytes spécialisés autoexcitables sont capables de se dépolariser (inversion de la polarité électrique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule par migration d'ions à travers la paroi) de manière autonome et rythmique et ainsi de générer des impulsions électriques appelées potentiels d'action (PA). Ces derniers, en se propageant au sein d'un tissu spécialisé, induisent *in fine* l'excitation cohérente des myocytes contractiles permettant ainsi au cœur d'assurer la fonction hémodynamique cardiaque en se contractant rythmiquement. Ses contractions surviennent de façon régulière en l'absence de toute stimulation externe, à une fréquence, chez l'adulte au repos, de l'ordre de 60 à 100 battements par minute (bpm).

L'activité électrique cardiaque normale naît au niveau du nœud sinusal (NSA) ou nœud de Keith et Flack, situé dans la paroi postérieure de l'oreillette droite, près de l'abouchement de la veine cave supérieure (Figure 5). Ce nœud, véritable pacemaker biologique, génère spontanément des potentiels d'action, à une fréquence d'environ 100 par minute, provoquant une dépolarisation qui se propage de proche en proche, de myocyte à myocyte, dans la paroi des oreillettes droite et gauche, entraînant ainsi la contraction atriale. Si l'orientation des fibres musculaires facilite la conduction au niveau de zones préférentielles, notamment au niveau du toit des oreillettes dans le faisceau dit de Bachman, il n'existe pas de tissu spécialisé permettant cette fonction dans les oreillettes.

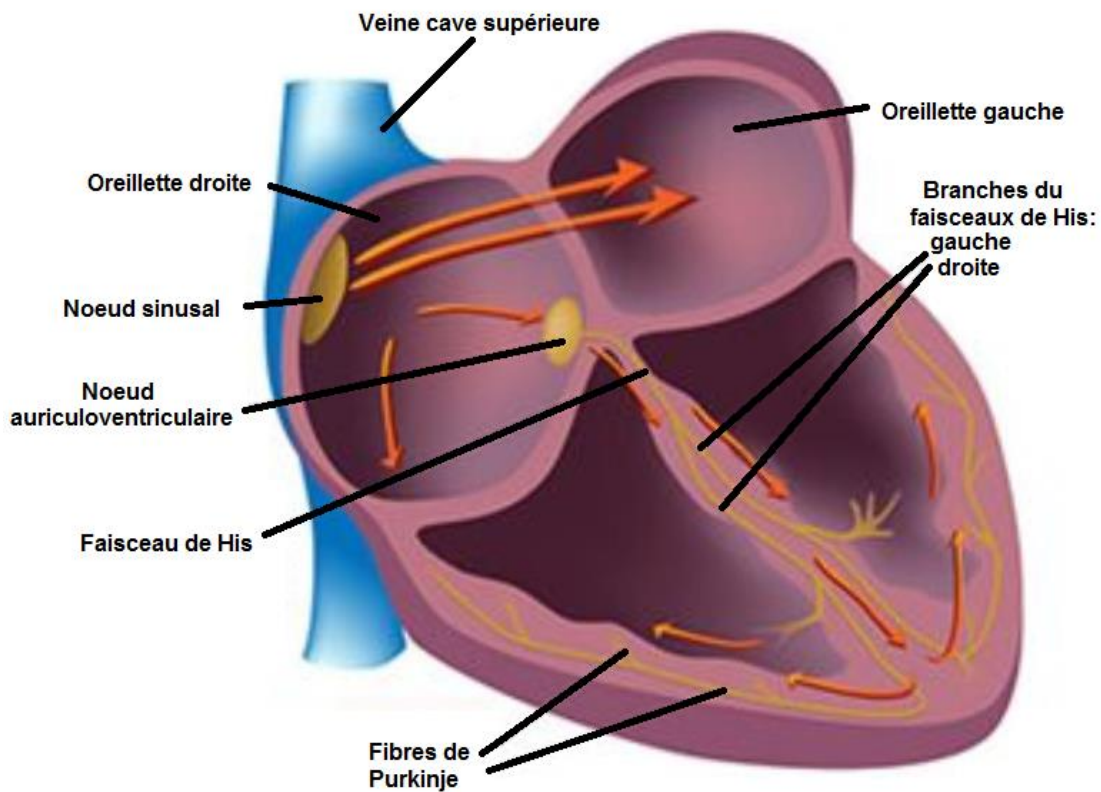


Figure 5 – Tissu de conduction cardiaque

L'activité électrique cardiaque naît au niveau du NSA, dans l'oreillette droite, puis est transmise de proche en proche dans l'oreillette droite et jusqu'au NAV. Elle est ensuite transmise dans le faisceau de His, dans ses branches et dans les fibres de Purkinje au niveau des ventricules.

Modifié d'après <http://www.docteurlic.com/encyclopedie/conduction-cardiaque.aspx>

La dépolarisation initiée dans le NSA atteint ensuite un deuxième amas de myocytes automatiques situé en avant de l'abouchement du sinus coronaire, dans la région postéro-inférieure droite du septum interatrial proche de la valve atrioventriculaire : le nœud atrioventriculaire (NAV) ou nœud d'Aschoff-Tawara. Ce dernier, lui aussi composé de cardiomyocytes automatiques, permet la transmission et le filtrage de l'activité électrique atriale aux ventricules. L'automatisme, en règle générale, plus lent que dans le NSA, n'apparaît que dans des conditions pathologiques. Le rôle principal du NAV tient donc dans sa capacité de transmission de l'influx électrique aux ventricules, qui de par son caractère décrémental, protège ces derniers d'une activation atriale trop rapide.

Le PA est ensuite conduit par le faisceau de His, seule voie de conduction physiologique atrioventriculaire, mesurant 1 cm au niveau du septum inter-ventriculaire et se divisant ensuite en deux branches, l'une fine à droite, et l'autre, à gauche, épaisse qui se divise elle-même très tôt

en deux branches (antéro-supérieure gauche et postéro-inférieure gauche). Ces branches se divisent ensuite en d'innombrables ramifications sous endocardiques, les fibres de Purkinje, qui permettent au PA d'atteindre l'ensemble des ventricules de façon synchrone.

III.3. Echappements – foyers d'automaticité

Les myocytes contractiles ont un potentiel de repos stable. Ils ne présentent aucune automaticité et ne se dépolarisent donc que lorsqu'une dépolarisation provenant d'un myocyte automatique ou d'un myocyte contractile voisin leur est imposée. Ils sont en revanche très excitables et très conducteurs, permettant ainsi la propagation du PA au sein de la cellule et d'une cellule à l'autre.

Les cellules constituant le tissu nodal présentent au contraire un potentiel de repos instable ce qui leur confère leur automaticité. Elles sont toutefois capables de se dépolariser à un rythme plus ou moins important et plus ou moins stable en fonction de leur pente de dépolarisation diastolique (Tableau 1). Plus la cellule est "haut-située", c'est-à-dire proche du nœud SA, plus la pente de dépolarisation diastolique est importante et plus la fréquence spontanée de contraction est rapide et relativement stable. Au contraire, plus la cellule est "bas-située", plus la pente de dépolarisation diastolique est faible et plus la fréquence spontanée est basse et instable (Figure 6).

Foyers	Automaticité (battements par min)
NSA	70 – 100
Foyers atriaux	60 – 80
Foyers jonctionnels (NAV, faisceau de His)	40 – 60
Foyers ventriculaires	20 – 40

Tableau 1 – Fréquences des principaux foyers d'automaticité

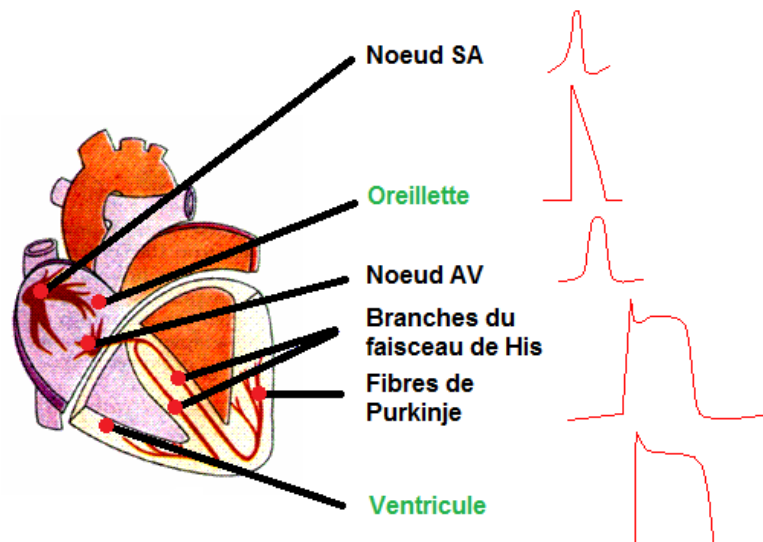


Figure 6 – Représentation des potentiels d’action en fonction de la localisation des cellules

En vert, les cardiomyocytes contractiles, non automatiques, possèdent un potentiel de repos stable. En noir, les cardiomyocytes automatiques présentent des pentes de dépolarisation diastolique non nulles et donc un potentiel de repos instable.

Modifié d’après <http://www.sante.univ-nantes.fr/med/physio/siteed/seance05/images05htm/figure02.htm>

Le nœud AV présente une fréquence de déclenchement spontanée des potentiels d’action moins élevée que le nœud SA de sorte que la dépolarisation provenant de ce dernier l’atteint avant l’apparition de son potentiel d’action spontané. En effet, selon la règle de la stimulation par entraînement rapide, la stimulation d’un foyer inhibe tous les foyers dont la fréquence intrinsèque est plus basse. Ainsi, dans le cadre de la conduction physiologique normale, la fréquence intrinsèque de dépolarisation du nœud sinusal (100/min) s’impose à l’ensemble du tissu nodal.

Néanmoins, le nœud sinusal est sous l’influence des systèmes nerveux sympathique et parasympathique, avec une dominance de ce dernier, ce qui permet de réguler la fréquence cardiaque autour de 70 bpm chez l’être humain adulte.

III.4. Les potentiels d'action liés aux courants ioniques

➤ *Le potentiel de repos*

Pendant la diastole électrique, les myocytes ventriculaires restent à un potentiel de membrane stable entre -80 et -85 mV. La différence de potentiel est due au déséquilibre des ions K^+ et Na^+ de part et d'autre de la membrane (l'intérieur de la cellule plus riche en K^+ étant chargé négativement, et l'extérieur plus riche en Na^+ positivement). Il est maintenu grâce à la pompe Na^+/K^+ ATP-dépendante.

La membrane cellulaire est perméable aux différents ions et des échanges sont possibles grâce à des protéines sélectives ou non, les canaux ioniques. Ils sont présents à la membrane sous différents états (fermés ou ouverts) selon l'effet de plusieurs stimuli (potentiel, ligand, étirement). Le potentiel de repos est principalement déterminé par le rapport de la concentration en potassium extracellulaire sur la concentration en potassium intracellulaire car la perméabilité membranaire aux ions K^+ est cinquante fois plus élevée que la perméabilité aux ions Na^+ , Cl^- ou Ca^{2+} . La modification du rapport de ces concentrations potassiques, induite par exemple lors d'une ischémie, peut modifier le potentiel de repos (Whalley, Wendt, et Grant 1995).

➤ *Le potentiel d'action*

Le potentiel d'action (PA) cardiaque correspond à une onde de dépolarisation transitoire. Il s'agit d'une modification brutale du potentiel membranaire de repos qui débute dans les cellules automatiques et qui est transmise de proche en proche, de cellule en cellule provoquant la contraction simultanée des cellules spécialisées dans le couplage excitation-contraction. Une trentaine de courants ioniques différents agissent au niveau cardiaque pour la genèse et le maintien du PA chez les vertébrés (Boyett et al. 1996).

L'onde de dépolarisation transitoire est déclenchée essentiellement par le courant I_f dans les cellules nodales (dépolarisation lente et spontanée) et par la dépolarisation des cellules voisines dans les cellules contractiles. L'ensemble des mouvements des ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- à travers les canaux ioniques spécifiques dépendants du potentiel et des échangeurs sont responsables du PA. La morphologie des PA est différente d'un type cellulaire à l'autre, selon que les cellules soient spécialisées dans l'automatisme, l'excitabilité, ou la conduction. Il existe également une hétérogénéité régionale (ventriculaire/atriale, épicarde/mid-myocarde/endocarde). Cette

hétérogénéité est due à une expression différentielle des canaux (Gaborit et al. 2007). Mais, d'une manière générale, le potentiel d'action des cardiomyocytes est constitué de cinq phases (Figure 7 - A) :

- Phase 0 : c'est la phase de dépolarisation des myocytes au cours de laquelle le potentiel membranaire devient positif (+30 mV). Cette inversion de potentiel est due à l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants (principalement $\text{Na}_v1.5$ codé par *SCN5A*) qui génère un courant sodique entrant I_{Na} (Abriel 2007) et par le phénomène de rectification entrante du courant I_{K1} qui devient nul.
- Phase 1 : il s'agit de la phase de repolarisation précoce due à l'inactivation du courant sodique et à l'activation de courants transitoires sortant potassiques dépendant du potentiel I_{to1} et I_{to2} . I_{to1} présente deux composante : $I_{\text{to,f}}$ généré par les canaux $\text{K}_v4.2$ et $\text{K}_v4.3$ et $I_{\text{to,s}}$ généré par les canaux $\text{K}_v1.4$. I_{to2} est activé par le calcium intracellulaire.
- Phase 2 : il s'agit d'une phase de plateau due à un équilibre relatif entre le courant calcique entrant dépolarisant $I_{\text{Ca,L}}$, principalement généré par les canaux *Cav1.2* et *Cav1.3* codés par les gènes *CACNA1C* et *CACNA1C* respectivement, et les courants potassiques sortant repolarisant I_{Kr} et I_{Ks} qui débutent leur activation et qui deviennent prédominants (Nerbonne et al. 2001; Marcantoni et al. 2007) . En plus du courant entrant $I_{\text{Ca,L}}$, on observe un relargage du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique par les canaux *RyR2* dans le cytoplasme qui se concentre beaucoup en ions Ca^{2+} . Afin de réguler cette concentration en calcium intracellulaire qui est responsable de la contraction cellulaire, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ fonctionne alors dans le sens entrée d'ions Na^+ /sortie d'ions Ca^{2+} , il en résulte un courant net entrant dépolarisant qui a tendance à ralentir la repolarisation et à former un plateau.
- Phase 3 : c'est la phase de repolarisation tardive due à la réduction des courants entrants (I_{Na} , $I_{\text{Ca,L}}$) et à l'augmentation des courants potassiques sortants I_{Kr} et I_{Ks} . La composante lente I_{Ks} est générée par le canal *KvLQT1* et sa sous-unité β *minK* codés respectivement par les gènes *KCNQ1* et *KCNE1*. La composante rapide I_{Kr} est, elle, générée par le canal *hERG* et sa sous-unité β *MiRP1* codés respectivement par les gènes *KCNH2* et *KCNE2* respectivement. Ces deux courants sortants ramènent le potentiel de membrane à sa valeur de repos.
- Phase 4 : il s'agit d'une phase de stabilisation du potentiel de repos due au courant sortant I_{K1} , généré notamment par les canaux *Kir2.1* et *Kir2.2* (Hibino et al. 2010).

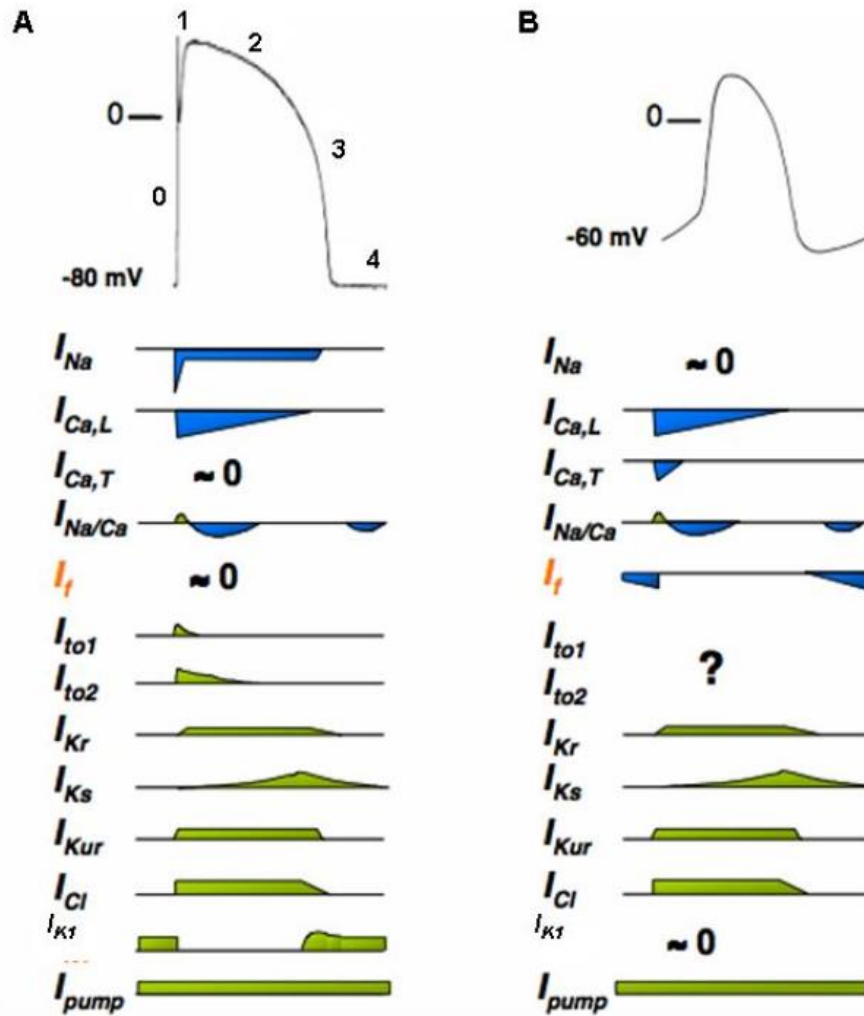


Figure 7 - Contribution des différents courants ioniques dans les potentiels d'action des cardiomyocytes ventriculaires (A) et des cellules pacemakers cardiaques (B).

Les zones pleines au-dessus en vert et au-dessous en bleu des lignes de référence représentent respectivement les courants sortants et entrants.

Les cellules automatiques du nœud sinusal et du nœud atrioventriculaire, contrairement aux cardiomyocytes contractiles, ne présentent pas de potentiel de repos stable entre deux PA (Figure 7 - B). L'absence de courant I_{K1} , généré par les protéines Kir2.1 et Kir2.2 est une des caractéristiques permettant le potentiel diastolique peu négatif et la phase de dépolarisation lente diastolique.

Suite à un PA, la cellule se repolarise jusqu'à un potentiel diastolique minimum de l'ordre de -60 mV. La membrane se dépolarise ensuite sous l'influence de différents courants comme celui

généralisé par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et le courant cationique entrant I_f , généré dans le cœur par les protéines HCN1, HCN2 et HCN4. La phase de dépolarisation diastolique va permettre d'élever le potentiel membranaire jusqu'au seuil de déclenchement des canaux Cav3.1 (responsable du courant calcique de type T) et Cav1.3, Cav1.2 (responsables du courant calcique de type L transitoire). Le PA se déclenche alors, et est suivi d'une phase de repolarisation dépendant des courants I_{to} , I_{Kr} et I_{Ks} .

III.5. Les canaux jonctionnels : les connexines

Des dispositifs de jonction très particuliers assurent la cohésion de l'ensemble des cellules myocardiques. Il s'agit de jonctions communicantes, les « *gap-junctions* ». Elles sont responsables de la communication électrique et moléculaire entre les cytoplasmes de deux cellules adjacentes et permettent un couplage qui assure la transmission rapide de la propagation de l'onde de dépolarisation d'une cellule à l'autre à travers le cœur et la contraction simultanée de l'ensemble des cellules contractiles individuelles (Barr, Dewey, et Berger 1965).

Les connexines, protéines membranaires constituant ces jonctions communicantes, présentent des durées de vie inférieures à 5h (Saffitz, Laing, et Yamada 2000). Elles s'associent en hexamères pour former des héli-canaux, les connexons, au niveau de la membrane plasmique (Söhl et Willecke 2004). L'association des connexons de deux cellules adjacentes forme un canal hydrophile fonctionnel qui permet le passage des ions et métabolites (Figure 8). Les connexons peuvent être formés de l'association de connexines distinctes.

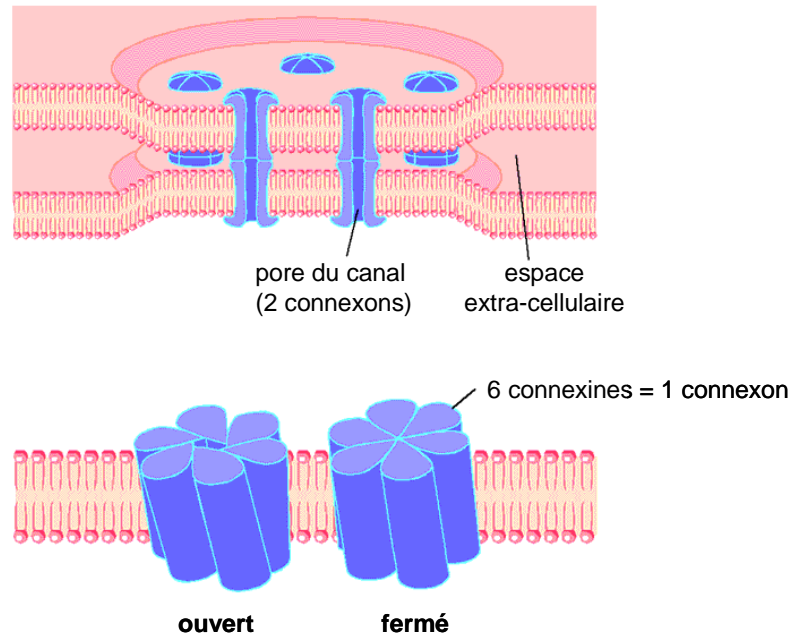


Figure 8 – Structure des jonctions communicantes

Les jonctions communicantes sont constituées de plusieurs canaux qui lient les compartiments intracellulaires de cellules adjacentes et permettent la communication intercellulaire.

Modifié d'après (Steel 1998)

Dans le cœur adulte humain, il existe trois connexines majoritaires. Elles ont été nommées d'après leur poids moléculaire et sont impliquées à la fois dans la conduction de l'activité électrique et dans la morphogénèse cardiaque [Lo, 2000]. La connexine-40 (Cx40), codée par *GJA5* est prédominante dans le tissu atrial et est aussi exprimée dans le faisceau de His ainsi que par les cellules endothéliales vasculaires mais peu dans le système de conduction ventriculaire. La connexine-43 (Cx43), codée par *GJA1*, est la connexine cardiaque majoritaire. Elle est présente à la fois dans les tissus ventriculaires et atriaux, dans les parties distales du système de conduction, dans les cellules du nœud AV mais pas dans celles du nœud SA. La connexine-45 (Cx45), codée par *GJC1*, est, quant à elle, principalement exprimée au niveau des jonctions nodales et du faisceau de His et de ses branches ainsi que dans les myocytes atriaux dans une moindre mesure (Figure 9) (Davis et al. 1995; Delorme et al. 1997; Vozzi et al. 1999; Saffitz et Schuessler 2000; Veen, Rijen, et Opthof 2001; Gaborit et al. 2007).

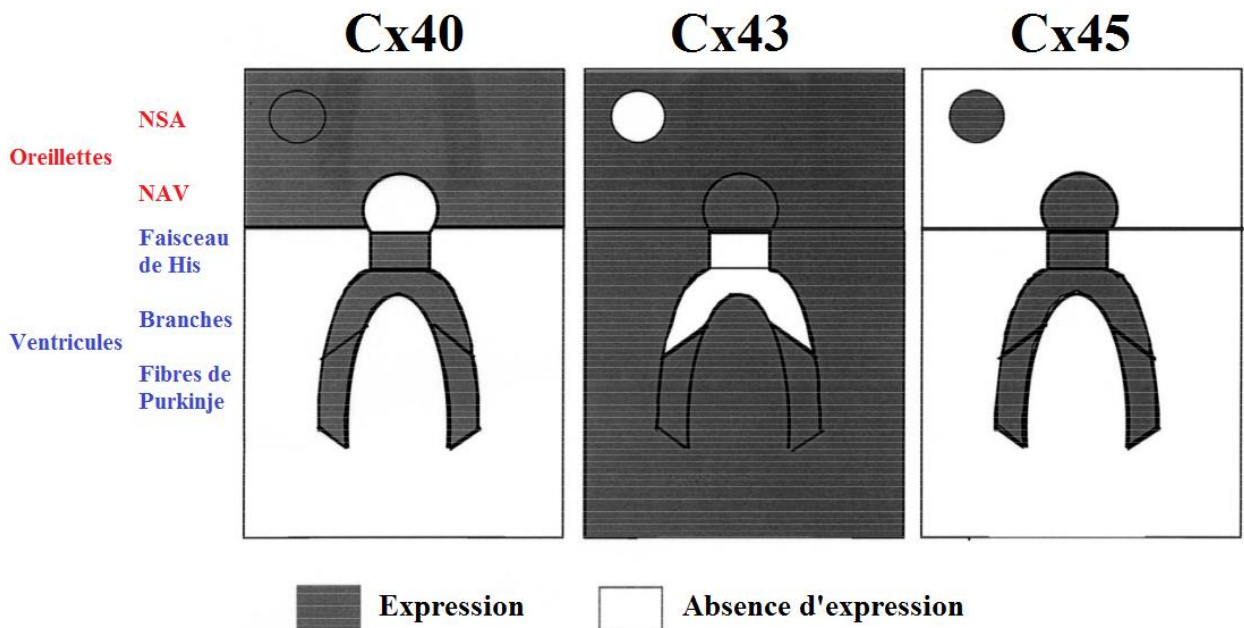


Figure 9 – Schéma du profil d’expression des trois connexines cardiaques majoritaires

NSA : Nœud sinusal ; NAV : Nœud atrioventriculaire

Ce schéma représente la moyenne des profils d’expression de Cx40, Cx43 et Cx45 dans les différentes régions du cœur de plusieurs mammifères. Ces profils diffèrent, expliquant les différences de vitesse de propagation du PA qui existent entre les différentes régions du cœur.

Modifié d’après (Veen, Rijen, et Opthof 2001)

D’autres connexines ont été décrites dans le cœur : les connexines 30, 37, 46, 50 et 57. Le taux d’expression des connexines et donc le nombre des jonctions communicantes diffèrent d’une région cardiaque à l’autre. En plus de cela, la taille de ces jonctions gap varie en fonction de la ou des connexine(s) impliquée(s). En effet, la Cx40 forme des canaux jonctionnels de grande conductance (200 pS), la Cx43 des canaux de conductance moyenne (60–100 pS) et Cx45 des canaux de faible conductance (20–40 pS). Tout cela permet d’expliquer les différences de vitesse de propagation du PA qui existent entre les différentes régions du cœur (Davis et al. 1995; Saffitz, Laing, et Yamada 2000; Veen, Rijen, et Opthof 2001; Kreuzberg et al. 2005; Temple et al. 2013).

III.6. L'électrocardiogramme (ECG)

A défaut de pouvoir visualiser le PA d'un unique cardiomyocyte *in vivo* chez l'Homme, il est possible d'enregistrer la sommation spatiale de l'activité électrique générée par la propagation de l'ensemble des PA cellulaires dans le cœur lors d'un examen non invasif appelé électrocardiogramme (ECG).

Les signaux électriques sont recueillis à la surface du corps par dix électrodes, l'une étant fixée à chacun des quatre membres et les six autres étant fixées sur la face antérieure de la poitrine. L'électrocardiogramme compare les phénomènes électriques recueillis par diverses électrodes et l'image obtenue est appelée « dérivation ». Chaque dérivation permet donc d'obtenir une image différente de l'activité électrique cardiaque.

Au total, douze dérivations sont classiquement enregistrées (Figure 10) :

- six dérivations « périphériques » (DI, DII, DIII (bipolaires) et VR, VL et VF (unipolaires)), enregistrées à l'aide des électrodes sur les quatre membres. Elles regardent le cœur dans le plan frontal. DII, DIII et VF donnent une vision de la paroi inférieure du cœur et DI et VL permettent d'obtenir une image de sa paroi latérale haute ;
- six dérivations « précordiales » (V1 à V6) regardant le cœur dans un plan horizontal, et plus particulièrement le ventricule gauche, le ventricule droit étant électriquement négligeable. V1 et V2 regardent la paroi antéro-septale du ventricule gauche, V3 et V4 regardent sa paroi antéro-apicale et V5 et V6 regardent sa paroi latérale basse.

Le tracé de chaque dérivation est caractéristique et semblable chez des sujets dont le cœur est normal. Des électrodes précordiales supplémentaires (V7, V8, V9, V3R, V4R, VE) sont couramment utilisées pour compléter l'analyse ECG de la paroi postérieure du ventricule gauche (V7, V8, V9) ou du ventricule droit (V3R, V4R, VE).

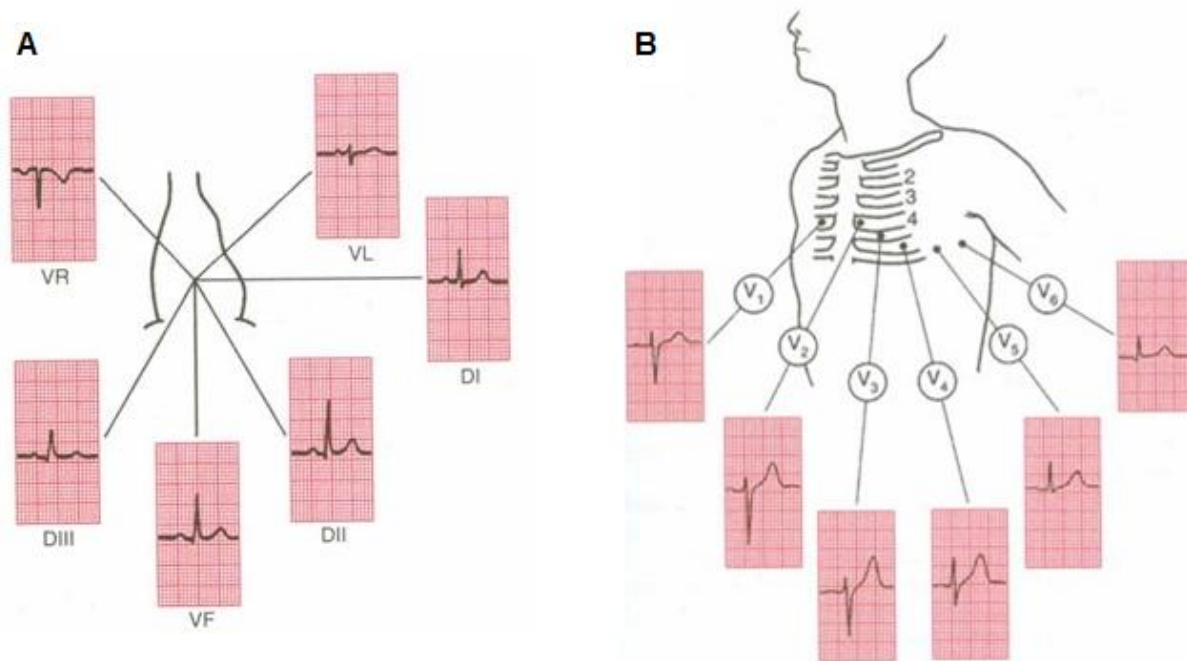


Figure 10 – Aspects caractéristiques des 12 dérivations de l'ECG

A : six dérivations « standard » regardant le cœur dans le plan frontal. B : six dérivations précordiales regardant le cœur dans le plan horizontal. Les électrodes des dérivations précordiales sont situées entre les 4^{ème} et 5^{ème} espaces intercostaux.

(Illustrations tirées de « L'ECG facile », cinquième édition, de John R. Hampton)

Classiquement, un ECG présente une suite de 3 ondes ou groupes d'ondes (Figure 11 et Figure 12) :

- l'onde P correspondant à la dépolarisation atriale. C'est une onde de petite amplitude, arrondie, parfois diphasique.
- le complexe QRS témoignant de la dépolarisation ventriculaire. La repolarisation atriale est caché à l'intérieur du QRS. La première déflexion négative s'appelle l'onde Q. Elle est de faible amplitude (moins du tiers du complexe QRS) et de durée brève (inférieure à 0,04 seconde). La première déflexion positive précédée ou pas d'une onde Q s'appelle l'onde R. Lorsqu'il existe deux ondes positives, la seconde est dénommée R'. L'onde négative qui fait suite à une onde R est notée S.
- l'onde T est le signe de la repolarisation ventriculaire. Elle est généralement dirigée dans le même sens que le complexe QRS. Sa forme est asymétrique, avec un premier versant en pente faible, un sommet arrondi et un 2^{ème} versant descendant en pente rapide.

Une onde U, positive de faible amplitude, faisant suite à l'onde T peut exister. Sa signification physiologique est encore mal connue et son origine reste discutée.

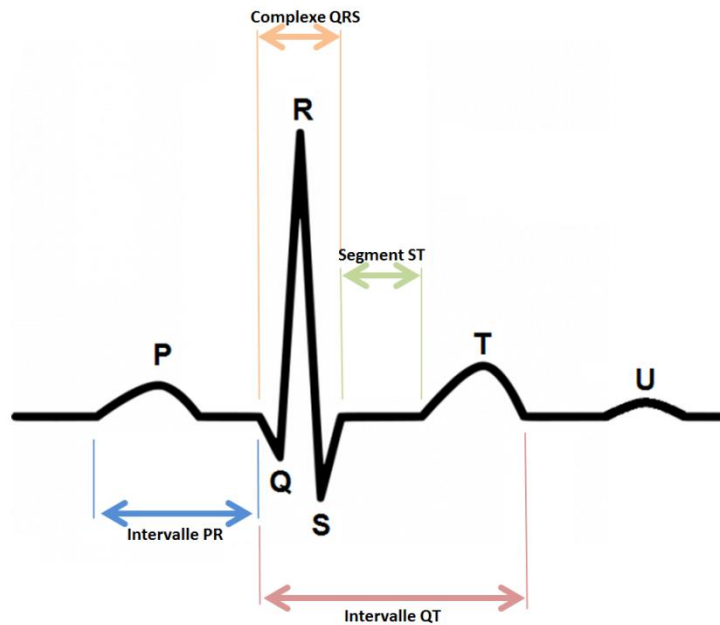


Figure 11 – Aspect classique de l'ECG

L'ECG classique se décompose en trois ondes ou groupe d'ondes : une onde P, un complexe QRS et une onde T. Une onde U peut exister mais sa signification est encore mal comprise.

Dans les conditions physiologiques normales, ces ondes et groupes d'ondes suivent quelques règles (Surawicz et al. 2009) :

- l'onde P doit durer moins de 0,12 s ;
- l'intervalle PR entre le début de l'onde P et le début du complexe QRS, correspondant au délai entre la dépolarisation des oreillettes et celle des ventricules, doit durer entre 0,12 et 0,20 s ;
- le complexe QRS doit durer moins de 0,1 s ;
- l'intervalle QT entre le début du complexe QRS et la fin de l'onde T, correspondant à l'ensemble de la dépolarisation et de la repolarisation ventriculaire (temps de systole électrique), a une durée qui varie en fonction de la fréquence cardiaque de manière inversement proportionnelle. On calcule alors le QT corrigé ($QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$) qui doit vérifier : $320 \leq QTc \leq 440$;
- le segment ST doit être isoélectrique sur toutes les dérivations.

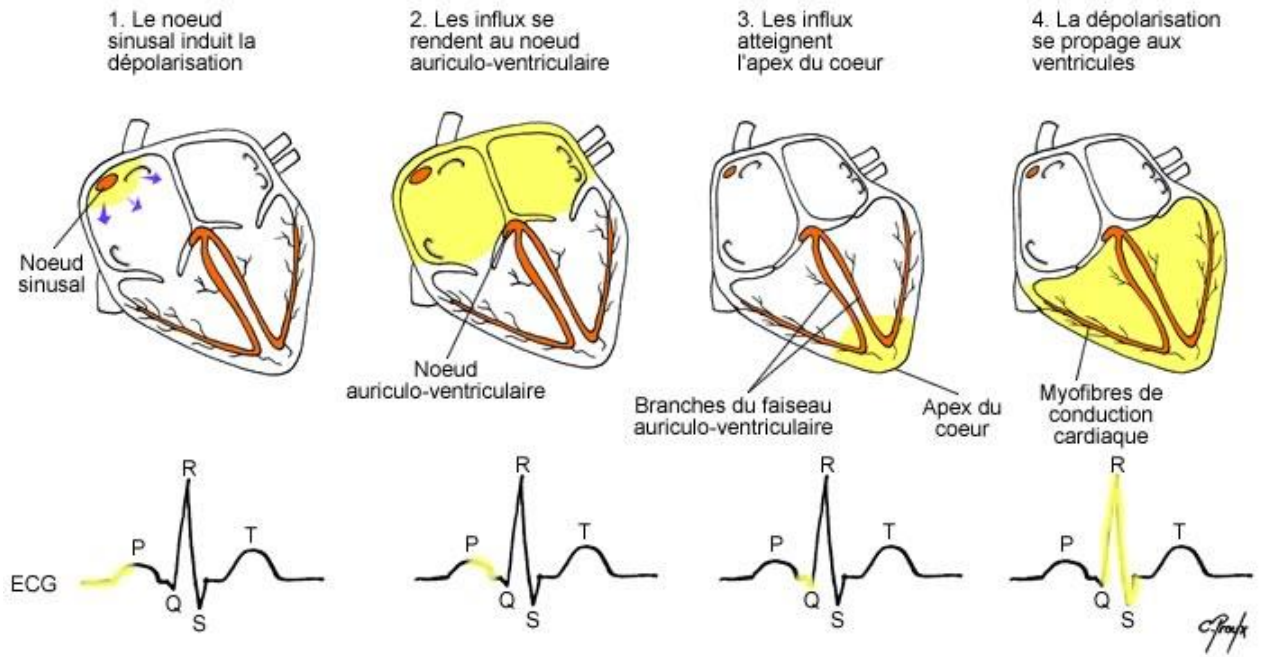


Figure 12 – Signification électrophysiologique de l'ECG

L'onde P correspond à la dépolarisation atriale, le complexe QRS à la dépolarisation ventriculaire et l'onde T à la repolarisation ventriculaire.

Illustration tirée du site <http://collettemathieu.blog.lemonde.fr/2010/02/17/cours-sur-la-rigidite-arterielle/>

IV. Les troubles de la conduction (TdC) cardiaque

Les troubles de la conduction (TdC) correspondent à un groupe hétérogène de pathologies affectant les voies de la conduction cardiaque. Celles-ci sont alors incapables de transmettre correctement l'onde de dépolarisation qui est alors ralentie ou bloquée. Ces troubles peuvent être paroxystiques et transitoires ou chroniques, et peuvent être plus ou moins graves en fonction de leur localisation et de leur degré d'atteinte.

Le TdC peut intervenir à n'importe quel endroit le long du tissu de conduction (Figure 13). Ainsi, il peut apparaître :

- au niveau atrial dans le cadre d'un bloc sino-atrial (BSA), entraînant une dysfonction sinusale (Taboulet 2014). Ce bloc peut être de type 1 (ralentissement de la conduction), de type 2 (conduction intermittente) ou de type 3 (absence de conduction) ;
- entre les oreillettes et les ventricules dans le cadre de blocs atrioventriculaires (BAV) ;
- au niveau du ventricule dans le cadre de blocs de branche, droits ou gauches, complets ou incomplets.

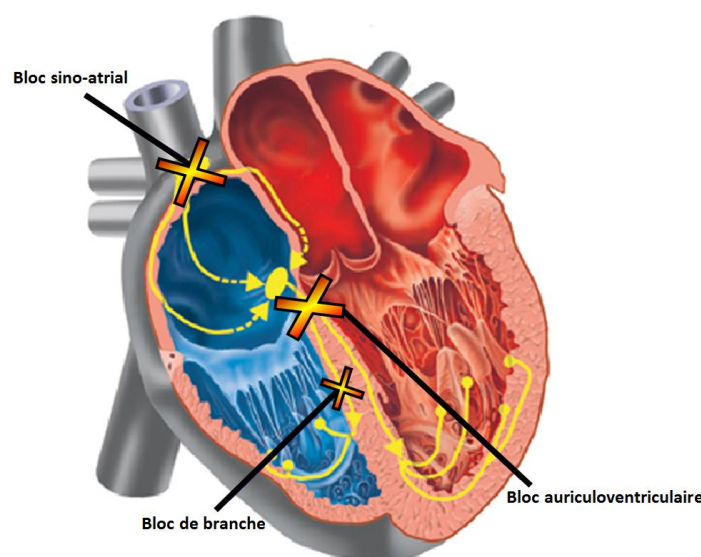


Figure 13 – Localisations des troubles de la conduction

Les TdC peuvent intervenir au niveau sinusal (BSA), au niveau des voies de conduction atrioventriculaires (BAV) ou au niveau des ramifications ventriculaires (blocs ou hémibloc de branche).

Modifié d'après <http://www.swissheart.ch/index.php?id=1431&L=1>

Cette thèse s'intéresse plus particulièrement aux BAV et aux blocs de branches qui représentent les formes les plus graves. La gravité de ces blocs et leur potentiel évolutif varient beaucoup en fonction de leur siège.

Les BAV peuvent être permanents ou paroxystiques. Les BAV paroxystiques sont réversibles et peuvent survenir notamment suite à la prise de médicaments (bêtabloquants), à un mécanisme lésionnel transitoire (intervention chirurgicale récente, infarctus du myocarde récent) ou à une cause inflammatoire (endocardite infectieuse)... Les BAV chroniques sont secondaires à des altérations cardiaques fixées suite à une cardiopathie ischémique par exemple. Le mécanisme d'atteinte peut cependant être progressif avec ou sans cardiopathie sous-jacente comme dans le cas des BAV dégénératifs. Dans près de 50 % des cas de ces BAV chroniques, aucune cardiopathie organique ne peut en effet être identifiée et ils sont considérés comme cliniquement primitifs (Lenègre et Moreau 1963; Lev et Bharati 1975; Barra et al. 2012).

IV.1. Localisation du bloc

Un bloc de conduction est d'autant plus grave qu'il est de haut degré et qu'il est en distalité du système de conduction. En effet, chaque cellule cardiaque a une certaine automaticité permettant l'émergence d'un "rythme d'échappement" (Tableau 1). En cas de bloc le long de la voie de conduction, un foyer secondaire de suppléance prend le relai et se dépolarise à un rythme propre. Il s'agit d'un ensemble de cellules automatiques situées juste en aval du bloc qui génèrent des PA à un rythme correspondant à leur propre automaticité. Celle-ci est d'autant plus faible que ces cellules sont situées en distalité du système de conduction, soulignant l'importance du niveau de bloc.

Ainsi, pour un bloc supra-hissien ou nodal (en vert sur la Figure 14) pour lequel l'obstacle est situé dans le nœud AV :

- le foyer secondaire est haut-situé,
- l'automaticité des cellules qui le composent est importante et la fréquence spontanée des contractions est rapide et stable,
- la conduction aux ventricules se fait à une fréquence acceptable,
- le cœur n'est que modérément ralenti et le risque de syncope est réduit.

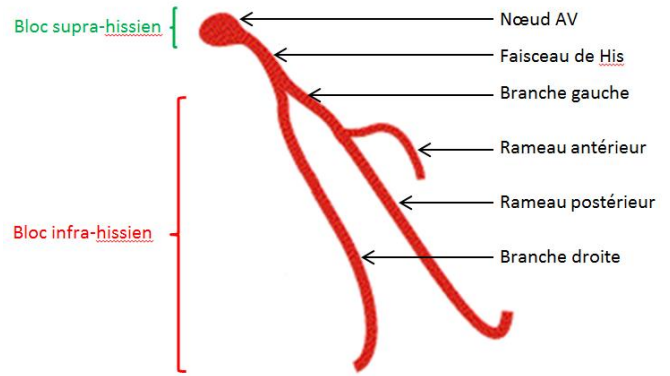


Figure 14 – Localisation des blocs supra et infra-hissiens le long des voies de conduction

Les blocs supra-hissiens situés en amont du faisceau de His (en vert) présentent un pronostic moins sévère que les blocs infra-hissiens situés en aval du faisceau de His (en rouge)

Au contraire, pour un bloc infra-hissien (en rouge sur la Figure 14):

- le foyer secondaire est bas-situé,
- le rythme d'échappement ne peut donc provenir que du faisceau de His ou des ventricules,
- l'automaticité des cellules qui le composent est faible et la fréquence spontanée des contractions est lente et instable, pouvant occasionner des pauses prolongées,
- le risque de syncope (voire dans les cas extrêmes de mort subite) est élevé.

Ainsi, on distingue deux types de blocs qui s'opposent aussi bien sur un plan anatomique que sur un plan évolutif : ceux impliquant la voie de conduction nodale plutôt bénins et ceux impliquant la voie de conduction hissienne et infra-hissienne pour lesquels le risque syncopal est important et celui de mort subite non négligeable.

IV.2. Les différents degrés de blocs atrioventriculaires (BAV)

Outre la localisation, le degré du BAV permet de déterminer, à moindre échelle, sa gravité. En effet le bloc peut être complet auquel cas aucun passage de la dépolarisation n'est possible entre les oreillettes et les ventricules. C'est alors le rythme d'échappement, plus ou moins lent suivant le niveau topographique du bloc, qui permet d'assurer la contraction des ventricules. Le bloc peut également être incomplet se traduisant par un simple ralentissement de la conduction ou par le blocage d'un certain nombre de dépolarisations atriales, les autres étant conduites normalement.

➤ Les blocs atrioventriculaires du premier ordre (BAV1)

Les BAV du premier ordre (ou du premier degré) correspondent au ralentissement simple de la conduction entre les oreillettes et les ventricules. Ils se traduisent sur l'ECG par un allongement constant de l'espace PR au-dessus de la valeur normale maximale 0,2 s. L'onde P est alors toujours suivie d'un complexe QRS (Figure 15).



Figure 15 - Représentation électrocardiographique d'un BAV1

L'espace PR est constant et dure plus que 0,2 seconde (0,28 s). Il s'agit d'un BAV1.

Modifié d'après <http://www.ednes.com>

Les BAV1 n'ont pas d'influence sur la fréquence cardiaque contrairement aux BAV de degrés supérieurs pour lesquels on peut observer une fréquence cardiaque diminuée avec un rythme parfois irrégulier.

➤ *Les blocs atrioventriculaires du deuxième ordre (BAV2)*

Dans le cas d'un BAV du deuxième degré, on observe une conduction intermittente avec des dépolarisations non transmises aux ventricules. Il en existe différents types :

- les BAV2 de type Möbitz 1 (ou de type Lucciani-Wenkebach). L'intervalle PR s'allonge progressivement jusqu'à ce qu'une onde P soit bloquée (non suivie d'un complexe QRS) (Figure 16). Cela signifie que les oreillettes se contractent normalement mais les ventricules ne suivent pas, entraînant alors une pause cardiaque. Puis ce cycle recommence.

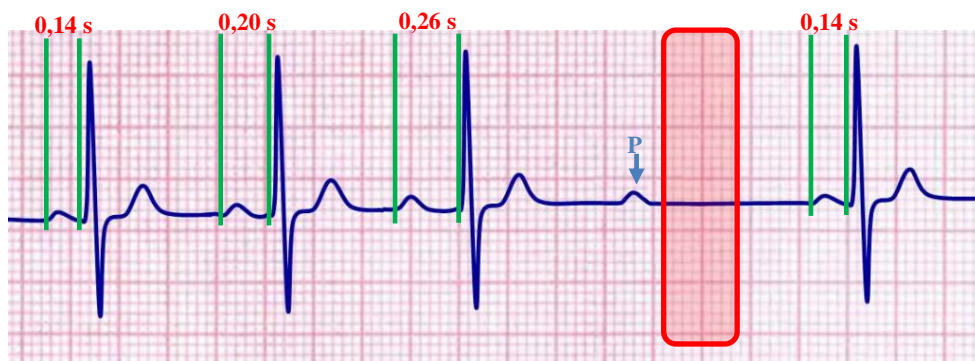


Figure 16 - Représentation électrocardiographique d'un BAV2 type Möbitz 1

Le rectangle rouge montre l'absence de complexe QRS à la suite de l'onde P fléchée. Les autres ondes P sont, elles, suivies de complexes QRS fins mais l'intervalle PR augmente progressivement.

Modifié d'après <http://mstcparamedic.pbworks.com>

Classiquement ce type de bloc, généralement bénin, correspond des lésions histologiques peu sévères et souvent réversibles au niveau du nœud AV. Les complexes QRS restants sont donc généralement fins.

- les BAV2 de type Möbitz 2, plus rares. Il s'agit du blocage inopiné et aléatoire d'une onde P non prématurée sans allongement des intervalles PR qui sont normaux ou allongés, mais fixes (Figure 17). Ces BAV sont plus distaux, souvent infra-hissiens, et les QRS d'échappement sont larges et de fréquence plus lente. Ils sont plus à risques que les BAV2 de type Möbitz 1 et peuvent préfigurer un bloc complet.



Figure 17 - Représentation électrocardiographique d'un BAV2 type Möbitz 2

Les deux rectangles rouges montrent l'absence de complexe QRS à la suite des deux ondes P fléchées. Les autres ondes P sont, elles, normalement suivies de complexes QRS.

Modifié d'après <http://lifeinthefastlane.com/ecg-library/basics/mobitz-2/>

- On rattache au type Mobitz 2 les blocs de haut degré (ou de haut grade) correspondant à une conduction intermittente avec la transmission une fois sur deux (BAV 2/1), une fois sur trois (BAV 3/1), voire une fois sur quatre (BAV 4/1 comme sur la Figure 18) de l'impulsion atriale. Lorsque les ondes P bloquées sont plus nombreuses que les ondes P conduites, il peut se produire une pause assez longue pour que l'on voie apparaître un phénomène d'échappement jonctionnel ou ventriculaire. Le rythme ventriculaire résultant est très lent.

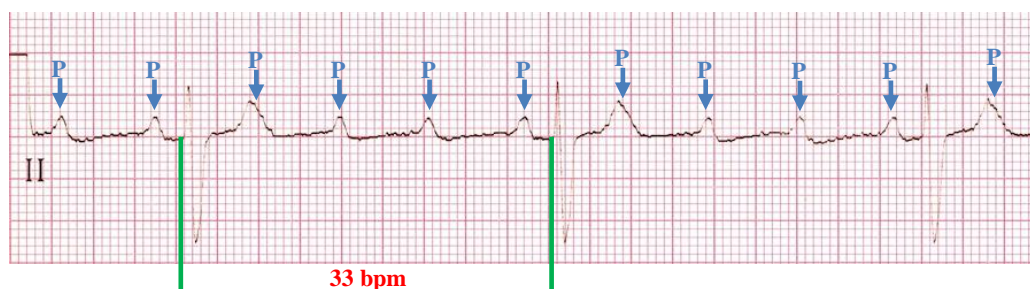


Figure 18 – Représentation électrocardiographique d'un BAV de haut degré 4/1

Une onde P sur quatre est transmise. Le rythme ventriculaire est très lent : env. 33 bpm.

Modifié d'après <http://lifeinthefastlane.com/ecg-library/basics/high-grade-block/>

➤ *Les blocs atrioventriculaires du troisième ordre (BAV3) ou BAV complets*

Ce type de blocs correspond à un blocage complet et permanent de la conduction atrioventriculaire. Il y a alors une dissociation complète entre l'activité des oreillettes et celle des ventricules : aucune onde P n'est transmise et les complexes QRS proviennent d'un foyer ectopique (Figure 19). On observe ainsi deux rythmes totalement indépendants qui se superposent : le rythme sinusal atrial habituel caractérisés sur l'ECG par les ondes P et le rythme d'échappement ventriculaire beaucoup plus lent mais lui aussi parfaitement régulier.

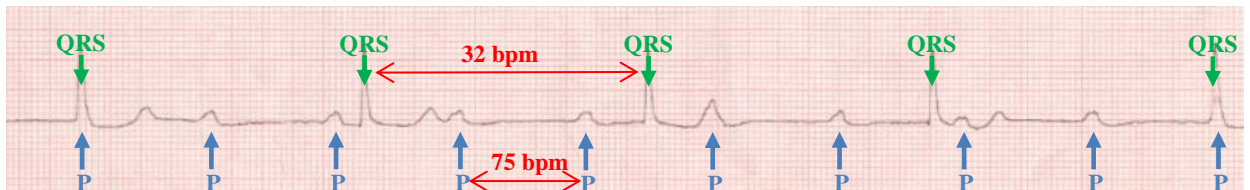


Figure 19 - Représentation électrocardiographique d'un BAV complet

On observe deux rythmes réguliers et indépendants : sinusal atrial à 75 bpm et ventriculaire à 32 bpm

Modifié d'après <http://www.ednes.com>

La fréquence et la morphologie des complexes QRS d'échappement dépendent de la localisation du foyer de suppléance. Plus ce foyer est distal, plus la fréquence ventriculaire est basse et plus les QRS sont larges.

S'il peut être transitoire et dû à une cause réversible, il peut constituer un état chronique généralement dû à une fibrose du faisceau de His ou de ses deux branches droite et gauche (Figure 14). L'automaticité ventriculaire étant très faible, le patient présente une bradycardie et un risque de syncopes. L'implantation d'un stimulateur cardiaque (« pacemaker » ou « pile ») est nécessaire pour prévenir ces symptômes et le risque de mort subite.

IV.3. Les blocs de branches

Lorsque l'onde de dépolarisation passe normalement à travers le faisceau de His, un bloc de branche peut intervenir dans une des ramifications avalantes : la branche droite qui est la plus fragile, la branche gauche, le rameau gauche antérieur ou le rameau gauche postérieur, qui est le moins fragile. L'intervalle PR est alors normal ($< 0,2$ s) mais il existe tout de même un retard de la dépolarisation du muscle ventriculaire impliquant alors un élargissement du complexe QRS

qui peut alors durer plus de 0,12 s. Cet élargissement s'accompagne d'une modification des vecteurs de dépolarisation visible sur l'ECG. On parle alors de bloc de branche complet.

Un bloc de branche droit (BBD) se visualise sur l'ECG grâce à un aspect caractéristique en RSR' sur dérivation précordiale droite V1 (Figure 20 - A). La conduction étant inexistante au niveau de la branche droite, il faut plus de temps à l'excitation pour atteindre les fibres du ventricule droit provoquant ainsi cette deuxième déflexion positive R' en V1 et un élargissement du QRS en V6 avec une onde S profonde. Un tel aspect de l'ECG avec des QRS normaux est très fréquent chez des individus sains. Souvent bénin, un BBD peut tout de fois être le signe de problèmes très divers (cardiopathies ischémiques, valvulaires ou congénitales, cœur pulmonaire chronique...).

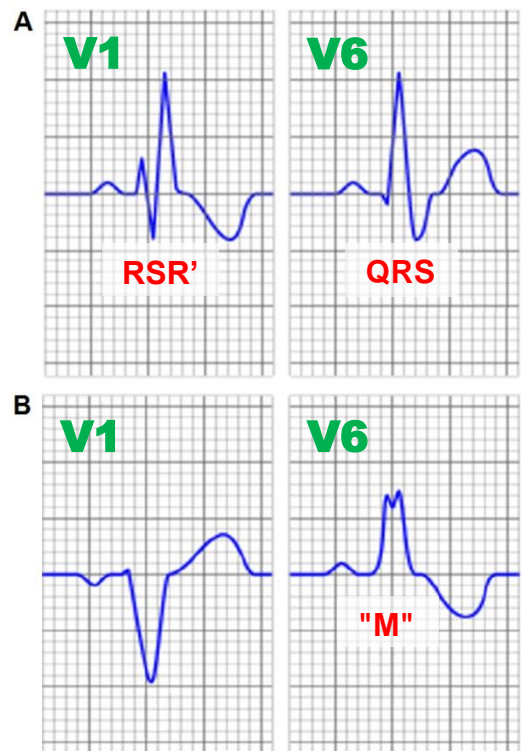


Figure 20 – ECG avec aspects caractéristiques de blocs de branches
 A - Aspect classique de BBD : RSR' en V1 et QRS large en V6 ; B - Aspect classique de BBG : aspect en M en V6.

Modifié d'après <http://smartfiches.fr/cardiologie/item-234-troubles-conduction-intracardiaque/troubles-conduction-ecg-electrocardiogramme>

Un bloc de branche gauche (BBG) se visualise sur l'ECG grâce à un aspect caractéristique en « M » sur la dérivation précordiale gauche V6 (Figure 20 - B). La conduction le long de la branche gauche ne se faisant pas, le septum ventriculaire se dépolarise inhabituellement de la droite vers la gauche. Cela provoque la première déflexion positive R en V6 et explique la disparition de l'onde Q septale. Malgré sa masse musculaire plus faible, le ventricule droit se dépolarise alors avant le gauche induisant une encoche en V6. Le ventricule gauche se dépolarise ensuite avec retard, donnant ainsi à l'ECG un aspect en « M » en V6. Un BBG témoigne dans la grande majorité des cas d'une pathologie cardiaque sous-jacente (cardiopathies valvulaires aortique, hypertension artérielle, cardiomyopathies...).

Les rameaux antérieur et postérieur de la branche gauche peuvent aussi être le siège de blocs. On parle alors respectivement d'hémibloc antérieur gauche (HBAG) et d'hémibloc postérieur gauche (HBPG). Ils se traduisent par une rotation de l'axe de QRS : on observe une déviation axiale gauche dans le cas d'un HBAG et une déviation axiale droite dans le cas d'un HBPG dont la forme isolée est très rare (Figure 21). L'insuffisance coronarienne représente la principale

cause des hémiblocs et un infarctus du myocarde antéroseptal est souvent associé à un HBAG. La seconde cause principale cause des blocs de branche est l'hypertension artérielle, puis les cardiomyopathies et les maladies de Lev et Lenègre (Elizari, Acunzo, et Ferreiro 2007).

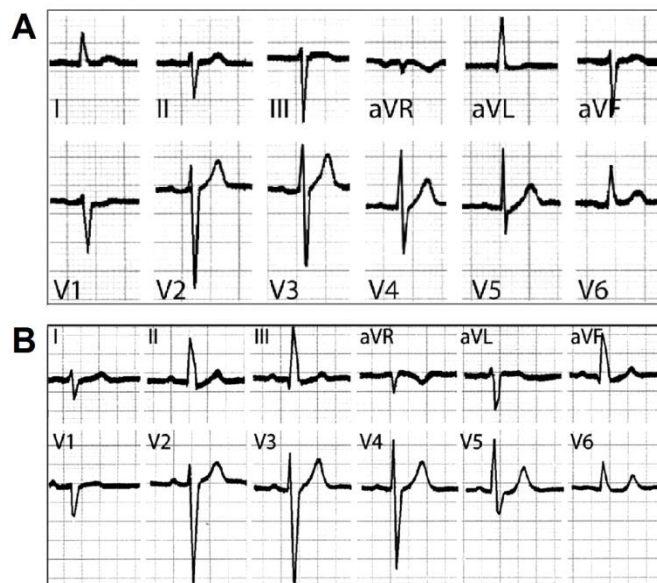


Figure 21 - ECG caractéristiques d'HBAG (A) et d'HBPG (B)

A – L'axe QRS se situe entre -60° et -30° traduisant une déviation axiale gauche traduisant souvent un HBAG ; B – L'axe QRS se situe entre $+90^{\circ}$ et $+120^{\circ}$ traduisant une déviation axiale droite traduisant souvent un HBPG.

Modifié d'après (Elizari, Acunzo, et Ferreiro 2007)

IV.4. Traitements

Le traitement des BAV acquis est fonction du degré et de la localisation du bloc. Un bloc supra-hissien asymptomatique ne requiert par exemple aucun traitement. Au contraire, pour les blocs induisant de longues pauses ventriculaires (BAV3, blocs de haut degré, BAV2 symptomatiques), le seul traitement actuel consiste à mettre en place une stimulation électrique (PM = pacemaker). Il est souvent difficile de préjuger de l'évolution des troubles de conduction parce que beaucoup de facteurs entre en jeu (âge et sexe du patient, symptômes, degré du bloc, rythme ventriculaire...) (M. Liu, Yang, et Dudley Jr 2014; Baruteau, Probst, et Abriel 2015). Dans tous les cas il est nécessaire d'arrêter tout traitement ayant des effets sur la conduction atrioventriculaire.

Dans le cadre des BAV congénitaux, l'implantation peut être nécessaire immédiatement après le diagnostic ou plus tardivement au début de l'âge adulte (Vardas et al. 2007a; Vardas et al. 2007b; Michaelsson, Riesenfeld, et Jonzon 1997). De nombreuses études ont montré que les enfants diagnostiqués *in utero* ou à la naissance ont un taux de mortalité précoce nettement supérieur à ceux diagnostiqués plus tard dans l'enfance. Des études rétrospectives sur plusieurs dizaines d'années, montrent que la forte morbidité et la mortalité seraient liées à une prématurité, à une implantation tardive du stimulateur cardiaque ou encore aux difficultés associées à cette implantation chez le très jeune enfant. L'amélioration de la prise en charge de ces grossesses à risque (échocardiographie fœtale, prise en charge dans des centres adaptés...) ainsi que celle du nouveau-né ont permis d'améliorer le pronostic du BAV (Michaelsson et Engle 1972; Pinsky et al. 1982; Edgar T. Jaeggi et al. 2002; E. T. Jaeggi et al. 2005). Si plusieurs solutions de stimulation peuvent être envisagées, on privilégie la stimulation du ventricule droit dans un premier temps (Kim et al. 2007), du ventricule gauche dans le cas de patients développant une cardiomyopathie dilatée ou encore une stimulation épicaudique du ventricule gauche pour des nouveau-nés présentant un BAV congénital complet (Kurosaki et al. 2008). Quel que soit la technique, l'implantation prophylactique d'un stimulateur cardiaque diminue considérablement la survenue de symptômes (syncopes, voire mort subite) chez des enfants atteints de BAV congénital (Villain et al. 2006).

Les BAV, congénitaux ou acquis, représentent l'une des principales causes d'implantation de PM (0,15 implantation pour 1000 habitants dans les pays développés) (P. Eriksson et al. 1998; Schott et al. 1999; Ector et al. 2000).

IV.5. Deux pathologies

Les blocs atrioventriculaires (BAV) sont un groupe hétérogène de troubles de la conduction cardiaque. Parmi les formes chroniques, on distingue les BAV congénitaux qui touchent les enfants et les BAV dégénératifs, plus fréquents, qui touchent principalement les adultes, particulièrement les personnes âgées (> 70ans) (Sarachek et Leonard 1972; Chronister 2009). Dans ces deux formes de troubles de la conduction, il existe des formes secondaires à une autre pathologie mais aussi une part importante de formes primitives idiopathiques pour lesquelles un facteur génétique est fortement suspecté depuis longtemps (Gazes et al. 1965; Steenkamp 1972; Morgans, Gray, et Robb 1974; Greenspahn et al. 1976; Baruteau, Behaghel, et al. 2012) et, dans

certains cas, décrit depuis une quinzaine d'années (Schott et al. 1999; Watanabe et al. 2008; Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010).

➤ *Les blocs atrioventriculaires dégénératifs (BAVd) ou « Progressive Cardiac Conduction Defect » (PCCD)*

Cette pathologie apparaît surtout chez les sujets âgés avec une prévalence augmentant avec l'âge (P. Eriksson et al. 1998) et s'aggrave avec le temps (Figure 22). Egalement appelée maladie de Lenègre ou de Lev, elle a historiquement été décrite comme une maladie structurelle et dégénérative principalement due à un phénomène de fibrose atteignant le système de conduction et en particulier les branches du faisceau de His ainsi que les rameaux antérieur et postérieur de la branche gauche (Lenègre et Moreau 1963; Lenègre 1964; Lev et al. 1964; Hudson 1970) .



Figure 22 – ECG d'un patient montrant le développement progressive des TdC.

Les ECG enregistrés en 1982, 1998 et 2000 montrent un élargissement progressif des complexes QRS (130, 140 puis 172 ms) traduisant une altération de la conduction ventriculaire.

Modifié d'après (Probst et al. 2003)

Des formes familiales ont largement été décrites (Osler 1903; Combrink, Davis, et Snyman 1962; Schaal et al. 1973; Lynch HT et al. 1973; Godin et al. 1973; A. J. Brink et Torrington 1977; Stéphan 1978; Stéphan, de Meeus, et Bouvagnet 1997; Schott et al. 1999; Watanabe et al. 2008; Makita et al. 2012; Gourraud et al. 2012) et l'on observe deux types de diversités :

- L'âge d'apparition et la vitesse de progression des troubles conductifs peuvent être très variables d'un patient à l'autre au sein d'une même famille.
- Des différences marquées entre familles peuvent aussi exister, certaines présentant des phénotypes plus sévères que d'autres.

Plusieurs types de BAVd ont été décrits :

- Les PFHB (*Progressive Familial Heart Block*) de type 1. Ils correspondent à une atteinte progressive des branches du faisceau de His, débutant classiquement par la branche droite, la plus fragile, puis la branche antérieure gauche et évoluant progressivement vers un BAV3 (Combrink, Davis, et Snyman 1962; Schaal et al. 1973; A. J. Brink et Torrington 1977; van der Merwe et al. 1991; Stéphan, de Meeus, et Bouvagnet 1997; Makita et al. 2012; Gourraud et al. 2012). La durée du QRS augmente avec le temps alors que l'intervalle PR reste lui constant. Il a d'ailleurs été montré que le bloc de branche droit et l'hémibloc antérieur gauche sont les troubles de la conduction les plus fréquemment rencontrés (42 % et 26 % respectivement) (Miller, Hodge, et Hammill 2008) et que la prévalence de ces troubles augmente avec l'âge (P. Eriksson et al. 1998).
- Les PFHB de type 2. On observe dans ce type des BAV de tous les degrés, avec des QRS normaux et des intervalles PR allongés cette fois. Il n'est pas rare d'observer également une bradycardie sinusale. Tout cela traduit un défaut de conduction en amont de la bifurcation du tronc commun du faisceau de His (Lynch HT et al. 1973; Lynch HT et al. 1975; A. J. Brink et Torrington 1977).
- Contrairement aux deux précédents, le troisième type est caractérisé par une atteinte non sélective de l'ensemble des voies de conduction. On observe ainsi tous les types de TdC (blocs de branches, BAV...) et l'intervalle PR ainsi que le QRS peuvent être allongés. C'est ce type de blocs précisément que l'on appelle maladie de Lenègre (lorsqu'il s'agit d'une dégénérescence fibrotique diffuse du système de conduction atteignant principalement les parties distales des deux branches) ou maladie de Lev (lorsqu'il s'agit d'une fibrose du faisceau de His et des parties proximales des deux branches) (Lenègre et Moreau 1963; Lenègre 1964; Lev 1964; Lev, Kinare, et Pick 1970; Gazes et al. 1965; Tsagaris, Bustamante, et Friesendorff 1967; Stéphan 1979; Gourraud et al. 2012).

➤ *Les blocs atrioventriculaires congénitaux (BAVc)*

Chez l'enfant l'origine congénitale est la plus fréquente. Le diagnostic du BAV congénital peut être posé *in utero*, à la naissance ou au cours de la période néonatale, c'est-à-dire avant le 27ème jour de vie (Brucato et al. 2003). La prévalence de cette pathologie rare, qui touche de manière équivalente filles et garçons (Gazes et al. 1965; Chronister 2009), est estimée à 1 sur 15000 à 22000 naissances (Michaelsson et Engle 1972; Camm et Bexton 1984; Kertesz, Fenrich, et

Friedman 1997; Michaelsson, Riesenfeld, et Jonzon 1997; Balmer et al. 2002; Baruteau, Fouchard, et al. 2012), mais peut atteindre 1 sur 11000 naissances en Finlande (Sirén, Julkunen, et Kaaja 1998).

Des formes familiales ont cependant déjà été décrites (Morquio 1901; Wendkos et Study 1947; Gazes et al. 1965; Stéphan, de Meeus, et Bouvagnet 1997) et l'existence de facteurs génétiques est fortement suspectée (Baruteau, Behaghel, et al. 2012). Il s'agit d'une maladie grave qui peut causer une symptomatologie de repos ou une limitation fonctionnelle à l'effort et peut être responsable de mort subite. Son taux de mortalité est en effet de 30 % mais plus le diagnostic est porté tôt (période anténatale voire néonatale) plus ce taux est important (Villain et al. 2006).

Les BAV congénitaux peuvent être secondaires à une pathologie cardiaque structurale et congénitale, à des complications post-opératoires, à une myocardite, à une pathologie neuromusculaire ou métabolique mais, dans la grande majorité des cas, jusqu'à 98 % en fonction des études, les BAV complets sur cœur sain détectés *in utero* sont associés à la présence d'anticorps lupiques maternels (Taylor et al. 1988; Smeenk 1997; Balmer et al. 2002; Brucato et al. 2003; Villain et al. 2006; Chronister 2009; Baruteau, Fouchard, et al. 2012; Baruteau, Behaghel, et al. 2012). Les anticorps maternels anti Ro/SSA (52 et 60 kD) et anti La/SSB (48 kD) passent la barrière materno-fœtale placentaire. Ils sont détectables dans la circulation fœtale dès la sixième semaine de grossesse et disparaissent de la circulation de l'enfant dans les premiers mois de vie (Villain et al. 2006).

Ces anticorps maternels peuvent induire chez le fœtus des lésions inflammatoires de myocardite, d'hémorragie et de nécrose des voies de conduction atrioventriculaire conduisant à la fibrose voire à la calcification du tissu conducteur (Villain et al. 2006; Gilbert-Barness et Barness 2006; Baruteau, Fouchard, et al. 2012). Ils peuvent aussi inhiber les canaux calcique de type L (Ambrosi, Sonesson, et Wahren-Herlenius 2014). Le siège du bloc est le plus souvent nodal (mais peut être infra-hissien) c'est pourquoi l'on observe souvent des QRS normaux.

Les BAV non immuns de l'enfant, lorsqu'ils ne sont pas dus à une cause documentée (infectieuse, traumatique, maladie neuro-musculaire ou métabolique), sont considérés comme idiopathiques. Il présente un pronostic moins sévère à cause du risque de cardiomyopathie dilatée induit par les anticorps maternels. Plus de 70 % d'entre eux sont progressifs, initialement partiels et se complétant après la naissance, ce qui permet de supposer la participation d'un processus dégénératif post-natal du tissu de conduction (Villain et al. 2006; Baruteau, Fouchard, et al. 2012; Ambrosi, Sonesson, et Wahren-Herlenius 2014).

La première étude à grande échelle a été menée par notre équipe (Baruteau, Fouchard, et al. 2012; Baruteau, Behaghel, et al. 2012). Les ECG des parents asymptomatiques de 141 enfants recrutés rétrospectivement ont été réalisés et les analyses ont montré une forte prévalence d'altérations de la conduction cardiaque caractérisées par des segments PR allongés et des complexes QRS élargis ainsi que des signes d'anomalies de conduction inter-atriale, atrioventriculaire et inter-ventriculaire. Les parents des 141 enfants présentaient significativement plus de TdC (BAV1, BBD, déviation axiale gauche...) que des contrôles sains correspondants. Toutes ces observations montrent que les BAV congénitaux isolés présentent aussi un caractère d'héritabilité (Baruteau, Fouchard, et al. 2012; Baruteau, Behaghel, et al. 2012).

V. Génétique des BAV

Depuis le début du XX^{ème} siècle, la description de formes familiales de BAV a très vite conduit les scientifiques à supposer puis à rechercher l'existence de facteurs génétiques responsables. Ces formes familiales ont été rapportées avec une transmission héréditaire de type autosomique dominante et une apparition plus ou moins précoces des blocs de conduction (Morquio 1901; Osler 1903; Gazes et al. 1965; Steenkamp 1972; Morgans, Gray, et Robb 1974; Greenspahn et al. 1976; Baruteau, Behaghel, et al. 2012; Gourraud et al. 2012...). Quatre gènes ont déjà été impliqués dans des formes isolées de trouble de la conduction (Tableau 2).

Gène	Locus	Protéine	Fonction principale
<i>SCN5A</i> ^a	3p22.2	Na _v 1.5	Canal sodique α
<i>SCN1B</i> ^b	19q13.12	Na _v β1	Canal sodique β1
<i>TRPM4</i> ^{e,f}	19q13.33 ^{c,d}	TRPM4	Canal cationique non-sélectif
<i>GJA5</i> ^g	1q21.2	Connexine 40	Jonction communicante intercellulaire

Tableau 2 – Gènes identifiés dans des formes isolées de BAV

Références : a = (Schott et al. 1999) ; b = (Watanabe et al. 2008) ; c = (P. A. Brink et al. 1995) ; d = (de Meeus et al. 1995) ; e = (Kruse et al. 2009) ; f = (H. Liu et al. 2010) ; g = (Makita et al. 2012).

V.1. Le premier gène, *SCN5A* :

Le premier gène responsable de troubles de la conduction dégénératifs a été identifié par notre équipe en 1999 dans une forme familiale autosomique dominante (Schott et al. 1999). Il s'agit du gène *SCN5A*, également impliqué dans plusieurs pathologies héréditaires isolées ou non (Remme 2013; M. Liu, Yang, et Dudley Jr 2014) : le syndrome du QT long congénital type 3 (LQT3)(Q. Wang et al. 1995; C. Bezzina et al. 1999; H. L. Tan et al. 2003; Kapplinger et al. 2010), le syndrome de Brugada (Q. Chen et al. 1998; C. Bezzina et al. 1999), la fibrillation atriale (Darbar 2008; Ellinor et al. 2008; Makiyama et al. 2008; Q. Li et al. 2009), les cardiomyopathies dilatées (C. R. Bezzina et al. 2003; Olson et al. 2005; Hesse et al. 2007), la dysfonction sinusale (Benson et al. 2003), la paralysie atriale (Takehara et al. 2004; Makita et al. 2005), la mort subite du nourrisson (Schwartz et al. 2000; Valdivia et al. 2002)...

➤ *Fonction de la protéine*

Ce gène code pour la protéine $Na_v1.5$, la sous-unité alpha du canal sodique spécifique du cœur. Au niveau cardiaque, ce canal est responsable du courant I_{Na} de la phase 0 du potentiel d'action et joue un rôle majeur dans la genèse et la propagation de l'influx électrique (Abriel 2007; Abriel 2010). Elle est exprimée principalement dans le tissu de conduction et dans les régions proches des nœuds AV et SA (Monfredi et al. 2010).

Cette protéine est constituée de quatre domaines protéiques (DI-DIV), chaque domaine comprenant six segments transmembranaires (S1-S6) (Figure 23 – A). Le pore est situé entre les segments S5 et S6, au niveau de la boucle appelée « p-loop » et les terminaisons N-terminales et C-terminales sont intracellulaires (Balsler 1999). Le segment S4 est un détecteur de voltage, sensible à la variation du potentiel membranaire et capable de modifier la conformation de la protéine pour former le canal. Il possède des charges positives portées par des résidus Lysine ou Arginine tous les 3 résidus. Lors de la dépolarisation, le segment S4 se déplace sous l'influence des charges positives du sodium (Figure 23 – B).

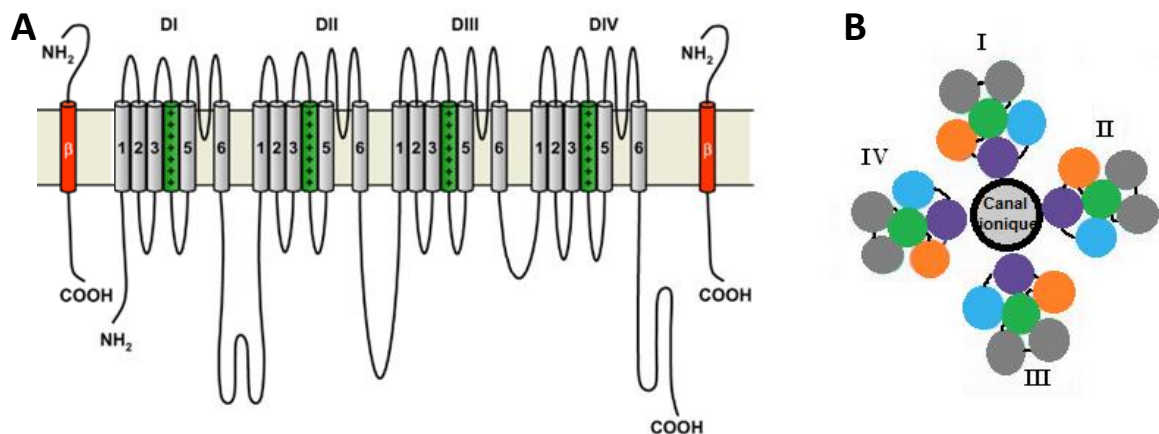


Figure 23 – Topologie membranaire du canal sodique cardiaque

A – DI-DIV représentent les quatre domaines homologues de la sous-unité α ; les segments S4 (en vert) servent de détecteurs de voltage. Deux sous-unités β complètent la sous-unité α pour former un hétérotrimère qui constitue le canal sodique ; B – La sous-unité α se replie afin de former le canal dont le pore se situe entre les 8 segments S5 et S6 des 4 domaines ainsi assemblés (bleu : S1, violet : S2, orange : S3, vert : S4 et gris : S5 et S6).

Modifié d'après (Abriel 2010)

➤ *Implication dans des formes isolées de BAV*

Notre équipe a rapporté le cas d'une grande famille nantaise de plus de 150 membres dont 15 atteints présentant, conformément à la description typique de la maladie de Lenègre (Lenègre 1964), tous les types de blocs (BBD, BBG, hémiblocs). Une analyse de liaison a tout d'abord permis d'identifier un locus intéressant sur le chromosome 3 (3p21). Une approche gène candidat dans ce locus, a ensuite permis d'identifier la substitution c.3963+2T>C (substitution d'une thymine en cytosine située juste à côté du 3963^{ème} nucléotide codant la protéine Na_v1.5) dans le gène *SCN5A* coségréant avec la pathologie dans la famille a été identifiée (Schott et al. 1999).

Il a été montré que cette mutation entraîne une délétion de l'exon 22 au niveau du transcrit et une perte du segment 4 du troisième domaine (DIII-S4) au niveau protéique. Ce segment est en partie responsable de la sensibilité du canal sodique au voltage. La réexpression de la protéine tronquée dans des cellules COS-7 montre que le canal sodique est normalement exprimé à la membrane mais qu'il existe une perte de sensibilité au courant. Les TdC résultent alors d'une haploinsuffisance, dont les effets s'accroissent au cours du vieillissement selon un processus qui reste à déterminer (Probst et al. 2003).

Dans le même article (Schott et al. 1999), notre équipe a décrit une seconde famille, néerlandaise, beaucoup plus petite puisqu'elle n'était composée que de six membres, dont trois atteints. Les patients atteints présentaient des BAV1 et des BBD complets, dont un chez un nouveau-né. La délétion d'une guanine en position 5280, responsable d'un décalage du cadre de lecture dans la séquence codant la région du pore du domaine IV et de l'apparition prématurée d'un codon-stop, a pu être identifiée. Cette mutation coségrège parfaitement avec la pathologie. Il a été montré qu'elle conduit à une protéine non fonctionnelle dont l'adressage membranaire n'est pas assuré (Herfst et al. 2003).

Une étude réalisée chez une souris haploinsuffisante pour ce même canal (souris *Scn5a+/-*) montre une altération des jonctions communicantes ainsi qu'une apparition exacerbée de fibrose au cours du vieillissement par rapport aux souris contrôles (Royer et al. 2005; Veen et al. 2005) entraînant un ralentissement de la conduction (Papadatos et al. 2002). La caractérisation de cette souris a prouvé qu'un défaut d'un canal ionique peut conduire à des réarrangements au niveau structural (fibrose, expression de marqueurs de l'hypertrophie...). Ces résultats ont confirmé les observations antérieures de Lenègre et Lev qui suspectaient la fibrose comme étant responsable de l'évolution lente et progressive vers les TdC dégénératifs.

D'autres travaux sont venus confirmer le rôle de *SCN5A* dans les troubles de la conduction et près d'une cinquantaine de mutations différentes ont été décrites (Tableau 3) dans des formes isolées ou non. La grande majorité correspond à une perte de fonction du canal $Na_v1.5$, traduit par une réduction du courant sodique à l'échelle cellulaire et par un ralentissement de la conduction cardiaque visible à l'ECG. Une forme hétérozygote composite W156X/R225W est responsable d'une forme sévère de troubles du système de conduction (C. R. Bezzina et al. 2003).

Variant (Nucléotide)	Variant (Acide aminé)	Type de mutation	Phénotype(s)	Référence(s)
c.361C→T	p.R121W	Non-sens	TdC + DS + FLA + TV	(Holst et al. 2010)
c.468G→A	p.W156X ⁽¹⁾	Non-sens	TdC	(C. R. Bezzina et al. 2003)
c.481G→A	p.E161K	Faux-sens	TdC + BrS + DS	(Smits et al. 2005)
c.659C→T	p.T220I	Faux-sens	TdC + CMD + AF + DS	(Olson et al. 2005; Olesen, Yuan, et al. 2012)
c.672C→T	p.R225W ⁽¹⁾	Faux-sens	TdC	(C. R. Bezzina et al. 2003)
c.689T→C	p.I230T ⁽²⁾	Faux-sens	TdC + DS + AV sévères	(Neu et al. 2010)
c.808C→A	p.Q270K	Faux-sens	TdC + FLA + FV + BrS	(Kapplinger et al. 2010; Kanter et al. 2012)
c.892G→A	p.G298S	Faux-sens	TdC	(D. W. Wang et al. 2002)
c.1007C→T	p.P336L ⁽³⁾	Faux-sens	TdC	(Cordeiro et al. 2006)
c.1066G→A	p.D356N	Faux-sens	BAV3 paroxystique + BrS	(Makiyama et al. 2005)
c.1127G→A	p.R376H	Faux-sens	TdC + BrS + FLA	(Rossenbacker et al. 2004)
c.1217A→G	p.N406S	Faux-sens	TdC + BrS	(Itoh et al. 2005)
c.1535C→T	p.T512I ⁽⁴⁾	Faux-sens	TdC	(Viswanathan, Benson, et Balsler 2003)
c.1541G→T	p.G514C	Faux-sens	TdC	(H. L. Tan et al. 2001)
c.2254G→A	p.G752R	Faux-sens	TdC + BrS	(Potet et al. 2003)
c.insTG	p.I849fs	Frameshift	TdC + BrS	(Oliva et al. 2008)
c.2550-2551insTG	p.S851fs	Frameshift	TdC + CMD	(Olson et al. 2005)
c.2581-2582delTT	p.F861fs951X	Frameshift	TdC + BrS	(Schulze-Bahr et al. 2003)
c.2602delC	p.E867X	Non-sens	TdC + BrS	(Schulze-Bahr et al. 2003)

c.2632C→T	p.R878C	Faux-sens	TdC + DS	(Y. Zhang et al. 2008)
c.3539C→T	p.A1180V	Faux-sens	TdC + CMD + SQTL3 + FA	(Ge et al. 2008; Shen et al. 2013; Yanmin Zhang et al. 2014)
c.3573G→A	p.W1191X	Non-sens	TdC + BrS	(Shin et al. 2007)
c.3578G→A	p.R1193Q	Faux-sens	TdC + BrS + SQTL3	(Q. Wang et al. 2004; Hwang et al. 2005; Huang et al. 2006; A. Sun et al. 2008)
c.3673G→A	p.E1225K	Faux-sens	TdC + BrS + DS	(Schulze-Bahr et al. 2003)
c.3784G→A	p.G1262S	Faux-sens	TdC + BrS + DS	(Shin et al. 2004)
c.3823G→A	p.D1275N	Faux-sens	TdC + CMD + arythmies	(McNair et al. 2004; Olson et al. 2005)
T→C	IVS22+2	Site d'épissage	TdC	(Schott et al. 1999; Probst et al. 2003)
c.3956G→T	p.G1319V	Faux-sens	TdC + BrS	(Casini et al. 2007)
c.3995C→T	p.P1332L	Faux-sens	TdC + SQTL3	(Kehl et al. 2004)
c.4050C→T	p.I1350T	Faux-sens	TdC + BrS	(Juang et al. 2003)
c.4222G→T	p.G1408R	Faux-sens	TdC + BrS + DS ⁽⁵⁾	(Kyndt et al. 2001; Benson et al. 2003)
c.4262G→A	p.W1421X ⁽⁶⁾	Non-sens	TdC	(Niu et al. 2006)
c.4313C→T	p.P1438L	Non-sens	TdC + BrS	(Six et al. 2008)
?	p.W1440X	Non-sens	TdC + BrS	(Vorobiof et al. 2008)
c.4346A→G	p.Y1449C	Faux-sens	TdC + BrS + FLA	(Hothi, Ara, et Timperley 2014)
c. 4435-4437delAAG	p.1479delK	Délétion	TdC + BrS + DS	(Schulze-Bahr et al. 2003)
c.4498-4500delAAG	p.1500delK	Délétion	TdC + BrS + SQTL3	(Grant et al. 2002)
c.4511-4519 delAGAAGCCCC	p.1505-1507 delKQP	Délétion	TdC + QTL3	(Zareba et al. 2001)
c.4519-4527 delCAGAAGCCCC	p.1507-1509 delQKP	Délétion	TdC + QTL3 + CMD + FV + TV + TdP + DS	(Shi et al. 2008)
c.4783G→A	p.D1595N	Faux-sens	TdC	(D. W. Wang et al. 2002)
c.4859C→A	p.T1620K	Faux-sens	TdC + SQTL3	(Surber et al. 2008)
c.4867C→T	p.R1623X ⁽⁷⁾	Non-sens	TdC + DS + BrS	(Benson et al. 2003; Makiyama et al. 2005)

c.4895G→A	p.R1632H ⁽⁸⁾	Faux-sens	TdC + DS	(Benson et al. 2003)
c.5129C→T	p.S1710L	Faux-sens	TdC + FVI	(Akai et al. 2000; Shirai et al. 2002)
c.5280delG	p.S1710+75X	Frameshift	TdC	(Schott et al. 1999)
c.5287G→A	p.V1763M	Faux-sens	TdC + SQTL3	(C.-C. Chang et al. 2004)
c.5298A→C	p.M1766L	Faux-sens	TdC + SQTL3 + MSN	(Valdivia et al. 2002)
c.5329G→A	p.V1777M	Faux-sens	TdC + SQTL3	(Lupoglazoff et al. 2001)
c.5350G→A	p.E1784K	Faux-sens	TdC + BrS + SQTL3 + DS	(Wei et al. 1999; Splawski et al. 2000; Makita et al. 2008; Oliva et al. 2008)
c.5387insTGA	p.1795insD	Insertion	SBr + SQTL3 + TdC + DS	(C. Bezzina et al. 1999; van den Berg et al. 2001; Veldkamp et al. 2003)
c.5425C→A	p.S1812X	Non-sens	TdC + BrS	(Schulze-Bahr et al. 2003)
c.5464-5467delTCTG	p.L1821fs/10	Frameshift	TdC + DS + TV	(B.-H. Tan et al. 2007)
c.6013C→G	p.P2005A ⁽⁹⁾	Faux-sens	TdC + SQTL3	(Shim et al. 2005)

Tableau 3 – Mutations SCN5A associées à des TdC, isolés ou non

AV = arythmies ventriculaires ; TdC = Trouble de la Conduction ; DS = Dysfonction sinusale ; CMD = CardioMyopathie Dilatée ; SQTL3 = Syndrome du QT long type 3 ; BrS = Syndrome de Brugada ; FA = Fibrillation Atriale ; FLA = Flutter atrial ; FVI = Fibrillation Ventriculaire Idiopathique ; MSN = Mort Subite du Nourrisson ; TV = tachycardies ventriculaires ; TdP = Torsade de pointe ; BAV3 = BAV complet.

⁽¹⁾ *Le patient est hétérozygote composite : il a hérité du variant R255W de sa mère et du variant W156X de son père.*

⁽²⁾ *Les patients homozygotes présentent les phénotypes TdC + DS + AV sévères mais les patients hétérozygotes de la même famille sont sains.*

⁽³⁾ *Deux patients hétérozygotes pour ce variant présentent des TdC légers. Un patient hétérozygote composite pour ce variant et le variant I1660V est en plus atteint du BrS. Dans la même famille, les patients hétérozygotes pour le variant I1660V ne présentent aucune altération de l'activité cardiaque.*

⁽⁴⁾ *Le propositus est homozygote pour le polymorphisme H558R (présent à 20 % dans la population contrôle correspondante) qui pourrait moduler l'effet du variant T512I.*

⁽⁵⁾ *Isolé, ce variant semble induire des TdC mais il semble induire une DS chez trois patients d'une même famille possédant également le variant P1298L. Isolé, ce dernier ne semble pas impliquer le moindre phénotype cardiaque.*

⁽⁶⁾ *Ce variant peut être modulé par le polymorphisme R1193Q présent à 12 % dans la population contrôle correspondante.*

⁽⁷⁾ *Isolé, ce variant n'induit que des TdC mineurs mais il implique une DS sans TdC chez un patient hétérozygote composite avec T220I.*

⁽⁸⁾ *De même, isolé, ce variant n'induit que des TdC mineurs mais il implique une DS sans TdC chez un patient présentant également la délétion delF1617.*

⁽⁹⁾ *Ce variant est associé au variant T613M dans KCNH2.*

➤ *Implication dans des formes de BAV associées à d'autres pathologies*

Les mutations du gène *SCN5A* sont responsables de plusieurs troubles du rythme par une altération à différents niveaux de la fonction de la protéine. Il peut s'agir de mutation « perte de fonction » pour les TdC, le syndrome de Brugada, la dysfonction sinusale notamment (on observe alors un défaut d'expression du canal, une augmentation de son inactivation ou une prolongation de la période réfractaire avant sa réactivation), ou de « gain de fonction », dans le cas du syndrome du QT long (SQTL) notamment (on observe alors un courant I_{Na} persistant retardant la repolarisation) (C. Bezzina et al. 1999; Moric et al. 2003; Saffitz 2005; Smits et al. 2005; Zimmer et Surber 2008; Makita 2009; Holst et al. 2010; Adsit et al. 2013; M. Liu, Yang, et Dudley Jr 2014).

Une étude de la répartition des mutations dans le gène *SCN5A* montre qu'il ne semble pas exister de régions associées spécifiquement à un phénotype bien défini (H. L. Tan et al. 2003; Zimmer et Surber 2008) (Figure 24). Des patients mutés *SCN5A* présentent plusieurs phénotypes et l'on parle alors de canalopathies *SCN5A* chevauchantes (Napolitano, Rivolta, et Priori 2005; Remme, Wilde, et Bezzina 2008; Remme 2013; M. Liu, Yang, et Dudley Jr 2014).

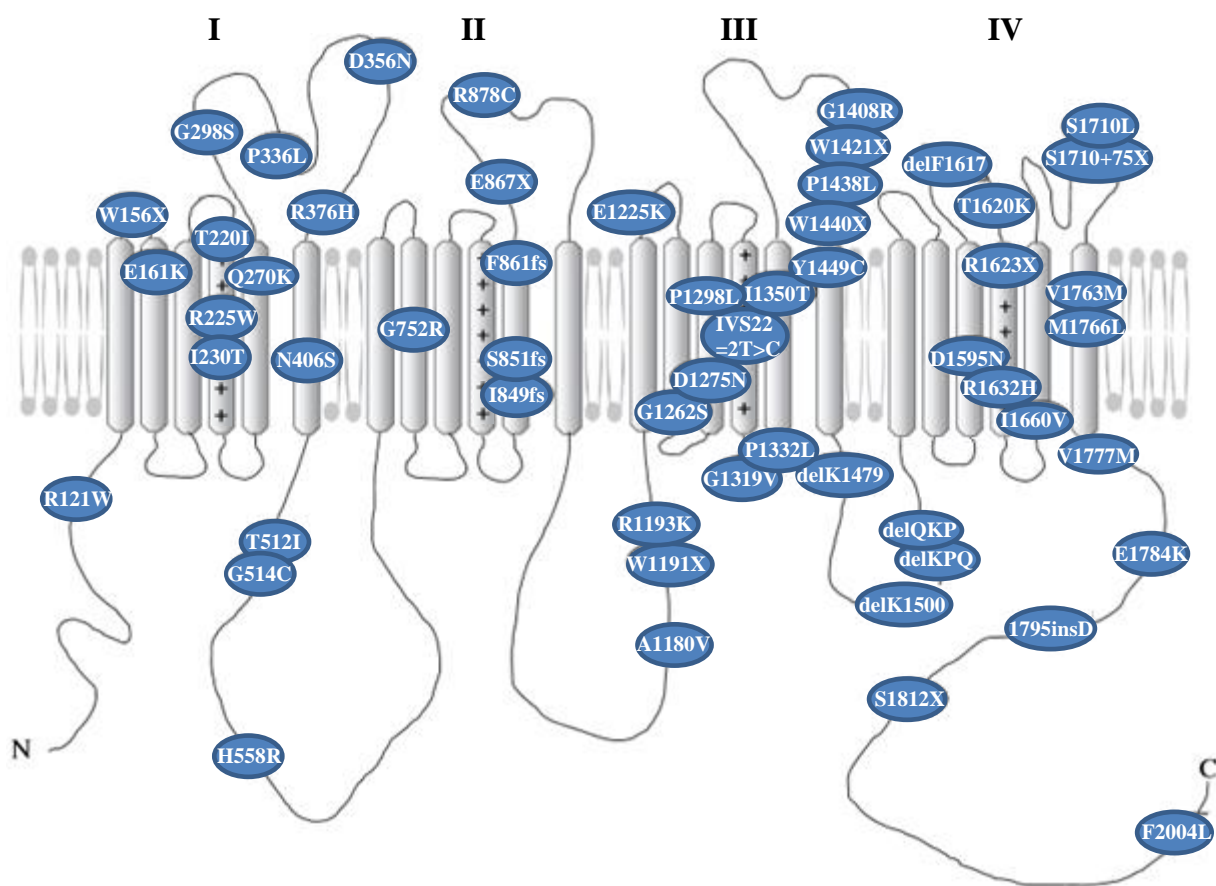


Figure 24 – Mutations SCN5A associées aux TdC, isolés ou non

De nombreuses mutations dans le gène SCN5A (indiquées en bleu) ont été rapportées dans des cas de TdC isolés ou non. Elles touchent l'ensemble de la protéine Nav1.5.

Modifié d'après (Zimmer et Surber 2008; Ruan, Liu, et Priori 2009)

Une même mutation dans *SCN5A* peut conduire à des phénotypes variables, parfois au sein d'une même famille (Smits et al. 2005; Probst et al. 2006; Watanabe et al. 2008; Hothi, Ara, et Timperley 2014). Cela est notamment très bien illustré par l'exemple du variant R1193Q (Q. Wang et al. 2004; Hwang et al. 2005; Huang et al. 2006; A. Sun et al. 2008) qui a été associé à un syndrome du QT long type 3 isolé (Q. Wang et al. 2004), à un syndrome de Brugada isolé (Huang et al. 2006), à un syndrome de Brugada associé à un syndrome du QT long de type 3 (Huang et al. 2006) et à des TdC dans une famille de quatre générations (Hwang et al. 2005; A. Sun et al. 2008). Beaucoup de mutations *SCN5A* responsables de syndromes chevauchants ont été décrites avec (Tableau 3) ou sans (Tableau 4) TdC (Makita 2009; Hothi, Ara, et Timperley 2014; Nakaya 2014).

Phénotypes	Mutations	Références
BrS + SQTL3 + DS	delF1617	(Splawski et al. 2000; T. Chen, Inoue, et Sheets 2005)
BrS + SQTL3	P2006A ; R1612P ; V411M ; L1786Q	(Priori et al. 2000; Kanters et al. 2014)
BrS + SQTL3 + FA + MSN	F2004L	(D. W. Wang et al. 2007; Bébarová et al. 2008; Olesen, Yuan, et al. 2012)
BrS + PA + FV	R367H	(Takehara et al. 2004)
BrS + DS	F1775Lfs*15 ; K1578fs/52 ; S231CfsX251 ; T187I	(Makiyama et al. 2005; Nakajima et al. 2013; Risgaard et al. 2013)
FA + SQTL3	Y1795C	(Benito et al. 2008)
FA + PA	L212P	(Makita et al. 2005)
SQTL3 + CMD	R1193Q	(Kwon et al. 2012)
SQTL3 + MSN	S216L ; R340Q ; T1304M	(D. W. Wang et al. 2007; Hedley et al. 2009; Olesen, Yuan, et al. 2012)

Tableau 4 – Exemples de mutations *SCN5A* associées à des syndromes chevauchants, sans TdC

BrS = Syndrome de Brugada ; SQTL3 = Syndrome du QT long type 3 ; DS = Dysfonction sinusale ; MSN = Mort Subite du Nourrisson ; FV = Fibrillation Ventriculaire ; PA = Paralysie Atriale ; FA = Fibrillation Atriale ; CMD = CardioMyopathie Dilatée.

Dans la majorité des cas de canalopathies *SCN5A* chevauchantes, les patients souffrent de TdC (Baruteau, Probst, et Abriel 2015). Il a d'ailleurs été montré que pour des patients porteurs d'une mutation *SCN5A* identifiée dans le cadre du syndrome de Brugada, les troubles de la conduction représentaient le phénotype prédominant avec une pénétrance supérieure à 80 % et que la sévérité des TdC dépendait du type de mutation identifiée (Probst et al. 2006; Meregalli et al. 2009).

V.2. *SCN1B*, régulateur de *SCN5A* :

Le deuxième gène identifié dans les BAV est *SCN1B*. Il s'agit d'un gène régulateur de *SCN5A*, qui a été impliqué dans d'autres pathologies (Shy, Gillet, et Abriel 2013) : le syndrome de Brugada (Watanabe et al. 2008; D. Hu et al. 2012; Olesen, Holst, et al. 2012), la fibrillation

atriale (Watanabe et al. 2009; Olesen, Holst, et al. 2012), le syndrome de la mort subite du nourrisson (D. Hu et al. 2012)...

➤ *Fonction de la protéine*

La protéine $Na_v1.5$ constitue la sous-unité alpha (α) du principal canal sodique cardiaque. Ces canaux sont en réalité des hétérotrimères composés d'une sous-unité α et de deux sous-unités bêta (β) (Figure 23). Seule la sous-unité α est indispensable à l'activité électrique, mais les sous-unités β stabilisent le canal (Watanabe et al. 2008; M. Liu, Yang, et Dudley Jr 2014).

Ce sont également des glycoprotéines transmembranaires. Elles sont constituées d'un large domaine extracellulaire N-terminal contenant un domaine immunoglobuline-like, d'un segment transmembranaire unique et d'un domaine C-terminal intracellulaire (Figure 23) (Isom et Catterall 1996). Elles modifient les propriétés biophysiques et l'expression à la membrane du canal, et ont un rôle dans l'adhésion cellulaire en interagissant avec les protéines du cytosquelette et les protéines de la matrice extracellulaire (Tseng et al. 2007; Maltsev, Kyle, et Undrovinas 2009; Shy, Gillet, et Abriel 2013). A ce jour, quatre sous-unités β ont été décrites, toutes exprimées dans le cœur. Parmi elles, la sous-unité $Na_v\beta1$, codée par (*SCN1B*) se lie de façon non-covalente aux sous-unités α . Il existe deux isoformes ($\beta1$ et $\beta1B$) de cette protéine, toutes deux préférentiellement exprimées au niveau des fibres de Purkinje (Kazen-Gillespie et al. 2000; Qin et al. 2003; Watanabe et al. 2008).

➤ *Implication dans des formes isolées de BAV*

Suite à une approche gène candidat, quarante-quatre patients atteints de TdC sur cœur structurellement sain (mutations *SCN5A* exclues) ont été étudiés pour le gène *SCN1B*, codant pour la sous-unité $\beta1$ régulatrice des mêmes canaux sodiques cardiaques. Ceci a permis l'identification de deux mutations (p.Trp179X et p.Glu87Gln) dans le transcrit alternatif $\beta1B$ (Tableau 5). Les deux mutations ségrégent avec la pathologie dans trois petites familles atteintes de TdC sur cœur structurellement sain et sont absentes chez 1404 contrôles (Watanabe et al. 2008).

Il a été montré que la première mutation (p.Trp179X) a un effet d'haploinsuffisance, c'est-à-dire que le défaut de conduction est dû à la réduction du nombre de sous-unités β fonctionnelles non

mutées. De même, il a été montré que la seconde mutation (p.Glu87Gln) a un effet dominant négatif, c'est-à-dire que la présence de la sous-unité β mutée inhibe la conduction électrique cardiaque. Dans un cas, le TdC est dû à une quantité insuffisante de sous-unités β fonctionnelles et dans l'autre à la présence d'une sous-unité β mutée « poison ». Les deux mutations entraînent une diminution de la densité de courant I_{Na} , et donc une perte de fonction des canaux sodiques, tout comme les variants *SCN5A* entraînant des TdC.

Variant(s) (Nucléotide)	Variant (Acide aminé)	Type de mutation	Phénotype(s)	Référence
c.536G→A c.537G→A	p.Trp179X	Non-sens	TdC et/ou BrS	(Watanabe et al. 2008)
c.259G→C	p.Glu87Gln	Faux-sens	TdC et/ou BrS	(Watanabe et al. 2008)

Tableau 5 – Mutations *SCN1B* associées à des TdC

TdC = Trouble de la Conduction ; BrS = Syndrome de Brugada.

➤ *Implication dans des formes de BAV associées à d'autres pathologies*

A l'instar de *SCN5A*, certains patients atteints de TdC présentant une mutation *SCN1B* présentent aussi un syndrome de Brugada (Watanabe et al. 2008).

V.3. Un autre canal ionique, *TRPM4* :

Le troisième gène décrit responsable de troubles de la conduction dégénératifs est le gène *TRPM4*.

➤ *Fonction de la protéine*

Le gène *TRMP4* est un membre de la famille des canaux TRP (*Transient Receptor Potential*). Il existe dans cette famille 28 canaux cationiques répartis en 6 sous-familles : TRPC (6 membres, C pour *canonical*), TRPV (6 membres, V pour *vanilloid*), TRPA (1 membre, A pour *ankyrin*), TRPP (4 membres, P pour *polycystin*), TRPML (3 membres, ML pour *mucolipin*) et TRPM (8

membres, M pour *melastatin*) (Launay et al. 2002; Abriel et al. 2012; Kruse et Pongs 2014; Mathar et al. 2014).

Le canal TRPM4 (*transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4*) est un canal cationique non sélectif calcium-dépendant, imperméable aux ions Ca^{2+} mais activé par l'augmentation de la concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulaire, et perméable aux ions monovalents selon l'ordre de perméabilité suivant : $\text{Na}^+ > \text{K}^+ \gg \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$ (Nilius, Prenen, Janssens, et al. 2005; Abriel et al. 2012; Kruse et Pongs 2014). Il s'agit d'un tétramère de sous-unités alpha dont chaque monomère, comme pour la plupart des canaux cationiques tels que les canaux voltage-dépendants, comprend six domaines transmembranaires qui peuvent être activés par différents mécanismes et modulés par beaucoup de ligands. Ces monomères présentent également une boucle appelée « p-loop » entre les segments transmembranaires S5 et S6 qui forme le filtre de sélectivité (Nilius, Prenen, Tang, et al. 2005; Abriel et al. 2012; Kruse et Pongs 2014) (Figure 25).

Puisque la concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ joue un rôle clé dans de nombreux phénomènes physiologiques tels que l'activité des lymphocytes T, la sécrétion de l'insuline, la mécano-transduction dans les artères cérébrales et la pression sanguine, l'entrée dans la cellule d'ions Ca^{2+} est strictement régulée et dépend de plusieurs facteurs. L'activation des canaux TRPM4 permet l'entrée de Na^+ dans la cellule entraînant la dépolarisation cellulaire. Il participe aussi à la détection du Ca^{2+} intracellulaire et affecte la force motrice pour Ca^{2+} et pour d'autres ions en modifiant le potentiel électrique membranaire (Abriel et al. 2012; Kruse et Pongs 2014).

Chez l'homme, il est exprimé dans de nombreuses cellules excitables ou non et de nombreux tissus (cellules musculaires lisses (Gonzales et al. 2010), cellules des muscles squelettiques (Krüger et al. 2008), cellules immunitaires (Launay et al. 2004), cellules endothéliales, cellules cardiaques (Kruse et al. 2009), cellules bêta pancréatiques (Cheng et al. 2007), cellules rénales, cellules chromaffines (Mathar et al. 2010), neurones inspiratoires (Mironov 2008). Son rôle et son taux d'expression dépendent du type cellulaire. Dans le cœur, il est majoritairement présent dans les fibres de Purkinje et le tissu nodal mais peu dans les ventricules (Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010; Abriel et al. 2012; Kruse et Pongs 2014).

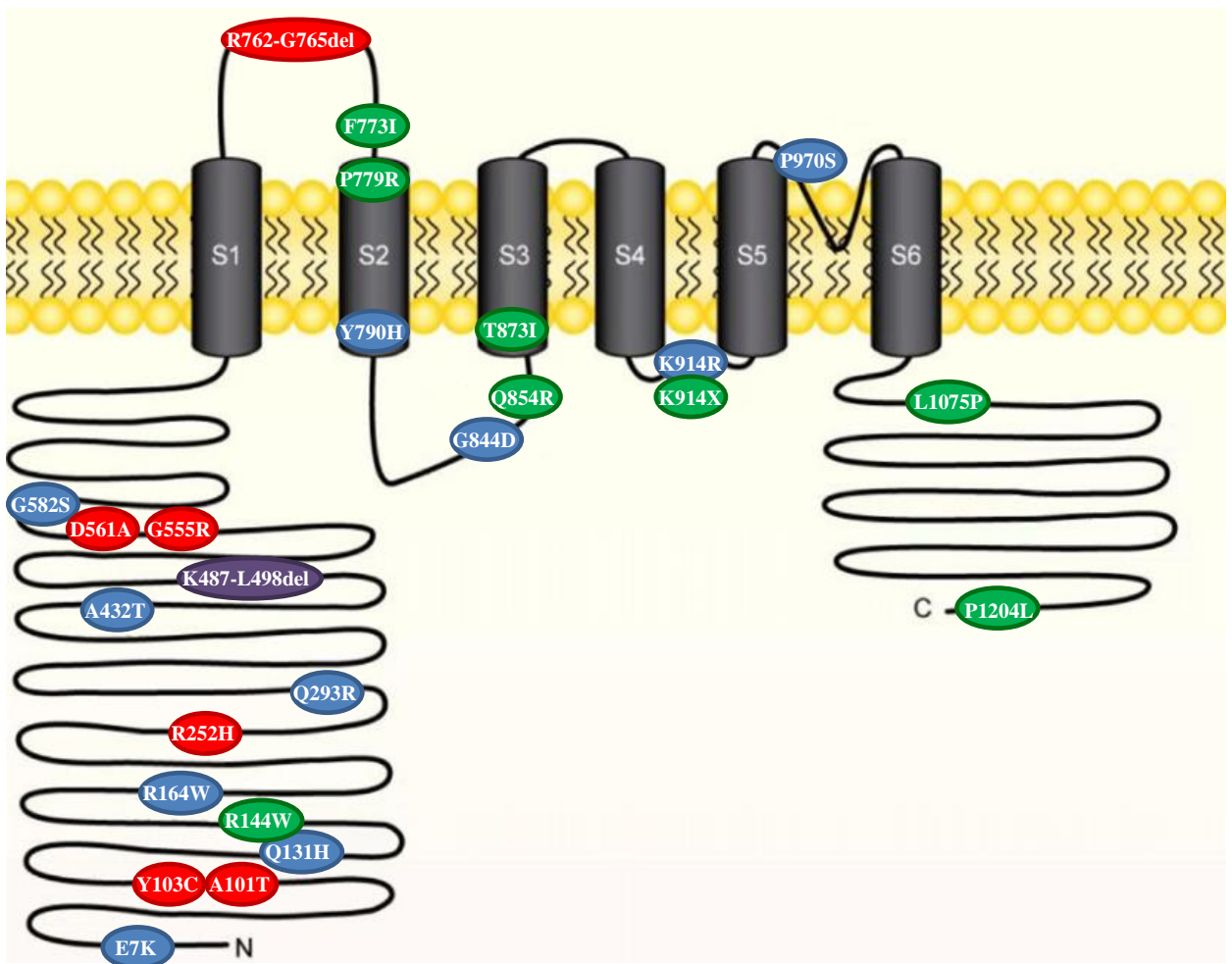


Figure 25 – Topologie et mutations du canal TRPM4

Les variants décrits dans des formes isolées de TdC sont indiqués en bleu, les variants décrits dans des formes isolées de BrS en rouge, les variants décrits dans des cas de BrS associés à des TdC en vert et la délétion décrite dans un cas de BrS associé à une DS en violet.

Modifié d'après (Abriel et al. 2012)

➤ *Implication dans des formes isolées de BAV*

Ce gène a été impliqué parallèlement dans deux grandes familles de plus de deux cent cinquante membres, toutes deux décrites simultanément et en trois étapes.

La première étape se déroule à la fin des années 70. Une famille sud-africaine en 1977 (A. J. Brink et Torrington 1977) et une famille libanaise en 1978 (Stéphan 1978) ont été décrites avec des phénotypes similaires, principalement des BBD, avec ou sans HBAG, se développant dans les premières années de la vie et progressant en BAV complets dans près de 10 % des cas. Il est intéressant de noter qu'il n'y avait aucun BBG, complet ou incomplet.

La deuxième étape se déroule en 1995 lorsque ces deux familles sud-africaine et libanaise ont été liées au locus 19q13.3 suite à des analyses de liaison indépendantes (de Meeus et al. 1995; P. A. Brink et al. 1995).

Quinze ans plus tard en 2009-2010, c'est la troisième et dernière étape, deux études parallèles ont permis d'identifier une mutation dans *TRPM4* pour chacune des deux familles : p.Glu7Lys pour la famille sud-africaine (Kruse et al. 2009) et p.Ala432Thr pour la famille libanaise (H. Liu et al. 2010). Cette étude a permis également l'identification de deux autres variants *TRPM4* dans deux petites familles françaises.

Ces travaux ont montré que les TdC étaient dus à un effet gain de fonction : elles atténuent la déSUMOylation du canal TRPM4. La SUMOylation est une modification post-traductionnelle proche de l'ubiquitination consistant en la fixation d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. Alors que l'ubiquitination implique la dégradation de la protéine cible, la SUMOylation, au contraire, stabilise la cible et facilite son trafic intracellulaire. La déSUMOylation étant altérée, il en résulte une SUMOylation qui engendre des défauts d'endocytose et une stabilisation des canaux mutants à la membrane cellulaire. Suite à ce défaut d'endocytose, on observe une surexpression du canal muté à la membrane cellulaire qui, selon l'hypothèse la plus vraisemblable, conduirait à une légère dépolarisation du potentiel membranaire de repos, et donc à une diminution du courant entrant sodique rapide, conduisant ainsi au défaut de conduction.

A ce jour, une dizaine de variants ont été décrits dans des TdC (PFHB1, BAV, BBD) isolés, traduisant l'importance de ce gène dans la conduction cardiaque (Tableau 6). Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore mal connus mais ils correspondent à un gain de fonction. Une première hypothèse serait que l'augmentation des courants TRPM4 associée aux TdC induit une altération de la conductance membranaire, empêchant ainsi la propagation normale des PA dans les fibres de Purkinje (Kruse et Pongs 2014). Cette hypothèse est compatible avec les QRS larges observés chez ces patients et avec les différents phénotypes observés (BBD, blocs bifasciculaires et BAV). Les variants gain de fonction pourraient entraîner une dépolarisation de la membrane cellulaire qui réduirait le nombre de canaux sodiques disponibles en augmentant la probabilité que ces derniers soient inactivés. Cela résulterait également en une altération de la conduction des PA (Abriel et al. 2012; H. Liu et al. 2013).

Une autre hypothèse soutient l'existence d'un potentiel membranaire optimal qui dépendrait notamment de la concentration potassique extracellulaire $[K^+]$. Une modification de la

concentration $[K^+]$ extracellulaire positive ou négative, gain ou perte de fonction, éloignerait le potentiel membranaire de sa valeur optimale conduisant à une altération de la propagation des PA (Abriel et al. 2012; Kruse et Pongs 2014).

Variant(s) (Nucléotide)	Variant (Acide aminé)	Type de mutation	Phénotype(s)	Référence
c.19G→A	p.E7K	Faux-sens	BBD/BAV3 (PFHB1)	(Kruse et al. 2009)
c.393G→C	p.Q131H	Faux-sens	BBD (TdC isolés)	(Stallmeyer et al. 2012)
c.430C→T	p.R144W	Faux-sens	BBD + BrS	(H. Liu et al. 2013)
c.490C→T	p.R164W	Faux-sens	BAV/BBD (TdC isolés)	(H. Liu et al. 2010)
c.878A→G	p.Q293R	Faux-sens	BAV (TdC isolés)	(Stallmeyer et al. 2012)
c.1294G→A	p.A432T	Faux-sens	BAV/BBD (TdC isolés)	(H. Liu et al. 2010) (Stallmeyer et al. 2012)
c.1744G→A	p.G582S	Faux-sens	BBD (TdC isolés)	(Stallmeyer et al. 2012)
c.2317T→A	p.F773I	Faux-sens	BBD + BrS	(H. Liu et al. 2013)
c.2336C→G	p.P779R	Faux-sens	BBD + BrS	(H. Liu et al. 2013)
c.2368T→C	p.Y790H	Faux-sens	BAV/BBD (TdC isolés)	(Stallmeyer et al. 2012)
c.2531G→A	p.G844D	Faux-sens	BAV/BBD (TdC isolés)	(H. Liu et al. 2010) (Stallmeyer et al. 2012)
c.2561A→G	p.Q854R	Faux-sens	BAV/BBD + BrS	(Stallmeyer et al. 2012; H. Liu et al. 2013)
c.2618C→T	p.T873I	Faux-sens	BAV/BBD + BrS	(H. Liu et al. 2013)
c.2740A→T	p.K914X	Non-sens	BBD + BrS	(H. Liu et al. 2013)
c.2741A→G	p.K914R	Faux-sens	BAV/BBD (TdC isolés)	(Stallmeyer et al. 2012)
c.2908C→T	p.P970S	Faux-sens	BBD (TdC isolés)	(Stallmeyer et al. 2012)
c.3224T→C	p.L1075P	Faux-sens	BBD + BrS	(H. Liu et al. 2013)
c.3611C→T	p.P1204L	Faux-sens	BBD + BrS	(Stallmeyer et al. 2012; H. Liu et al. 2013)

Tableau 6 – Mutations *TRPM4* associées à des TdC isolés ou non

BBD = Bloc de Branche Droit ; BAV3 = Bloc complet ; PFHB1 = Progressive Familial Heart Block type 1 ; TdC = Trouble de la Conduction ; BrS = Syndrome de Brugada.

➤ *Implication dans des formes de BAV associées à d'autres pathologies*

A l'instar de *SCN5A* et *SCN1B*, certains patients atteints de TdC présentant une mutation *TRPM4* présentent aussi un syndrome de Brugada (H. Liu et al. 2013).

Une étude récente a de plus montré l'existence de polymorphismes peu communs *TRPM4* chez des patients atteints de BrS sans TdC (Tableau 7) (Stallmeyer et al. 2012). Une autre étude conclut notamment que les mutations *TRPM4* pourraient causer environ 6 % des cas de BrS (H. Liu et al. 2013).

Il est intéressant de constater que les phénotypes des patients présentant un variant *TRPM4* ressemblent étroitement à ceux qui sont associés à des mutations du gène *SCN5A*, codant pour le canal Na⁺ voltage-dépendant Na_v1.5. Cela suggère que soit ces deux canaux s'influencent l'un l'autre, soit qu'ils font partie de la même voie de signalisation, la principale activité du canal de *TRPM4* pouvant être aussi de conduire les courants sodiques entrants lors de la dépolarisation des cellules cardiaques (Abriel et al. 2012; Kruse et Pongs 2014).

Variant(s) (Nucléotide)	Variant (Acide aminé)	Type de mutation	Phénotype(s)	Référence
c.301G→A	p.A101T	Faux-sens	BrS	(Stallmeyer et al. 2012)
c.308A→G	p.Y103C	Faux-sens	BrS	(Stallmeyer et al. 2012)
c.755G→A	p.R252H	Faux-sens	BrS	(Stallmeyer et al. 2012)
c.1459-1494del	p.K487-L498del	Délétion	BrS, DS	(Stallmeyer et al. 2012)
c.1663G→A	p.G555R	Faux-sens	BrS	(H. Liu et al. 2013)
c.1682A→C	p.D561A	Faux-sens	BrS	(Stallmeyer et al. 2012)
c.2283-2294del	p.R762-G765del	Délétion	BrS	(Stallmeyer et al. 2012)

Tableau 7 – Mutations *TRPM4* associées à un BrS

BrS = Syndrome de Brugada ; DS = Sysfonction Sinusale.

V.4. La connexine GJA5 :

➤ *Fonction de la protéine*

Ce gène code pour la connexine 40 (Cx40). Les connexines forment des canaux intercellulaires qui permettent le couplage électrique entre deux cellules voisines ainsi que la propagation plus ou moins rapide du PA en fonction de la taille du canal formé (Temple et al. 2013). La Cx40 forme les canaux jonctionnels dont la conductance est la plus importante (200 pS). Pour plus d'information sur les connexines, un paragraphe plus détaillé leur est dédié dans cette thèse (voir le paragraphe III.5 à la page 24).

➤ *Implication dans des formes isolées de BAV*

En 2012, une étude japonaise a étudié 156 patients non apparentés atteints d'une forme progressive familiale de bloc de conduction. Ils ont identifié chez un patient un variant dans le gène *GJA5*, codant pour la connexine 40, une protéine de jonction cellule-cellule essentielle pour un grand nombre de processus physiologiques, tels que la dépolarisation coordonnée du muscle cardiaque. Cette mutation (c.173A>T ; p.Q58L) a également été retrouvée chez la sœur du propositus. Tous les deux présentaient à six ans une déviation axiale gauche accompagnée chez le propositus d'un bloc de branche gauche. La mère présentait à 16 ans un phénotype proche de celui de son fils. La mère et le fils sont décédés respectivement à 30 et 11 ans d'une mort subite cardiaque. Le père et les grands-parents maternels du propositus ne possédant pas la mutation, il semble qu'elle soit apparue *de novo* chez la mère, dont l'ADN n'est pas disponible (Makita et al. 2012).

L'expression hétérologue de Cx40-Q58L dans des cellules déficientes en connexines (neuroblastomes murins) diminue significativement les propriétés des canaux Cx40. Elle implique en effet une localisation diffuse de la protéine Cx40 à proximité de la membrane plasmique sans formation de jonction communicante intercellulaire, nécessaire à la propagation du potentiel d'action entre cellules. On observe alors l'apparition de bloc de conduction locaux (Makita et al. 2012). Cette étude met en avant l'importance primordiale de la Cx40 dans la propagation normale de l'influx électrique le long du tissu de conduction.

Des études antérieures sur des souris KO (+/- et/ou -/-) avaient déjà permis de mettre en évidence de multiples altérations de la conduction cardiaque : prolongation du PR (Kirchhoff et

al. 1998; Simon, Goodenough, et Paul 1998), diminution de la conduction atrioventriculaire (Hagendorff et al. 1999; Verheule et al. 1999), blocs de branches gauches et blocs de branches droits (Saffitz et Schuessler 2000; Rijen et al. 2001)... Un élargissement du complexe QRS a été décrit (Kirchhoff et al. 1998; Verheule et al. 1999) mais pas lorsque le ventricule est entraîné depuis l'apex, ce qui montre que la prolongation de la conduction ventriculaire est due à l'altération du système de conduction (Veen, Rijen, et Opthof 2001).

Une étude émet l'hypothèse que la régulation négative de Cx40 dans des cas de mutations *NKX2.5* pourrait être la cause des TdC, tout d'abord parce que le promoteur de Cx40 contient un site de liaison à *NKX2.5* mais aussi parce que les souris homozygotes KO Cx40^{-/-} présentent des blocs de conduction. Une telle régulation de Cx40 a été imaginée comme pouvant être un même résultat issu de plusieurs variants intervenant notamment dans les gènes *NKX2.5* et *TBX5* (Wolf et Berul 2006). Des variants dans ces gènes peuvent en effet aussi impliquer des TdC non isolés.

V.5. Autres gènes impliqués

D'autres gènes ont été identifiés dans des formes de TdC associées à une autre pathologie cardiaque ou non (cardiopathie congénitale, cardiomyopathie, trouble neuromusculaire...) (Benson 2004; Wolf et Berul 2006; Baruteau, Probst, et Abriel 2015) :

➤ *NKX2.5*

Ce gène code pour un facteur de transcription spécifique du cœur impliqué au cours de la morphogénèse cardiaque dans le contrôle de la septation et dans l'embryogénèse des voies de conduction, en particulier du nœud atrioventriculaire, puis dans leur maturation et le maintien de leur intégrité au cours de la vie (Schott et al. 1998; Moskowitz et al. 2007). Une analyse de liaison dans quatre familles présentant des malformations cardiaques congénitales (principalement communication inter-atriale, communication inter-ventriculaire et tétralogie de Fallot) associées à des troubles de conduction a conduit au séquençage direct du gène *NKX2.5* situé dans l'intervalle de liaison d'intérêt. Trois mutations ont été mises en évidence. Elles induisaient une haploinsuffisance, altérant la fixation du facteur de transcription *NKX2.5* à l'ADN (Schott et al. 1998).

Depuis, plusieurs mutations dans ce gène ont été décrites et associées à différentes pathologies cardiaques congénitales (communication inter-atriale, sténose aortique, hypertrophie du ventricule gauche, tétralogie de Fallot, atésie pulmonaire, communication inter-ventriculaire, non-compaction ventriculaire...), avec ou sans TdC (Benson et al. 1999; McElhinney et al. 2003; Sarkozy et al. 2005; Ouyang et al. 2011; Guntheroth et al. 2012). Une étude récente montre que *NKX2.5* semble réguler la prolifération des cardiomyocytes atriaux ainsi que du tissu de conduction (Nakashima et al. 2014).

➤ *TBX5* (*T-box transcription factor 5*)

Ce gène code pour un autre facteur de transcription (T-box transcription Factor 5) jouant un rôle majeur dans le développement cardiaque. Tout comme *NKX2.5*, ce gène joue un rôle majeur dans la spécification du système de conduction cardiaque, ventriculaire notamment (Moskowitz et al. 2007).

Des mutations familiales gain de fonction dans le gène *TBX5* causent le syndrome de Holt-Oram caractérisé par des malformations cardiaques de gravité variable avec des anomalies des membres supérieurs (Basson et al. 1997). Des troubles du rythme et de la conduction sont souvent associés à ce syndrome comme une bradycardie sinusale, des fibrillations atriales et des BAV de degré variable. De nouvelles mutations dans ce gène ont été identifiées chez des patients atteints de ce syndrome et présentant des communications inter-atriales, des anomalies du septum ventriculaire ou atrioventriculaire possiblement associés à une coarctation de l'aorte (McDermott, Fong, et Basson 1993; Baban, Pitto, et al. 2014).

Une autre étude associe des mutations de ce gène à une tétralogie de Fallot avec BAV (Baban, Postma, et al. 2014), comme *NKX2.5*, suggérant que ces deux gènes interagissent en s'influençant l'un l'autre et/ou qu'ils font partie de la même voie de signalisation.

Le gène *TBX3*, de la même famille et contigu de *TBX5*, a été impliqué dans des formes du syndrome de Schinzel. Une publication récente a mis en lumière la délétion de ces deux gènes chez un patient présentant à la fois le syndrome de Holt-Oram et le syndrome de Schinzel avec des malformations bilatérales symétriques des membres, des malformations cardiaques congénitales et des TdC rapidement progressifs (Bogarapu et al. 2014).

➤ *PRKAG2*

PRKAG2 code la sous-unité $\gamma 2$ de la protéine kinase AMP dépendante. Ce gène décrit depuis 2001 dans des formes familiales de cardiomyopathie hypertrophique et de syndrome de Wolff-Parkinson-White est associé à un phénotype hétérogène associant pré-excitation ventriculaire, troubles de conduction sévères, cardiomyopathie hypertrophique, fibrillation atriale ou flutter atrial paroxystiques et même des myopathies (Blair et al. 2001; Gollob, Green, et al. 2001; Gollob, Seger, et al. 2001; Arad et al. 2002).

Plusieurs mutations ont été décrites et associées à des phénotypes un peu différents. Ainsi, la mutation faux-sens p.S548P a été associée chez un patient sporadique à une cardiomyopathie hypertrophique, à une glycogénose des muscles squelettiques et à de sévères TdC (Laforêt et al. 2006). La mutation p.R302Q a quant à elle été mise en évidence dans une famille présentant un phénotype tardif (après 60 ans) très spécifique avec des troubles conductifs (BBD et parfois HBAG), un PR court, une pseudo hypertrophie atriale, des extrasystoles supraventriculaires, dysfonction sinusale, sans syndrome de Wolff-Parkinson-White, ni cardiomyopathie hypertrophique, ni myopathie (Charron et al. 2007; Pochmalicki et al. 2007). Cette mutation a été retrouvée chez une patiente de 48 ans souffrant de palpitations occasionnelles et de dyspnée à l'effort et ne présentant qu'une bradycardie sinusale avec un rythme cardiaque moyen de 40 bpm et des pauses sinusales pouvant durer 2,5 secondes. Elle est régulièrement contrôlée pour le développement précoce d'une cardiomyopathie hypertrophique (Govindan, Ward, et Behr 2010). Récemment, la mutation p.G100S a été identifiée dans une famille de 4 générations dont douze membres sont atteints du syndrome de Wolff-Parkinson-White, avec des TdC et/ou une cardiomyopathie hypertrophique (B. Zhang et al. 2013).

➤ *LMNA*

Ce gène code pour les lamines A et C par épissage alternatif du transcrit primaire (Figure 26). Ces protéines sont exprimées dans toutes les cellules somatiques différenciées de multiples tissus différents, notamment les muscles striés et cardiaque. Dans le noyau, elles se dimérisent puis s'assemblent tête-bêche pour former, avec les lamine B, la lamina nucléaire correspondant au nucléosquelette, un réseau protéique sous-jacent à la membrane nucléaire interne qui permet de déterminer la forme et la taille du noyau (Ben-Harush et al. 2009; Bertrand et al. 2011b; Luo, Mastaglia, et Wilton 2014).

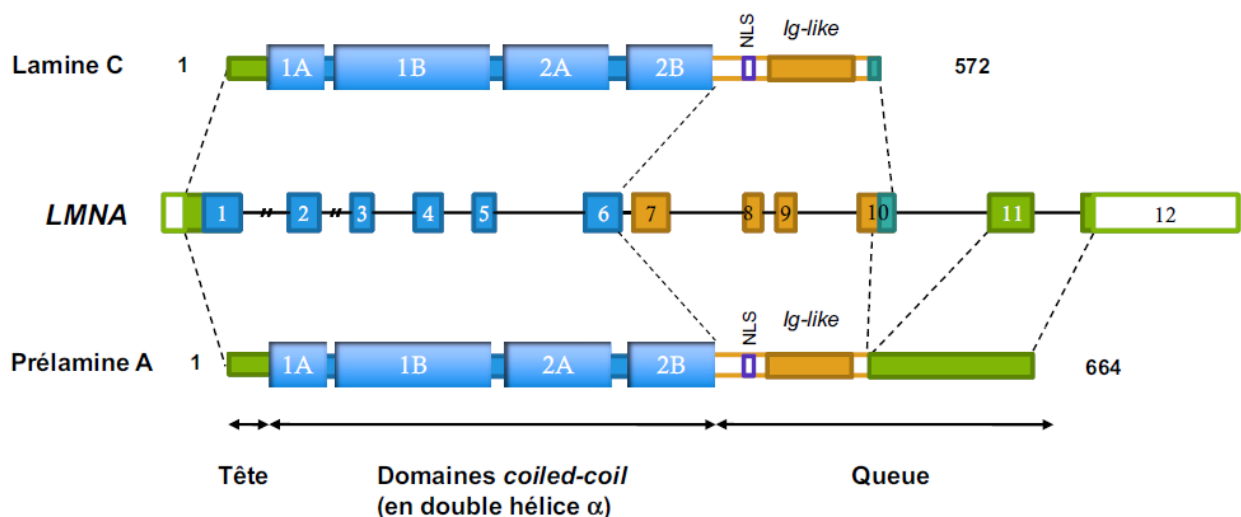


Figure 26 – Représentation du gène *LMNA* et des deux isoformes majoritaires codées par le gène (Lamine A et C)

La partie verte codée par une partie de l'exon 1 correspond à un domaine sans organisation particulière de la tête. Les parties en bleu correspondent aux 4 domaines structurés en hélice α , permettant la dimérisation des lamines. La queue des lamines comprend, le signal de localisation nucléaire (NLS) en violet, le domaine de structure similaire aux immunoglobulines (domaine Ig-like) en marron et la partie C terminale en vert, différente entre la lamine A et la lamine C. L'extrémité C-terminale de la lamine C provient de la transcription de la fin de l'exon 10, alors que l'extrémité C-terminale de la prélamine A correspond à la traduction des exons 11 et 12. Cette dernière subit ensuite quelques modifications post-traductionnelles pour donner la lamine A mature.

Non modifié d'après (Bertrand et al. 2011a)

Les lamines sont vraisemblablement impliquées dans la stabilité nucléaire, la structure de la chromatine, l'expression génique, la mitose cellulaire et d'autres mécanismes qui ne sont pas tous encore connus (Sylvius et Tesson 2006; Bertrand et al. 2011b; Luo, Mastaglia, et Wilton 2014).

Des mutations dans ce gène sont responsables des laminopathies, groupe très hétérogène de pathologies pouvant être tissu-spécifiques, multi-tissulaires ou systémiques dans le cas de syndromes de vieillissement prématuré (Worman et Bonne 2007). Les principaux tissus touchés sont les tissus musculaires, adipeux et nerveux. La première mutation dans le gène *LMNA* a été décrite en 1999, chez les membres d'une grande famille française atteints de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) de transmission autosomique dominante (Gisèle Bonne et al. 1999). Depuis lors, plus d'une dizaine de syndromes cliniques différents ont été attribués à

des mutations de *LMNA*, dont des TdC associés à des cardiomyopathies dilatées (CMD-TdC) (Figure 27 et voir le site <http://www.umd.be/LMNA/>) (Fatkin et al. 1999; Worman et Bonne 2007; Bertrand et al. 2011b; Stallmeyer, Koopmann, et Schulze-Bahr 2012; Luo, Mastaglia, et Wilton 2014).

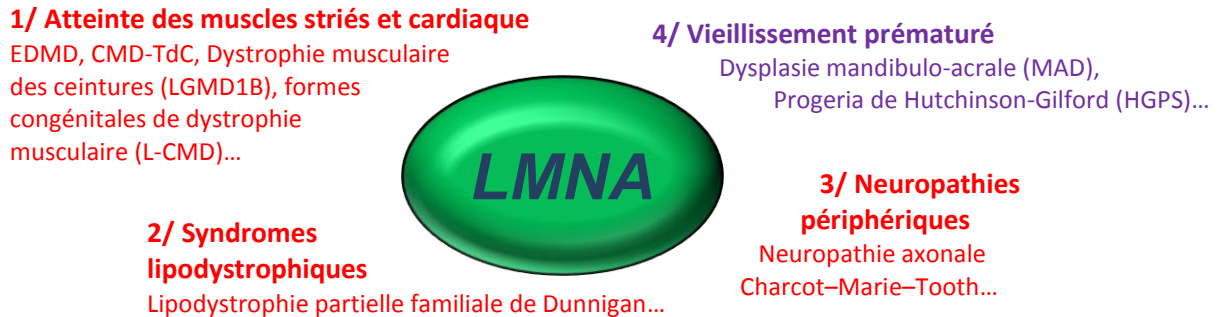


Figure 27 – Schéma représentant les principales atteintes liées aux laminopathies

En rouge sont notées les laminopathies tissu-spécifiques ou multi-tissulaires et en violet les syndromes systémiques

Chez les patients ayant une mutation *LMNA*, la première atteinte cardiaque généralement découverte correspond à l'altération de la conduction cardiaque. Une méta-analyse d'une cohorte de 299 patients porteurs d'une telle mutation a montré que 18 % des patients de moins de dix ans présentent des TdC alors que ce chiffre s'élève à 92 % pour les patients de plus de 30 ans, dont 44 % nécessitant alors l'implantation d'un pacemaker (Berlo et al. 2005). Les patients commencent par présenter des ondes P de faible amplitude, un intervalle PR allongé mais un complexe QRS relativement normal. Après 50 ans, 64 % des patients présentent une insuffisance cardiaque.

Plus de 460 mutations ont été recensées dans la base de données UMD-LMNA (www.umd.be/LMNA/), la majorité (environ 80 %) étant liées à des laminopathies des muscles striés, mais la relation génotype/phénotype reste toujours floue (Figure 28) (Bertrand et al. 2011a; Bertrand et al. 2011b; Luo, Mastaglia, et Wilton 2014) :

- les mutations entraînant des laminopathies des muscles striés - EDMD, LGMD1B (dystrophie musculaire des ceintures), CMD-TdC... - sont localisées tout au long du gène et, contrairement aux autres laminopathies, il n'y a pas de point chaud de mutation pour les atteintes de ce tissu ;

- les mutations entraînant des laminopathies du tissu adipeux sont retrouvées essentiellement dans les domaines N- et C-terminaux, mais surtout au niveau du domaine Ig-like avec un « point chaud » de mutation au niveau du résidu 482 (80 % des patients) ;
- les mutations entraînant des syndromes de vieillissement prématuré (HGPS, MAD...) sont retrouvées majoritairement dans le domaine en N-terminal et en C-terminal avec un « point chaud » en position 608 (77 % des patients avec HGPS) et un point chaud en position 527 (85 % des patients avec MAD) ;
- la mutation entraînant une laminopathie isolée du nerf périphérique correspond à l'unique mutation p.R298C.

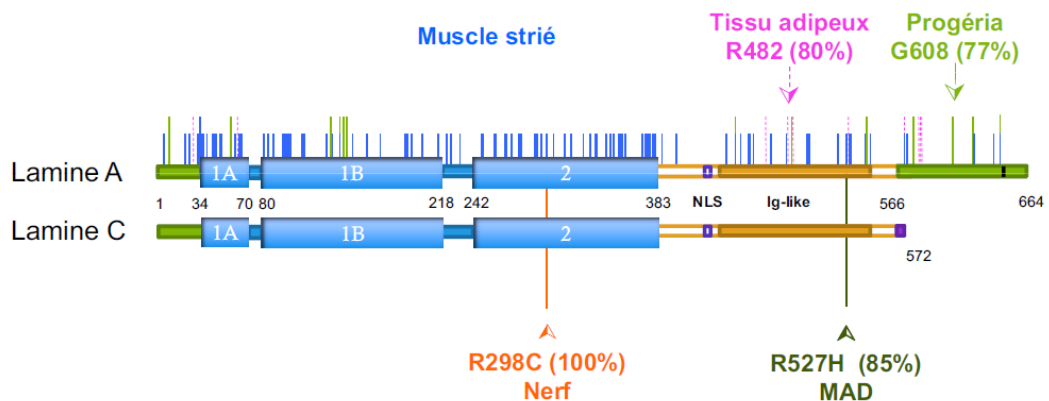


Figure 28 – Répartition des 301 premières mutations du gène *LMNA* en fonction des phénotypes associés

Ces mutations sont recensées dans la base de données UMD-LMNA (www.umd.be/LMNA). Les mutations affectant les muscles striés sont indiquées par des traits continus bleus, celles affectant le tissu adipeux par des traits en pointillés roses, les mutations entraînant des syndromes de vieillissement prématuré sont indiquées par des traits continus verts et l'unique mutation décrite induisant une atteinte isolée du nerf périphérique est indiquée par un trait continu en orange.

Modifié d'après (Bertrand et al. 2011a)

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer la grande diversité des phénotypes associés aux laminopathies. Parmi elles, trois semblent particulièrement intéressantes (Broers et al. 2006; Bertrand et al. 2011a; Bertrand et al. 2011b) :

- « Hypothèse structurale »

Cette hypothèse est basée sur le rôle primordial des lamines A/C dans le maintien l'intégrité des cellules en liant le nucléosquelette au cytosquelette (Haque et al. 2006). Les mutations du gène *LMNA* entraîneraient une faiblesse de la lamina nucléaire qui impliquerait une incapacité de la cellule à résister aux dommages induits par le stress. Cela serait particulièrement délétère au niveau des tissus contractiles tels que le cœur et les muscles squelettiques à cause des contractions répétées des cellules de ces tissus ;

- « Hypothèse de régulation génique »

Cette hypothèse est basée sur les nombreuses interactions des lamines A/C avec des facteurs de transcription, la chromatine et les histones. Dans cette hypothèse, les mutations *LMNA* provoqueraient des défauts d'interaction avec ses partenaires et donc des défauts épigénétiques (altération de la conformation de la chromatine) et/ou de régulation de voies de signalisation (Benedetti et al. 2007; Bollati et al. 2012) ;

- « Hypothèse de toxicité cellulaire »

Cette hypothèse suggère une accumulation de lamines mutées et immatures ayant une fonction extrêmement toxique pour les cellules. Ce type d'accumulation est particulièrement retrouvé dans le cas de syndromes de vieillissement prématuré.

Même si certaines hypothèses semblent mieux correspondre à certains phénotypes, la réalité est plus complexe et la relation génotype/phénotype demeure incomprise. Il existe par exemple des mutations *LMNA* qui ont été observées chez des patients atteints de HGPS, sans accumulation de lamine anormale (M. Eriksson et al. 2003). De nombreuses observations montrent de plus que dans tous les types de laminopathies, les trois hypothèses physiopathologiques (structurale, régulation génique et toxicité cellulaire) sont probablement en jeu.

D'ailleurs, les laminopathies ne correspondent pas un groupe de pathologies distinctes et sans relation. Tout comme pour *SCN5A*, il existe en réalité une notion de continuum dans les phénotypes et l'on peut observer des chevauchements : les patients porteurs de mutations dans le gène *LMNA* présentent dans près de 11 % des cas des signes cliniques chevauchant affectant différents tissus (Bertrand et al. 2011b). Ainsi, certains patients présentent par exemple une atteinte musculaire associée à une lipodystrophie partielle (Garg, Speckman, et Bowcock 2002), une atteinte des nerfs périphériques (Goizet et al. 2004) ou un syndrome de vieillissement

prématuré (Kirschner et al. 2005). De plus, il ne semble pas vraiment y avoir une relation directe entre la localisation du variant et le phénotype observé puisque des mutations affectant le même acide aminé peuvent impliquer des phénotypes différents. C'est le cas de quatre mutations intervenant sur la tyrosine hydrophobe très conservée en position 259 : Y259D induit un phénotype EDMD (Benedetti et al. 2007), Y259X induit un phénotype LGMD1B à l'état hétérozygote mais est létal à l'état homozygote (van Engelen et al. 2005), Y259H induit un phénotype classique CMD-TdC associé à des arythmies (fibrillation atriale ou tachycardie ventriculaire) (Saga et al. 2009) et Y259C induit un phénotype similaire CMD-TdC avec flutter atrial (Nguyen 2008).

Une même mutation peut aussi impliquer des phénotypes différents. C'est notamment le cas de la mutation p.E358K qui a été identifiée chez des patients atteints de LGMD1B à l'âge adulte, chez des patients atteints de formes précoces d'EDMD et chez des patients atteints de formes congénitales de dystrophie musculaire (L-CMD) (Mercuri E et al. 2004). De plus, au sein même d'une famille, on peut observer des phénotypes différents, certains individus développant une atteinte cardiaque et musculaire de type EDMD ou LGMD1B, tandis que chez d'autres individus, seuls le phénotype cardiaque se manifeste à l'âge adulte (Bécane et al. 2000; Brodsky et al. 2000). Une famille a récemment été décrite avec des phénotypes plus ou moins sévères de CMD (Roncarati et al. 2013). Les patients dont l'atteinte est sévère présentent également un variant dans le gène de la titine *TTN*, suggérant un rôle de régulateur pour ce gène.

On observe un continuum des pathologies selon leur sévérité. Le spectre des atteintes squelettiques s'étend des formes congénitales (L-CMD), les plus sévères, aux formes les moins sévères correspondant aux cardiopathies isolées (CMD-TdC) en passant par les formes juvéniles (EDMD) et les formes adultes (LGMD1B) touchant également les muscles squelettiques. Il en est de même pour les syndromes de vieillissement prématuré qui peuvent être considérés comme une même pathologie évoluant des formes les plus précoces, létales, congénitales voire embryonnaires (akinésie fœtale sévère, dermopathie restrictive), aux formes plus tardive (MAD) en passant par les formes intermédiaires juvéniles (HGPS) (Bertrand et al. 2011a).

V.6. Variants fréquents dans les troubles du rythme et de la conduction cardiaques

On peut supposer l'implication d'autres gènes non encore identifiés, comme par exemple les gènes codant les nombreuses protéines partenaires des gènes déjà impliqués. Ainsi les mutations intervenant dans gènes codant les canaux ioniques cardiaques, les facteurs de transcriptions cardiaques, les protéines du cytosquelette et toutes les protéines partenaires peuvent conduire à une altération de la conduction cardiaque en intervenant dans les mêmes voies de signalisation que les protéines déjà impliquées (Abriel 2010; Adsit et al. 2013; Baruteau, Probst, et Abriel 2015).

Les gènes précédemment cités ont été identifiés dans des formes sévères de TdC. La stratégie génétique consistait en la découverte de variants rares à effets forts (Figure 1 page 5). Les derniers progrès technologiques et l'amélioration continue des puissances de calculs permettent depuis une quinzaine d'années d'envisager une nouvelle stratégie. Elle consiste en la recherche de variants fréquents à effets modérés (Figure 1 page 5), prédisposant à la pathologie, par le biais d'études d'association (en anglais *GWAS* pour *Genome-Wide Association Study*) qui nécessitent cependant un grand nombre de patients (voir le principe détaillé au paragraphe 'Approche « population »' page 7).

Ces dernières années, ce type d'étude a permis d'identifier de nombreux variants dans des cohortes de patients atteints de pathologies communes et plusieurs se sont intéressées à des variants ayant un effet sur des paramètres électrocardiographiques caractéristiques de la conduction tels que la durée du PR ou du QRS notamment.

En 2010, quatre études d'association importantes ont été publiées :

- La première, réalisée par une équipe anglaise (Chambers et al. 2010) sur une cohorte indienne de 6543 individus, a permis d'identifier une association entre un polymorphisme (variant génétique commun présent à plus de 1 % dans la population générale) et l'allongement de l'intervalle PR caractéristique de la conduction atrioventriculaire. Ce polymorphisme, référencé sous le nom de rs6795970, intervient dans le gène *SCN10A* (Figure 29). Ce résultat a été répliqué avec succès sur une autre cohorte de 6243 patients indiens et une cohorte de 5370 patients européens.
- La deuxième (Holm et al. 2010), réalisée sur près de 10 000 individus, a permis de mettre en évidence plusieurs associations significatives. Ils ont notamment identifié un locus lié

au rythme cardiaque (correspondant au gène *MYH6*), quatre loci liés à la durée de l'intervalle PR (correspondant aux gènes *TBX5*, *SCN10A*, *CAVI* et *ARHGAP24*) et quatre loci liés à la durée du QRS (dont deux correspondant aux gènes *SCN10A* et *TBX5*).

- La troisième (Sotoodehnia et al. 2010), réalisée sur 40 407 individus, a montré que des polymorphismes pouvaient influencer sur la durée de l'intervalle QRS. Parmi les 22 loci identifiés dans cette étude, celui présentant la probabilité d'association la plus forte est localisé sur le chromosome 3, en 3p22.2, où se trouvent les gènes *SCN5A* et *SCN10A*.
- La quatrième (Pfeufer et al. 2010), réalisée sur 28 517 individus, a permis d'identifier neuf loci associés à un allongement de l'intervalle PR, dont deux indépendants situés en 3q22.2 au niveau de *SCN5A* et *SCN10A*, un près de *NKX2.5* et un près de *TBX3/TBX5*.

Des études d'association similaires ont mis en évidence l'influence de polymorphismes sur d'autres paramètres de l'ECG. C'est notamment le cas dans l'étude de Pfeufer (Pfeufer et al. 2009) réalisée sur 15 842 individus qui a permis d'identifier 10 loci associés à un allongement de l'intervalle QT, ou encore de celle de den Hoed (den Hoed et al. 2013), réalisée sur 181 171 individus, qui a permis d'identifier 21 loci associés à la fréquence cardiaque, dont 14 nouveaux.

Les résultats de ces études confirment que des polymorphismes, qui sont des variants génétiques communs présents à plus de 1 % dans la population générale, peuvent réguler les différents paramètres de la conduction cardiaque.

On peut de plus remarquer que le gène *SCN10A*, codant pour une sous-unité alpha du canal sodique $Na_v1.8$, ressort souvent de ces études. Un polymorphisme de ce gène (rs10428132) a récemment été associé de la même manière à une augmentation du risque de présenter un syndrome de Brugada (C. R. Bezzina et al. 2013).

Il a été montré que $Na_v1.8$ est préférentiellement exprimé dans le système His-Purkinje de la souris par rapport au myocarde ventriculaire, et que des bloqueurs spécifiques de ces canaux entraînaient une prolongation de l'intervalle QRS, indiquant le ralentissement de la propagation de l'influx dans le système de conduction ventriculaire spécialisé et l'activation retardée du myocarde ventriculaire (Sotoodehnia et al. 2010).

Même si l'importance de l'expression de cette sous-unité dans les cellules cardiaques fait débat encore aujourd'hui, une étude récente (van den Boogaard et al. 2014) montre qu'un activateur situé dans le gène *SCN10A* interagit avec le promoteur de *SCN5A*, régulant ainsi son activité, et qu'il est essentiel pour l'expression cardiaque de *SCN5A*. En effet, cette étude a également

permis d'associer le polymorphisme rs6801957 de *SCN10A*, déjà corrélé à l'altération de la conduction, à une diminution de l'expression de *SCN5A* dans le cœur.

Ces résultats permettent d'entrevoir un mécanisme génomique par lequel un variant commun dans le gène *SCN10A* influence la physiologie cardiaque et prédispose à des arythmies et/ou à des TdC.

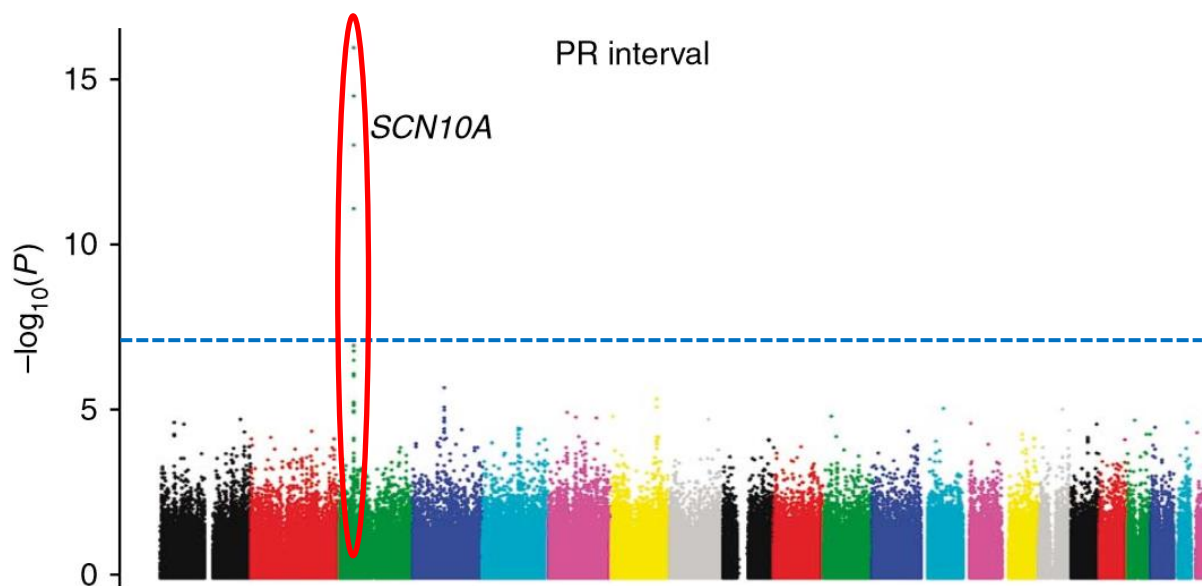


Figure 29 - Exemple du Manhattan plot montrant l'association d'un SNP localisé dans le gène *SCN10A* avec l'intervalle PR dans une GWAS de 6543 individus.

*Le seuil de significativité ($P= 5 \times 10^{-8}$) marqué par la ligne horizontale bleue en pointillés est dépassé par un pic sur le chromosome 3 correspondant au SNP rs6795970 dans le gène *SCN10A*, signifiant la forte probabilité d'une association entre ce SNP et l'allongement de l'intervalle PR.*

Modifié d'après (Chambers et al. 2010)

B. Résultats

I. PROJET 1 : Recherche de variants rares responsables de formes familiales de BAV dégénératifs

I.1. Présentation du projet

Une enquête épidémiologique réalisée par les cliniciens de notre équipe (Gourraud et al. 2012) a permis de dresser une carte de la région ouest de la France (Loire Atlantique, Vendée, Maine et Loire) et de visualiser les comtés de naissance des personnes implantées d'un pacemaker (PM) entre 1995 et 2005 (Figure 30).

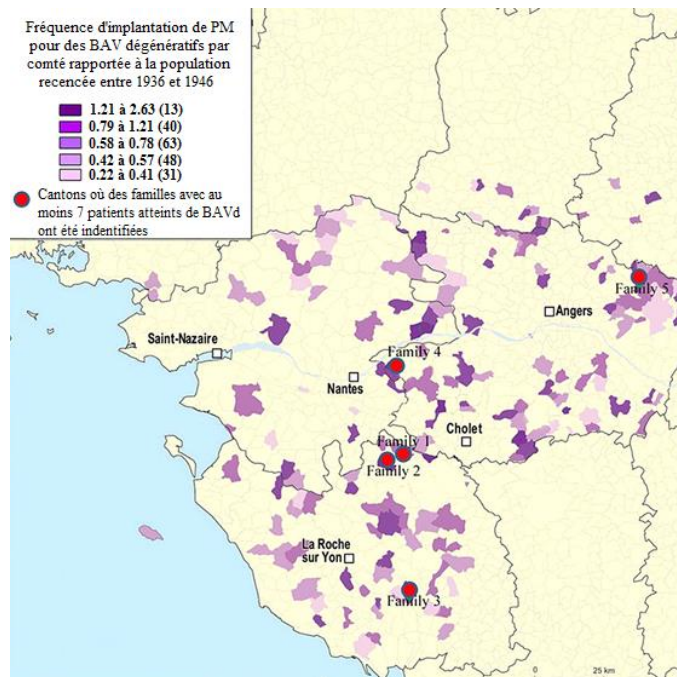


Figure 30 - Carte de la répartition des implantations de stimulateurs cardiaques pour des cas de TdC progressifs (BAVd) dans la région ouest de la France.

Les zones de haute fréquence d'implantation de pacemakers sont indiquées en violet. Cinq familles comprenant au moins 7 patients atteints ont été recrutées dans des zones de très haute fréquence d'implantation indiquées en rouge.

Modifié d'après (Gourraud et al. 2012)

Cela a permis le recrutement, dans des zones de haute probabilité d'implantation de PM en violet foncé sur la carte, de cinq grandes familles dont au moins sept membres sont atteints de BAVd (points rouges sur la carte).

Une de ces familles (Famille *SCN5A*) avait déjà été identifiée dans une étude précédente réalisée par notre équipe en 1999 en utilisant une approche génétique standard, validant au passage l'approche épidémiologique utilisée. Cette étude avait permis de démontrer l'implication du gène *SCN5A* en identifiant la mutation génétique d'épissage (c.3963 + 2T> C) qui ségrégeait parfaitement avec le phénotype (Schott et al. 1999).

Les gènes *SCN5A*, *SCN1B* et *TRPM4* ont été directement séquencés par séquençage capillaire chez le propositus des quatre autres familles, et aucun variant n'a pu être détecté. De même, la présence de réarrangements chromosomiques (CNV) a été testée sur les cas index des familles A, B et D par la technique de CGH (Hybridation Génomique Comparative) mais aucun CNV potentiellement causal n'a été détecté.

I.2. Description clinique des familles

➤ Description générale

En 2012, l'analyse globale de ces familles a montré que plus d'un tiers des patients étaient implantés d'un PM (38 %) et que l'âge moyen d'implantation était de 69 ± 13 ans. Les TdC les plus fréquents sont les hémiblocs (44 %), les blocs de branche droit (33 %) et les blocs pariétaux³ (24 %). Les blocs de branche gauche n'ont été retrouvés que dans 5 % des atteints (Tableau 8).

³ Un bloc pariétal (BP) est caractérisé par complexe QRS large (>115 ms) sans morphologie QRS de bloc de branche gauche (BBG) ou droit (BBD) à l'ECG.

Famille	BBD	BBD + HBAG	BBD + HBPG	BBG	HBAG	HBPG	BP	BP + HBAG	PM	Nombre d'atteints	Nombre total de membres
A	0	0	0	1 (9%)	3 (27%)	0	0	5 (45%)	5 (45,4%)	11	49
B	3 (19%)	4 (25%)	1 (6%)	0	2 (13%)	0	1 (6%)	0	6 (37,5%)	16	112
C	1 (8%)	1 (8%)	1 (8%)	1 (8%)	5 (38%)	0	0	2 (15%)	5 (38,5%)	13	58
D	5 (28%)	8 (44%)	0	0	0	0	1 (6%)	2 (11%)	8 (44,4%)	18	60

Tableau 8 – Types de troubles de conduction identifiés chez les membres atteints des 4 familles recrutées (données de 2012)

(BBD = Bloc de Branche Droit ; HBAG = Hémibloc Antérieur Gauche ; HBPG = Hémibloc Postérieur Gauche ; BBG = Bloc de Branche Gauche ; BP = Bloc Pariétal ; PM = Pacemaker)

Modifié d'après (Gourraud et al. 2012)

La répartition de ces TdC n'est pas similaire d'une famille à l'autre. Si la famille *SCN5A* présentait tous les types de TdC avec répartition relativement homogène (Schott et al. 1999; Probst et al. 2003) comme cela a été décrit dans la description de la maladie de Lenègre (Lenègre et Moreau 1963), on observe dans les quatre autres familles une hétérogénéité des phénotypes. Deux profils se dégagent :

- Familles A et C : on observe une plus grande variabilité phénotypique avec, dans la majorité des cas, des hémiblocs et des blocs pariétaux mais peu de BBD ;
- Familles B et D : on remarque une large majorité de BBD et d'hémiblocs (HB) sans aucun BBG. Ce profil est compatible avec les descriptions cliniques de la forme PFHB1 de TdC associées aux familles libanaise et sud-africaine pour lesquelles une mutation de *TRPM4* a pu être identifiée (Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010)(mais aucune variation dans ce gène détectée).

Ces hétérogénéités phénotypique et génotypique ne sont pas surprenantes si l'on considère la multitude de loci identifiés par étude d'association et statistiquement liées à des paramètres de la conduction cardiaque (Sotoodehnia et al. 2010), comme expliqué au paragraphe A.V.6 – Variants fréquents dans les troubles du rythme et de la conduction cardiaques page 70.

➤ *Famille A*

Dans la famille A, 160 membres ont pu être identifiés, parmi lesquels 78 ont été représentés sur l'arbre (Figure 32) du fait de la non-informativité des 82 autres (individus non examinés et sans descendance). Quinze patients sont atteints et neuf d'entre eux ont subi l'implantation d'un pacemaker. Huit autres membres de la famille présentent un BAV1. Ils sont considérés comme étant probablement atteints par les cliniciens de notre équipe, tout comme un autre patient souffrant d'un BBG incomplet.

Aucune information clinique antérieure à l'implantation n'est disponible pour le propositus (V-14). La patiente V-11 présente un BAV3. L'anomalie de conduction la plus fréquente est l'hémibloc antérieur gauche. En effet, neuf patients présentent ce type de TdC, associé à un BP pour quatre d'entre eux (Figure 31). Trois patients présentent un BBG, un patient appartenant à une branche éloignée du reste des atteints présente un BBD (patient V-1). Neuf patients atteints présentent également un BAV1 (Tableau 9).

Les durées de l'intervalle PR (232 ± 20 ms vs 164 ± 19 ms ; $p < 10^{-9}$) et du complexe QRS (130 ± 16 ms vs 89 ± 9 ms ; $p < 10^{-10}$) sont plus importantes pour le groupe des sujets atteints comparé au groupe des sujets non atteints comme pour les trois familles précédentes.

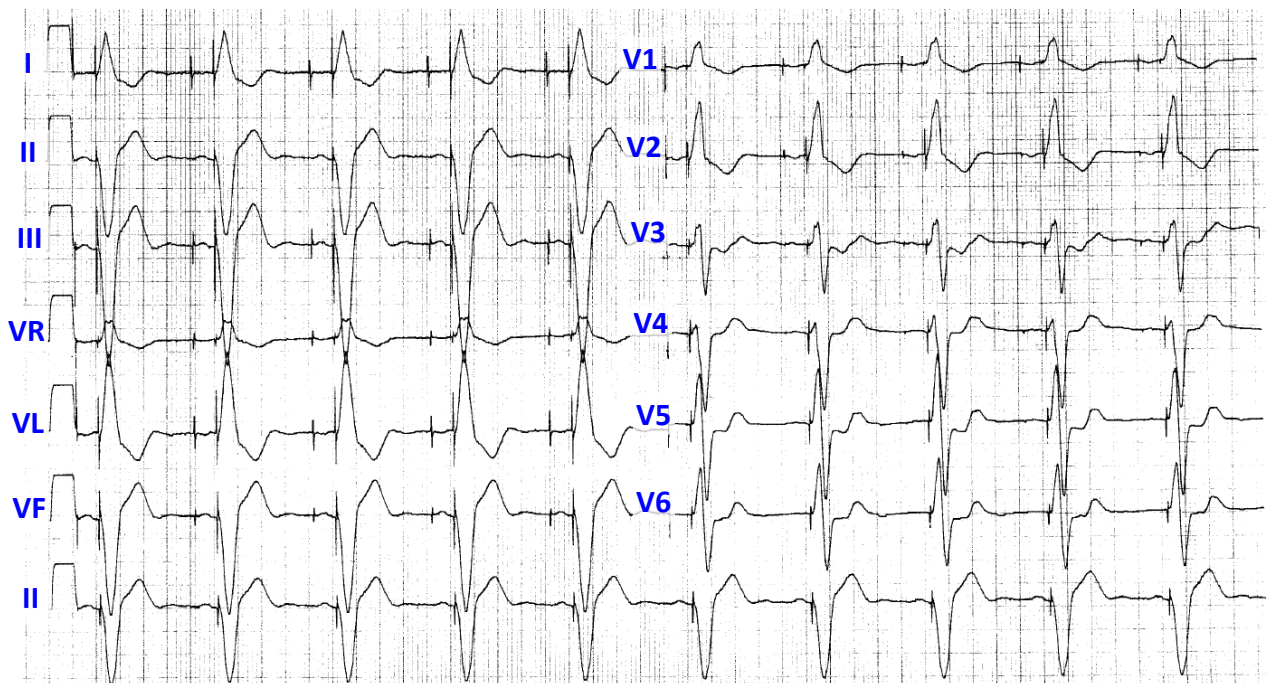
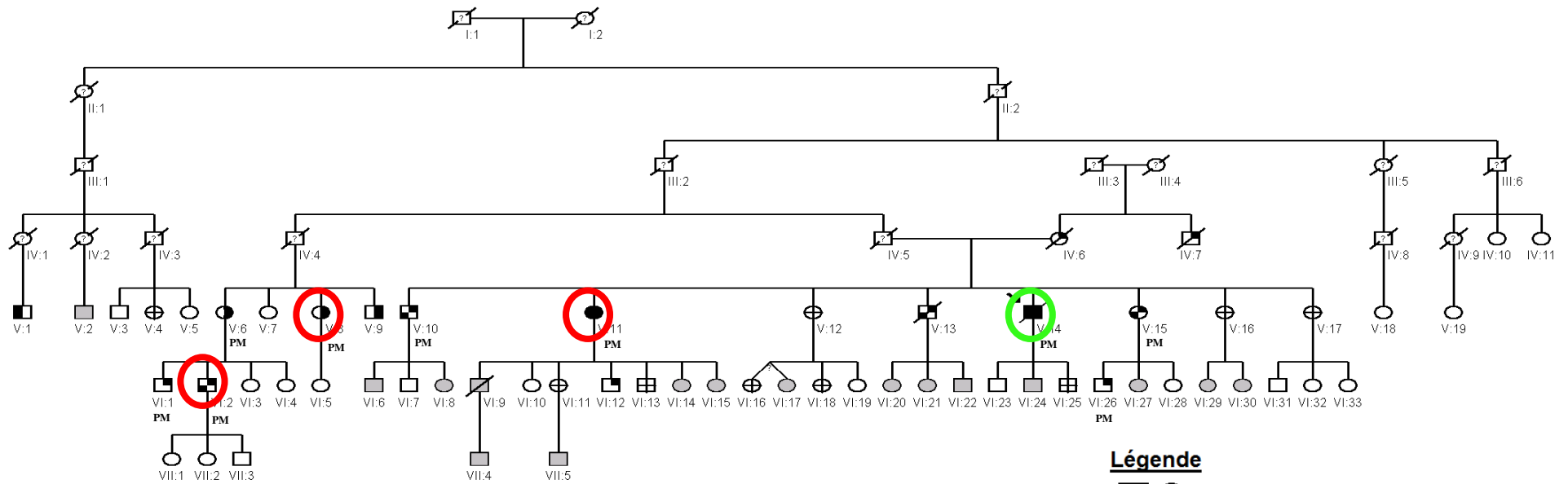


Figure 31 – Electrocardiogramme du patient V-15 montrant un HBAG et BP



Légende

- ○ sain
- ● BAV complet ou PM sans ECG préalable
- ▣ ⊕ Probablement atteint
- ▤ ● Probablement sain
- ? ○ ? Indéterminé
- ▣ ⊕ Hemibloc Antérieur Gauche (HBAG)
- ▣ ⊖ Bloc Pariétal (BP)
- ▣ ⊕ HBAG + PB
- ▣ ⊖ Bloc de Branche Gauche (BBG)
- ▣ ⊕ Bloc de Branche Droit (BBD)
- Séquençage d'exome
- Séquençage d'exome + CGH

Figure 32 – Arbre de la famille A

Les patients implantés d'un pacemaker sont annotés d'un 'PM'.

Individu	Date de naissance	PR	QRS	QTc	Conduction/ Morphologie QRS	Phénotype
IV-6	1910	nd	nd	nd	HBAG	atteint
IV-7	1905	nd	nd	nd	HBAG	atteint
V-1	25/01/1937	flutter	172	440	BBD	atteint
V-6	29/12/1932	240	140	440	BAV1+BBG	atteint (PM)
V-8 ⁽²⁾	28/09/1939	224	128	462	BAV1+ BBG	atteint (PM)
V-9	26/01/1946	200	122	420	BAV1+ BBG	atteint
V-10	30/05/1933	260	140	440	BAV1+HBAG+BP	atteint (PM)
V-11 ⁽²⁾	29/04/1935	BAV3	120	372	BAV3	atteint (PM)
V-13	23/05/1937	246	138	441	BAV1+HBAG+BP	atteint
V-14 ^(1,2,3)	09/06/1938	nd	nd	nd	(PM)	atteint (PM)
V-15	14/12/1941	220	115	433	BAV1+HBAG+BP	atteint (PM)
VI-1	24/01/1961	264	132	418	BAV1+HBAG	atteint (PM)
VI-2 ⁽²⁾	26/01/1956	232	126	423	BAV1+HBAG+BP	atteint (PM)
VI-12	30/06/1964	214	104	436	BAV1+HBAG	atteint
VI-26	05/02/1962	FA	136	452	HBAG	atteint (PM)

Tableau 9 – Caractéristiques cliniques des patients atteints de la famille A

⁽¹⁾ *propositus*; ⁽²⁾ *patients dont l'exome a été séquencé*; ⁽³⁾ *CGH réalisée sur l'ADN de ce patient.*

➤ *Famille B*

La famille B était également connue avant l'étude épidémiologique publiée en 2012 (Gourraud et al. 2012). Le propositus (patient III-6) a été hospitalisé dans le service des soins intensifs cardiologiques du CHU de Nantes à l'âge de 80 ans (Figure 33). Il présentait un BAV complet et trois de ses frères (III-2, III-4 et III-5) étaient porteurs d'un stimulateur cardiaque.

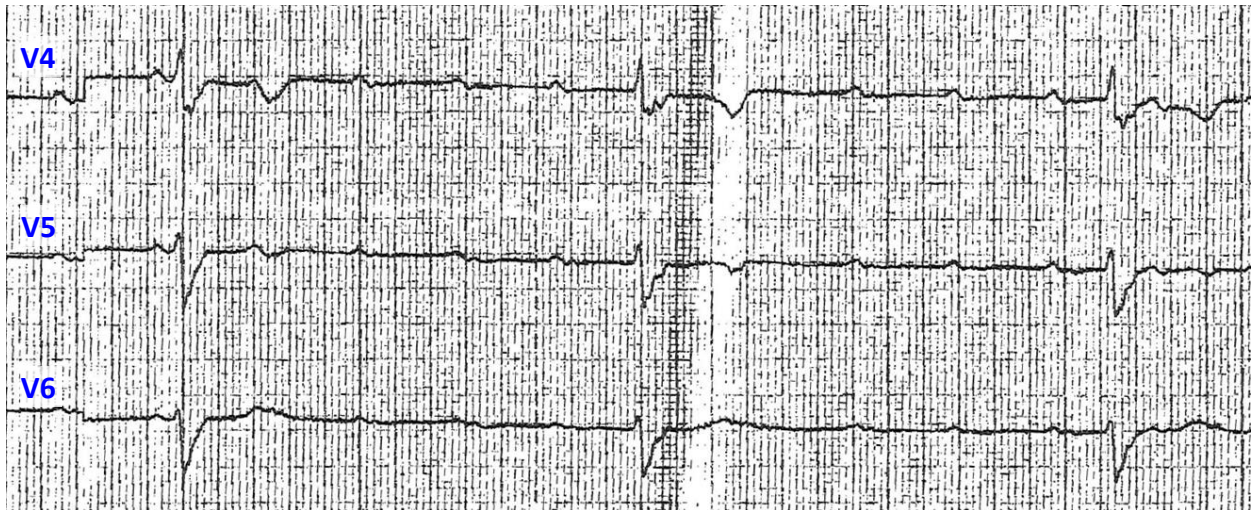
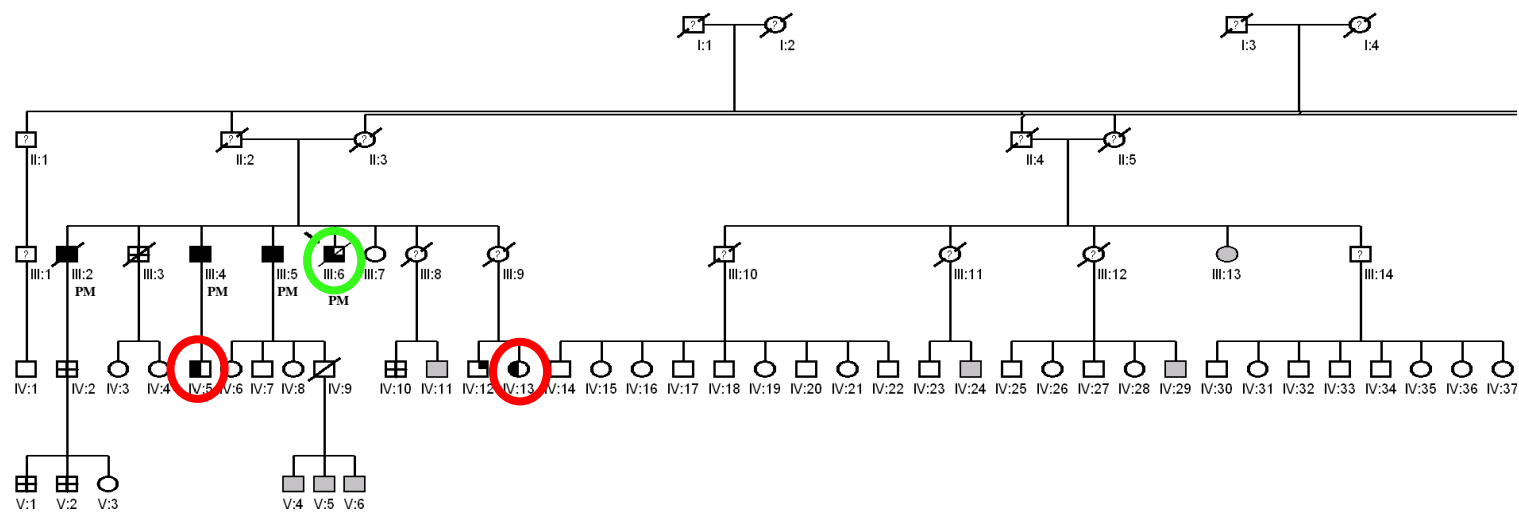


Figure 33 – Electrocardiogramme du propositus III-6 montrant un BAV3

Cet ECG a été enregistré lorsque ce patient a été admis au service des soins intensifs de cardiologie du CHU de Nantes



- Légende**
- ○ sain
 - ● BAV complet ou PM sans ECG préalable
 - ▣ ⊕ Probablement atteint
 - ▤ ⊖ Probablement sain
 - ? ○ ? Indéterminé
 - ▣ ⊕ Hemibloc Antérieur Gauche (HBAG)
 - ▣ ⊖ Hemibloc Postérieur Gauche (HBPG)
 - ▣ ⊕ Bloc Pariétal (BP)
 - ▣ ⊖ Bloc de Branche Droit (BBD)
 - ▣ ⊕ BBD+HBAG
 - ▣ ⊖ BBD+HBPG
 - Séquencage d'exome
 - Séquencage d'exome + CGH

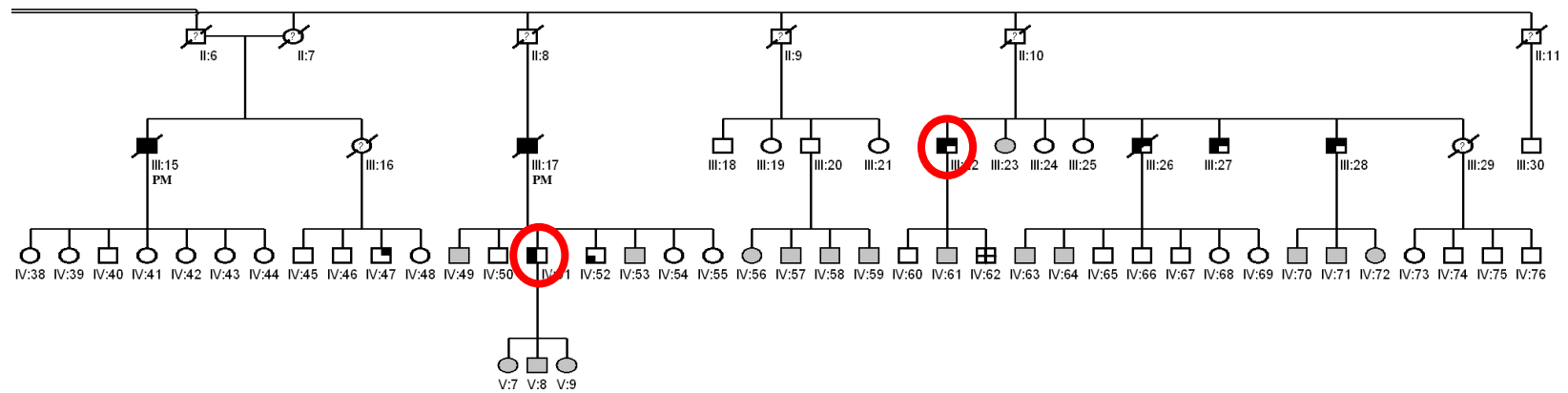


Figure 34 – Arbre de la famille B

Les patients implantés d'un pacemaker sont annotés d'un 'PM'.

A l'heure actuelle, 219 membres ont été recensés dans cette famille, mais seuls 131 d'entre eux ont été représentés sur l'arbre (Figure 34) du fait de la non-informativité des 88 autres (individus non examinés et sans descendance). Parmi les 107 membres de cette famille qui ont pu être examinés, 16 patients sont considérés atteints.

Six membres ont été implantés d'un PM. Les examens ECG ont révélé des TdC incluant des BBD avec HBAG pour 4 patients, un BBD complet pour 3 patients, un HBAG isolé pour 2 patients ainsi qu'un BBD associé à un HBPG pour un patient et un BP pour un patient. Pour les 5 autres patients atteints (III-2, III-4, III-5, III-15 et III-17), aucun ECG avant l'implantation du stimulateur cardiaque n'a pu être retrouvé (Tableau 10).

Individu	Date de naissance	PR	QRS	QTc	Conduction/ Morphologie QRS	Phénotype
III-2	19/11/1909	nd	nd	nd	(PM)	atteint (PM)
III-4	04/08/1916	nd	nd	nd	(PM)	atteint (PM)
III-5	03/05/1918	nd	nd	nd	(PM)	atteint (PM)
III-6 ^(1, 2, 3)	08/06/1919	220	140	473	BAV1+HBPG+BBD	atteint (PM)
III-15	29/08/1911	nd	nd	nd	(PM)	atteint (PM)
III-17	10/09/1912	nd	nd	nd	(PM)	atteint (PM)
III-22 ⁽²⁾	31/05/1929	176	148	438	HBAG+BBD	atteint
III-26	11/04/1927	200	120	440	HBAG+BBD	atteint
III-27	17/09/1934	162	130	407	HBAG+BBD	atteint
III-28	20/11/1936	152	136	471	HBAG+BBD	atteint
IV-5 ⁽²⁾	22/04/1948	108	108	407	BBD	atteint
IV-12	27/11/1942	202	94	381	HBAG	atteint
IV-13 ⁽²⁾	22/12/1935	204	126	433	BBD	atteint
IV-47	22/07/1937	FA	102	480	HBAG+BAV1+FA	atteint
IV-51 ⁽²⁾	23/08/1956	150	130	405	BBD	atteint
IV-52	04/09/1959	192	122	418	bloc pariétal	atteint

Tableau 10 – Caractéristiques cliniques des patients atteints de la famille B

⁽¹⁾ *propositus*; ⁽²⁾ *patients dont l'exome a été séquencé*; ⁽³⁾ *CGH réalisée sur l'ADN de ce patient*.

Des TdC mineurs ont également été retrouvés chez d'autres membres de la famille tels que des BBD incomplets (IV-2, V-1, V-2 notamment) ou des BAV1. Le patient III-3 présente lui un antécédent d'infarctus ainsi qu'une dysfonction sinusale, le patient IV-10 présente un BAV1 avec BBD et HBAG et le patient IV-62 présente un HBAG isolé. Ces 6 patients sont considérés comme probablement atteints.

Les durées de l'intervalle PR (177 ± 34 ms vs 157 ± 20 ms ; $p < 0.01$) et du complexe QRS (123 ± 16 ms vs 87 ± 10 ms ; $p < 10^{-19}$) sont plus importantes pour le groupe des sujets atteints comparé au groupe des sujets non-atteints.

Une analyse de liaison pan-génomique a déjà été réalisée par notre équipe (Florence Kyndt) en utilisant les 400 marqueurs chromosomiques dinucléotidiques du Génethon espacés de 10 cM (ABI PRISM™ Linkage Mapping Set-MD10 version 2, PE Biosystem). Pour cette analyse génétique, douze patients atteints avaient pu être inclus ainsi que seulement sept patients sains. Au vu de l'aspect dégénératif de la pathologie, il avait été décidé de ne choisir comme patients sains que les patients âgés de plus de 60 ans et ne présentant aucun TdC. Cette étude avait permis d'identifier un intervalle de liaison de 19 cM (5,16 Mb) en 16q23 avec un LOD score maximum de 4,53 (Figure 35).

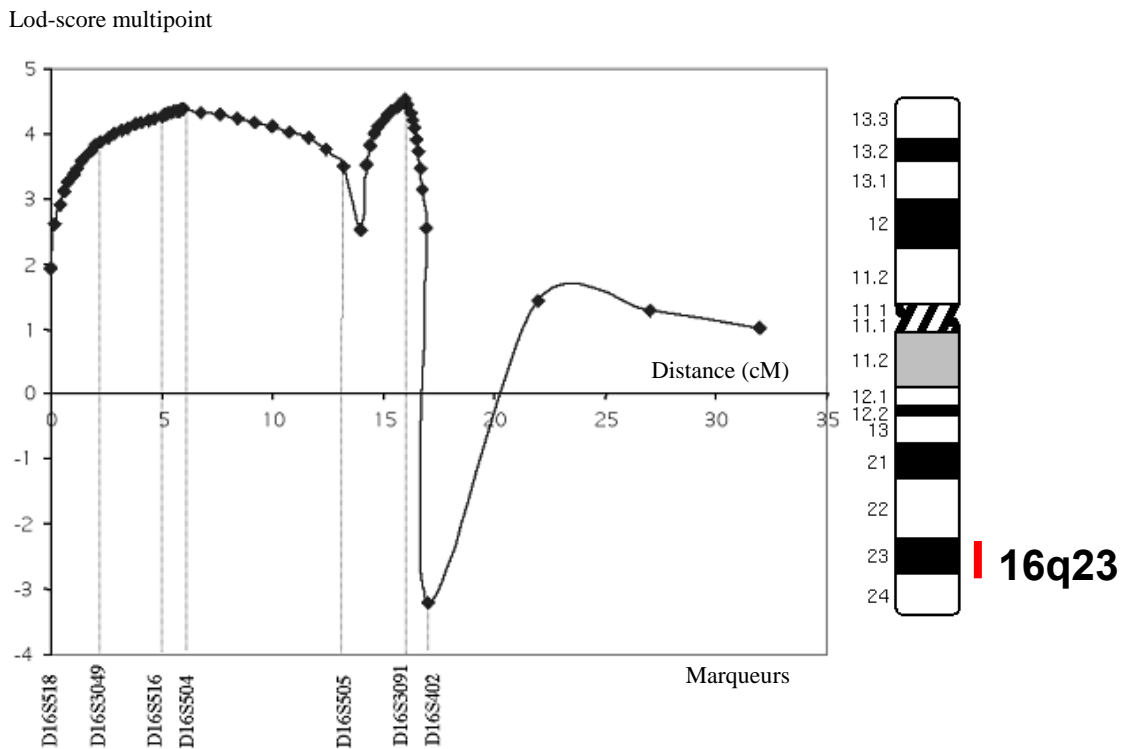


Figure 35 - Locus de TdC de la famille B sur le chromosome 16

Une analyse de liaison multipoint a été réalisée en comparant la ségrégation du phénotype et 7 marqueurs microsatellites. La distance séparant les marqueurs (en cM) est indiquée en abscisse et les valeurs des LOD scores sont indiquées en ordonnées.

Les régions codantes de quatre gènes candidats de l'intervalle de liaison avaient été séquencées par séquençage capillaire, sans résultat.

➤ *Famille C*

Cent quatre-vingt-dix-neuf individus composent la famille C, mais seuls 99 d'entre eux ont été représentés sur l'arbre (Figure 37) du fait de la non-informativité des 100 autres (individus non examinés et sans descendance). Parmi les 59 membres de cette famille qui ont pu être examinés, 13 patients sont considérés atteints et 2 probablement atteints.

Cinq membres atteints ont été implantés d'un PM, dont deux (VII-16 et VIII-11) à cause d'un BAV3. Le principal type de TdC observé est l'hémibloc antérieur gauche (chez 8 patients), isolé (chez 5 patients) ou associé à un bloc pariétal (chez 2 patients) (Figure 36) ou à un BBD (chez 1 patient). Un patient présente un BBD associé à un HBPG, un autre présente un BBD isolé et un autre présente un BBG isolé (Tableau 11).

Individu	Date de naissance	PR	QRS	QTc	Conduction/ Morphologie QRS	Phénotype
VII-5	25/09/1935	222	104	350	BAV1 + HBAG	atteint
VII-9 ⁽²⁾	16/03/1936	150	112	392	HBAG	atteint (PM)
VII-10	18/12/1930	160	140	423	BBD	atteint
VII-12	20/04/1909	FA	144	454	BBG + FA	atteint (PM)
VII-16 ⁽²⁾	08/09/1912	BAV3	150	396	BAV3	atteint (PM)
VII-17	01/12/1920	208	128	382	HBAG + BP	atteint
VIII-5 ⁽²⁾	13/08/1947	192	94	358	HBAG	atteint
VIII-10	15/07/1939	190	124	342	HBAG + BP	atteint
VIII-11 ^(1, 2)	26/11/1937	BAV3	156	440	BAV3	atteint (PM)
VIII-20	23/10/1939	160	92	401	HBAG	atteint
VIII-38	09/12/1928	180	120	438	HBPG + BBD	atteint
VIII-39 ⁽²⁾	20/07/1934	200	152	504	HBAG + BBD	atteint (PM)
VIII-40	06/02/1942	148	108	350	HBAG	atteint

Tableau 11 – Caractéristiques cliniques des patients atteints de la famille C

⁽¹⁾ *propositus*; ⁽²⁾ *patients dont l'exome a été séquencé.*

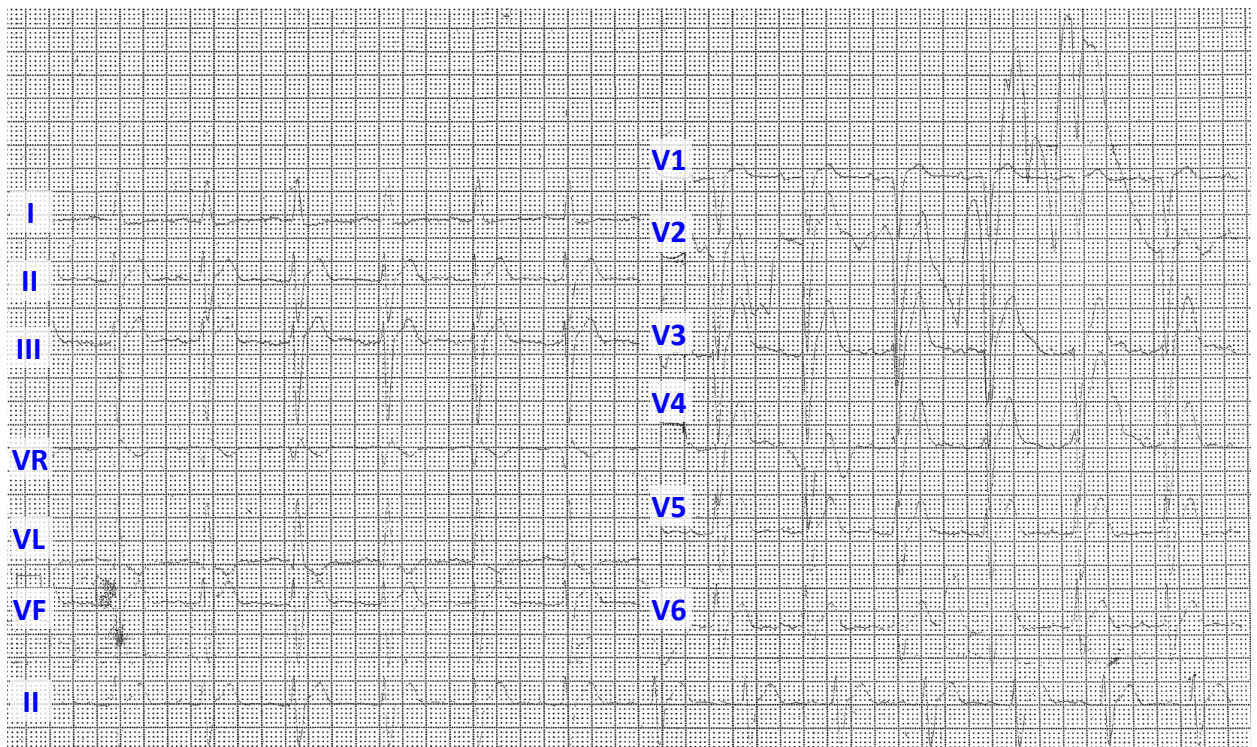


Figure 36 – Electrocardiogramme du patient VIII-10 montrant un HBAG et BP

Parmi les autres membres de la famille, des TdC mineurs ont également été retrouvés tels que des BAV1. Un membre de la famille (VII-8) présente également une déviation gauche de l'axe QRS et a été jugé probablement atteint par les cliniciens de notre équipe. De même, le patient VIII-25 est douteux et présente un antécédent d'infarctus. De plus, quatre patients, frères du propositus, sont décédés d'une mort subite douteuse (VII-3, VII-4, VII-6 et VII-7).

De même que pour la famille B, les durées de l'intervalle PR (181 ± 26 ms vs 159 ± 20 ms ; $p < 0.005$) et du complexe QRS (125 ± 22 ms vs 84 ± 10 ms ; $p < 10^{-9}$) sont plus importantes pour le groupe des sujets atteints.

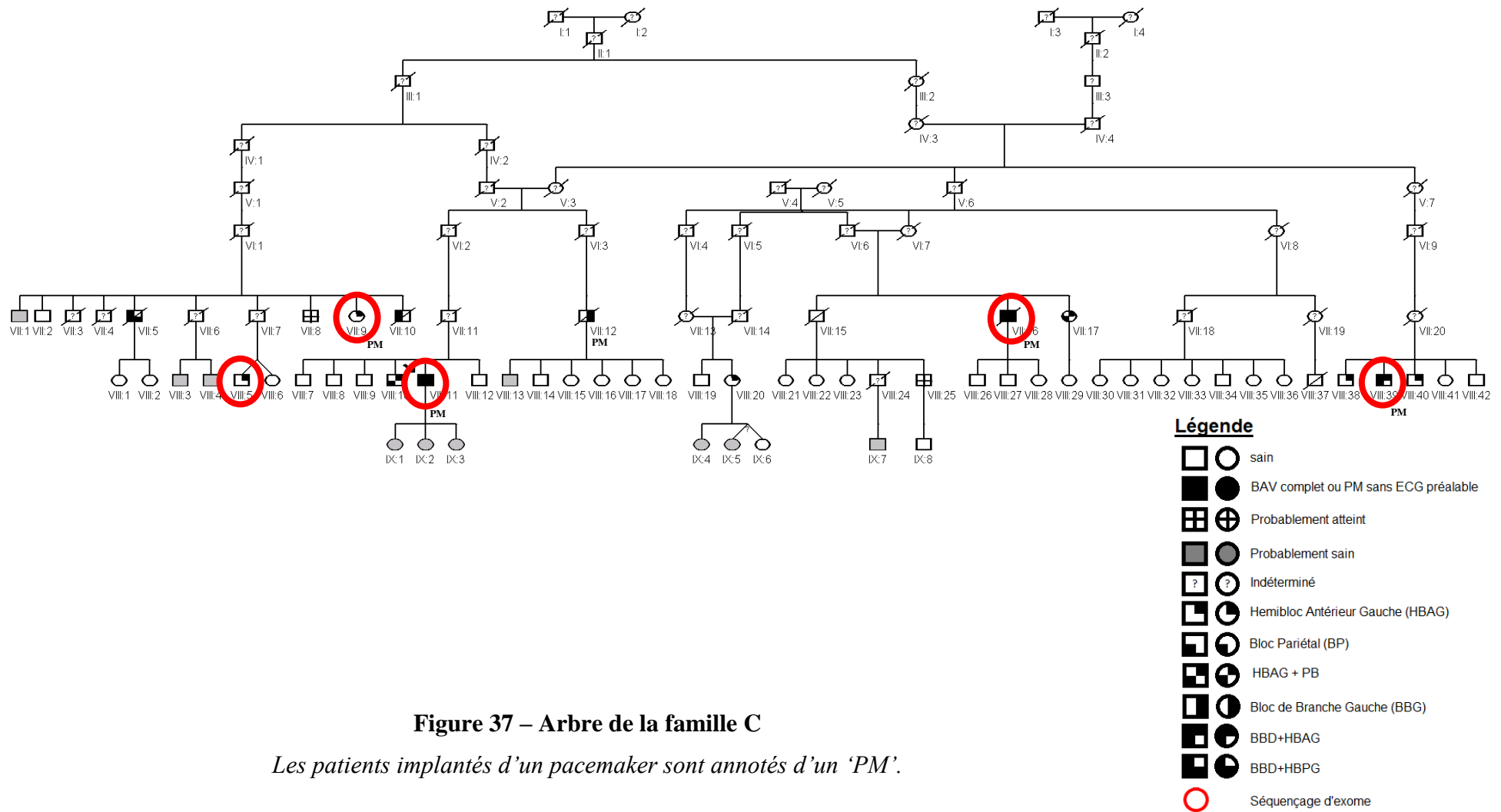


Figure 37 – Arbre de la famille C

Les patients implantés d'un pacemaker sont annotés d'un 'PM'.

➤ *Famille D*

La famille D est composée de 144 membres, mais seuls 67 d'entre eux ont été représentés sur l'arbre (Figure 39) du fait de la non-informativité des 77 autres (individus non examinés et sans descendance). Parmi les 60 membres de cette famille qui ont pu être examinés, 18 patients sont considérés atteints et 1 probablement atteint.

Huit membres atteints ont été implantés d'un PM, et pour deux d'entre eux (III-4 et III-15), aucune information clinique antérieure à l'implantation n'est disponible. Le propositus IV-12 présente un BAV3 avec un échappement à morphologie QRS de BBD+HBAG (Figure 38). Le principal type de TdC observé est le BBD associé à un HBAG (chez 7 patients) ou isolé (chez 5 patients). Deux patients présentent un HBAG associé à un BP et un patient présente un BP isolé (Tableau 12). Parmi les atteints, six présentent également un BAV1 et la patiente III-8 ne présentait également qu'un BAV1 avant l'implantation de son PM. Elle a été classée probablement atteinte.

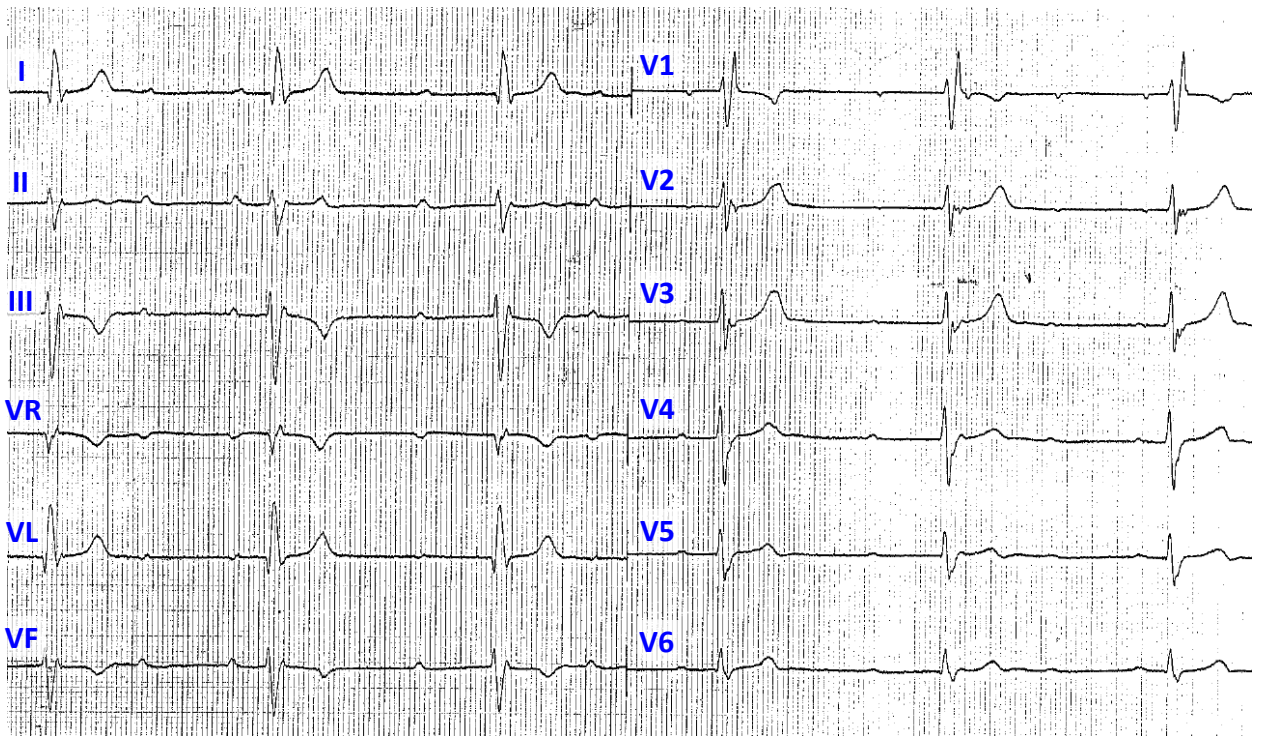
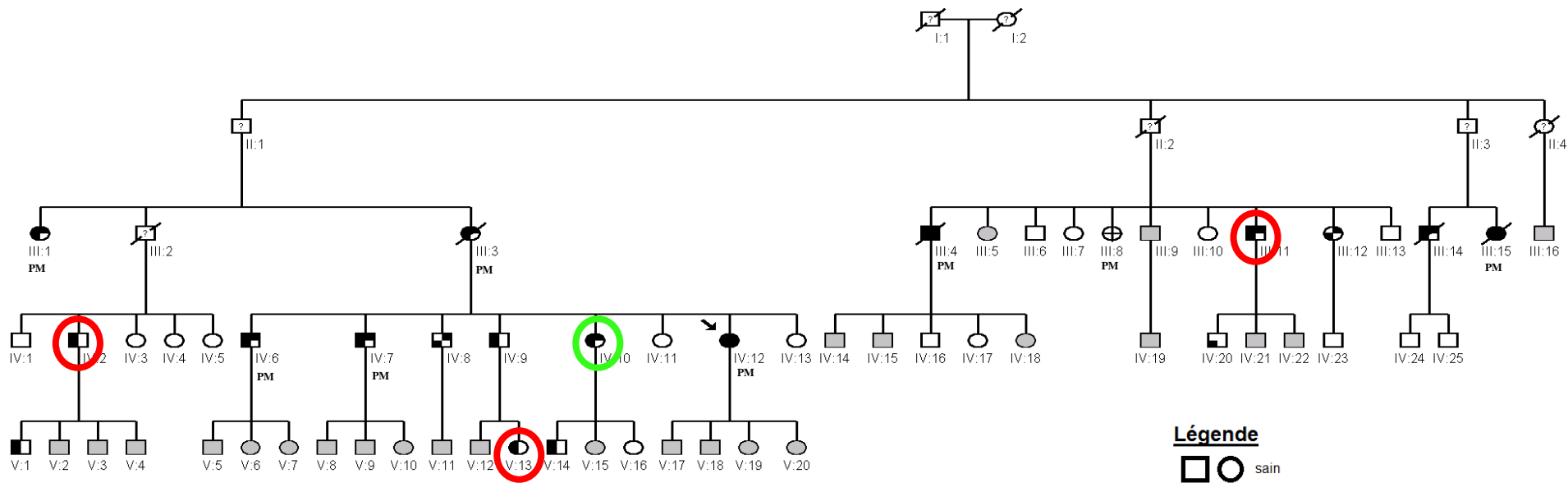


Figure 38 – Electrocardiogramme du propositus IV-12 montrant un BAV3 avec un échappement à morphologie QRS de BBD+HBAG

L'échappement ventriculaire présente une fréquence de 33 bpm et une morphologie QRS de BBD + HBAG.



- Légende**
- ○ sain
 - ● BAV complet ou PM sans ECG préalable
 - ⊞ ⊕ Probablement atteint
 - ◻ ◐ Probablement sain
 - ? ○ ? Indéterminé
 - ◻ ⊙ Hemibloc Antérieur Gauche (HBAG)
 - ◻ ⊖ Bloc Pariétal (BP)
 - ◻ ⊕ HBAG + PB
 - ◻ ⊖ Bloc de Branche Droit (BBD)
 - ◻ ⊙ BBD+HBAG
 - Séquençage d'exome
 - Séquençage d'exome + CGH

Figure 39 – Arbre de la famille D
Les patients implantés d'un pacemaker sont annotés d'un 'PM'.

Individu	Date de naissance	PR	QRS	QTc	Conduction/ Morphologie QRS	Phénotype
III-1	15/12/1912	260	140	430	BAV1+HBAG+ BBD	Atteint (PM)
III-3	13/01/1907	240	150	420	BAV1+HBAG+ BBD	Atteint (PM)
III-4	03/09/1911	nd	nd	nd	(PM)	Atteint (PM)
III-11 ⁽²⁾	17/06/1926	144	120	439	BBD+HBAG	Atteint
III-12	09/10/1913	212	114	420	BP+HBAG+BAV1	Atteint
III-14	30/07/1918	260	140	463	BAV1+HBAG+BBD	Atteint
III-15	04/02/1913	nd	nd	nd	(PM)	Atteint (PM)
IV-2 ⁽²⁾	17/10/1932	196	136	422	BBD	Atteint
IV-6	02/10/1935	320	200	480	BAV1+HBAG+BBD	Atteint (PM)
IV-7	07/09/1932	124	126	442	BBD+HBAG	Atteint (PM)
IV-8	11/05/1942	186	132	414	BP+HBAG	Atteint
IV-9	07/02/1944	152	140	430	BBD	Atteint
IV-10 ^(2,3)	02/07/1934	140	136	445	BBD+HBAG	Atteint
IV-12 ⁽¹⁾	25/01/1937	242	140	450	BAV1+HBAG+BBD	Atteint (PM)
IV-20	22/01/1958	196	120	414	BP	Atteint
V-1	05/08/1958	150	122	452	BBD	Atteint
V-13 ⁽²⁾	26/08/1966	122	140	428	BBD	Atteint
V-14	01/01/1953	168	120	430	BBD	Atteint

Tableau 12 – Caractéristiques cliniques des patients atteints de la famille D

⁽¹⁾ *propositus*; ⁽²⁾ *patients dont l'exome a été séquencé*; ⁽³⁾ *CGH réalisée sur l'ADN de ce patient.*

Les durées de l'intervalle PR (195 ± 57 ms vs 149 ± 20 ms ; $p < 0.01$) et du complexe QRS (136 ± 20 ms vs 87 ± 13 ms ; $p < 10^{-8}$) sont, elles aussi, plus importantes pour le groupe des sujets atteints comparé au groupe des sujets non-atteints.

I.3. Résultats des analyses familiales

Les exomes de quatre à cinq patients par famille ont été séquencés grâce aux nouvelles technologies de séquençage à haut-débit (HiSeq1000 d'Illumina) afin de rechercher d'éventuels variants nucléotidiques simples (SNV pour '*Single Nucleotide Variant*') voire des indels (insertions/délétions de petite taille).

L'hypothèse sur laquelle s'est basée notre étude est que les formes familiales de troubles de la conduction pouvant intervenir chez des sujets jeunes sont des formes relativement rares de la pathologie. Nous avons donc cherché à identifier des variants prédits délétères par VEP et/ou SnpEff, novels⁴ ou rares, d'une fréquence inférieure à 1 % dans la population générale, et partagés par les quatre ou cinq patients que l'on a séquencés au sein d'une même famille. Les analyses ont été réalisées suivant la procédure décrite en annexe, au paragraphe 'Workflow Knime pour les analyses familiales' à la page 173.

⁴ Un variant novel est un variant non répertorié, inconnu des bases de données, et pour lequel aucune donnée de fréquence n'est disponible. Un tel variant est probablement extrêmement rare.

➤ *Analyse de la famille A*

L'utilisation du workflow dédié aux analyses familiales pour cette famille a permis de mettre en évidence 26 variants détectés par GATK et Samtools pour lesquels les 4 patients sont hétérozygotes. Huit d'entre eux sont novels (Tableau 13).

		Famille A			
		CD00312	CD00677	CD01111	CD01327
Effets délétères (missense, stop_gain...)*	GATK	17141	18381	17541	17571
	Samtools	14375	14828	15045	14960
1000G-EVS*	GATK	5541	6401	5062	5150
	Samtools	2962	3079	2817	2731
Base locale 1*	GATK	3447	4168	2704	2829
	Samtools	1337	1396	1031	976
Base locale 2b*	GATK	2366	3012	1645	1682
	Samtools	905	934	698	646
ExAC - 63k exomes*	GATK	1956	2438	1284	1316
	Samtools	789	810	628	587
Nombre total de variants identifiés chez au moins un patient par GATK ou Samtools (GATK U Samtools)		4974			
Nombre de variants identifiés à l'état hétérozygotes par GATK et Samtools, chez les 4 patients séquencés de la famille (GATK ∩ Samtools)		26			
Novels**		8			

* La description des filtres utilisés, des bases sélectionnées et des seuils choisis est disponible en annexe page 173.

** Un variant est considéré novel s'il n'est pas référencé dans les bases de données utilisées lors de la génération des fichiers VCF (1000 Genomes, Exome Variant Server, NCBI dbSNP135).

Tableau 13 – Tableau récapitulatif de la sélection des variants dans la famille A à l'aide de différents filtres mis en application à l'aide de Knime4Bio

Comme indiqué en annexe, à la fin de chaque workflow, les variants restant sont individuellement analysés et ceux n'intervenant pas dans des transcrits codant de la base de NCBI ont été éliminés de l'analyse. Quatre variants ont ainsi été éliminés dans cette étude.

Les 22 variants restants ont été validés et testés en deux temps : ils ont tout d'abord été testés chez les 4 patients dont l'exome a été séquencé puis, en cas de validation, chez 18 autres patients atteints ou probablement atteint ainsi que chez 4 patients sains (IV-14 ; V-3; V-7 ; V-27) de plus de 70 ans (Tableau 14).

N°	Gene	Nucléotide	Acide Aminé	Conséquence	Validations capillaires	
					Atteints & Probablement atteints	Sains
1	LMNA	c.1039 G>A	p.E347K	faux-sens	20/22 (90,9%)	0/4 (100%)
2	PAQR6	c.1013 C>T	p.S338N	faux-sens	17/22 (77,3%)	0/4 (100%)
3	MYO1A	c.1916 C>T	p.R639Q	faux-sens	16/22 (72,7%)	1/4 (75%)
4	BAZ2A	c.871 T>C	p.T291A	faux-sens	15/21 (71,4%)	1/4 (75%)
5	GLMN	c.436 C>T	p.A146T	faux-sens	13/22 (59,1%)	0/4 (100%)
6	KIF17	c.979 G>A	p.R327C	faux-sens	12/21 (57,1%)	0/4 (100%)
7	CHRND	c.117 C>G	p.N39K	faux-sens	12/22 (54,5%)	1/4 (75%)
8	UGT1A4	c.202 C>T	p.H68Y	faux-sens	12/22 (54,5%)	1/4 (75%)
9	GPR115	c.367 C>T	p.R123X	gain d'un codon-stop	12/22 (54,5%)	2/4 (50%)
10	ZNF451	c.917 C>G	p.S306C	faux-sens	12/22 (54,5%)	2/4 (50%)
11	BAI3	c.436_438delGAA	p.146delE	délétion	12/22 (54,5%)	2/4 (50%)
12	ZNF292	c.6134 T>C	p.V2045A	faux-sens	11/21 (52,4%)	2/4 (50%)
13	DNAH8	c.9025 C>A	p.L3009M	faux-sens	10/22 (45,5%)	1/4 (75%)
14	CCT6P1 ^{1,2}	T>C		site d'épissage	?	?
15	CCT6P1 ^{1,2}	G>A		site d'épissage accepteur	?	?
16	ESPN ¹	c.1153 T>C	p.S385P	faux-sens	0/2 (0%)	-
17	DIP2C ¹	c.1330 C>G	p.A444P	faux-sens	0/2 (0%)	-
18	KIAA1462 ¹	c.3445 T>C	p.R1149G	faux-sens	0/3 (0%)	-
19	ELK3 ¹	c.790 G>C	p.A264P	faux-sens	0/4 (0%)	-
20	COG1 ¹	c.547 G>C	p.A183P	faux-sens	0/4 (0%)	-
21	PRRC2B ¹	c.5134 G>C	p.D1712P	faux-sens	0/4 (0%)	-
22		c.5135 A>C				

¹ : Variants retrouvés chez 13 ou 14 des 18 exomes BAVd séquencés. Ces variants ont une probabilité importante d'être de faux-positifs.

² : Variants localisés dans des zones répétées du génome pour lesquelles la recherche d'amorces spécifiques est impossible. Ces zones répétées identifiées du génome sont répertoriées dans les bases de données 'Segmental Duplication' (Bailey et al. 2001), 'Human Chained Self Alignments' (Chiaromonte, Yap, et Miller 2002) et 'RepeatMasker' (Smit 1996) disponibles depuis l'interface du site UCSC (<http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?redirect=auto&source=genome.ucsc.edu>). Ces variants ont une probabilité d'autant plus importante d'être de faux-positifs.

Tableau 14 – Tableau récapitulatif de l'ensemble des 22 variants d'intérêt identifiés dans la famille A

Les pourcentages indiqués entre parenthèses sont les valeurs allant dans le sens d'une ségrégation du variant. Ainsi, pour les individus sains, moins il y a de patients mutés, plus ce pourcentage sera important.

Le variant n°1, LMNA-p.E347K, est particulièrement intéressant. Vingt des 22 (90,9 %) patients atteints ou probablement atteints testés sont porteurs du variant et aucun patient sain ne l'est. Ce gène qui code pour les lamines A/C, des constituants de la membrane nucléaire, a en effet déjà été décrit dans des formes de TdC associées à une cardiomyopathie dilatée (Fatkin et al. 1999).

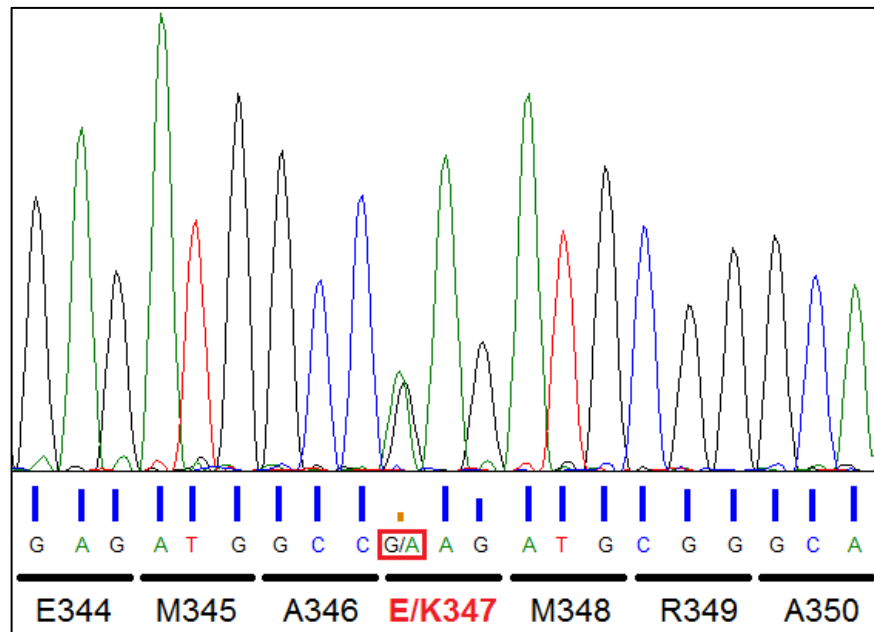
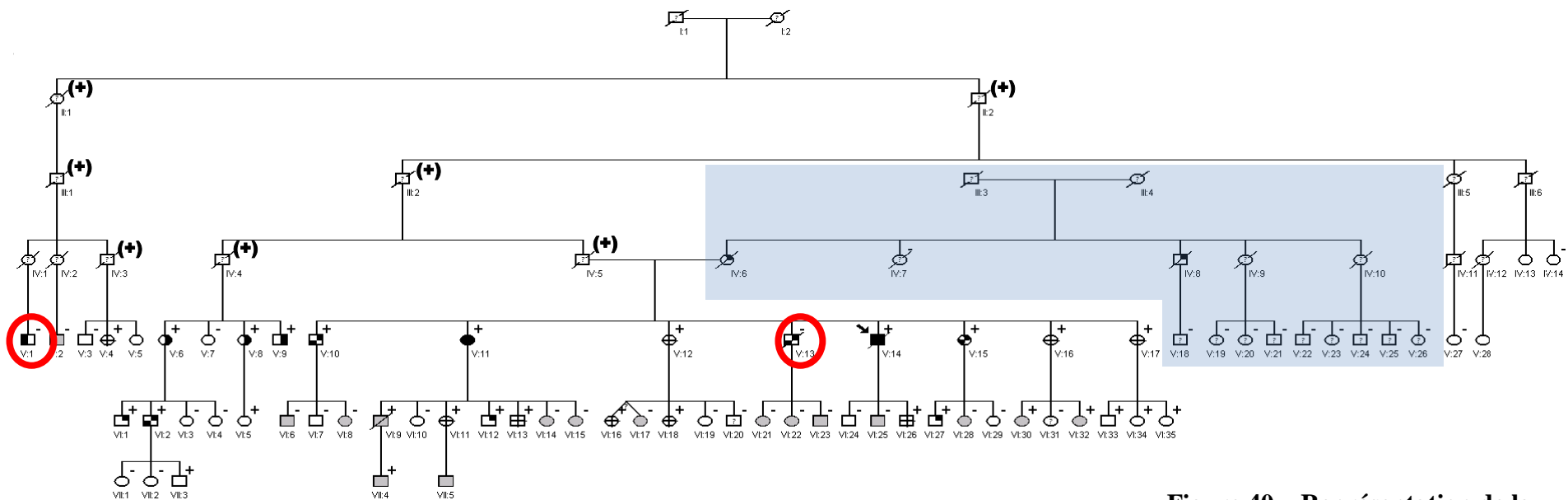
L'ensemble des patients dont l'ADN était disponible ont été testés pour ce variant (Tableau 15). Au total, 67 patients ont pu être testés (Figure 40) pour ce variant parmi lesquels 11 atteints sur 13 testés (84,6 %) sont porteurs du variant. De plus, la totalité des patients probablement atteints sont porteurs du variant tout comme 9 patients sains ou probablement sains sur 33 (27,3 %). Au total, 29 des 67 membres de la famille testés sont porteurs du variant (43,3 %). Dans cette famille, ce variant p.E347K ségrège de manière autosomique dominante avec la pathologie malgré deux phénotopies (patients V-1 et V-13) et une pénétrance incomplète (patients VI-5, VI-33, VI-34, VI-35 et VII-3).

	Mutés	Non mutés	Total
Atteints	11	2	13
Probablement atteints	9	0	9
Sains	5	13	18
Probablement sains	4	11	15
Statut inconnu	0	12	12
	29	38	67

Tableau 15 – Tableau récapitulatif du test de validation du variant E347K de *LMNA* dans la famille A

Lors de la génération des fichiers VCF en 2013, la base dbSNP de NCBI utilisée était la version dbSNP135 et il n'était alors retrouvé dans aucune base de données, pouvant être considéré comme novel. Depuis début 2015, il s'agit de la version dbSNP141 qui est utilisée, version dans laquelle ce variant est répertorié (rs267607548) sans aucune donnée de fréquence puisqu'il n'a été identifié que dans deux patients de deux articles différents (Vytopil et al. 2003; Benedetti et al. 2007). Il n'est retrouvé dans aucune autre base de donnée que ce soit celle du projet 1000 Genomes, celle du projet Exome Variant Server (EVS) ou même celle du projet ExAC du Broad Institute contenant plus de 63 000 exomes.

Du fait de l'absence de signe de laminopathie associée aux TdC dans cette famille, le gène *LMNA* n'avait pas été criblé préalablement à cette étude. Cependant, un dosage de CPK a ensuite été réalisé chez 36 membres de la famille. Aucune anomalie n'a été détectée. De même, six patients mutés (3 atteints, 2 probablement atteints et un sain) ont subi un examen neuromusculaire qui se sont tous révélés être normaux.



Légende

- ○ sain
- ● BAV complet ou PM sans ECG préalable
- ⊕ ⊗ Probablement atteint
- ◐ ◑ Probablement sain
- ⊛ ⊜ Indéterminé
- ◑ ◒ Hemibloc Antérieur Gauche (HBAG)
- ◑ ◒ Bloc Pariétal (BP)
- ◑ ◒ HBAG + PB
- ◑ ◒ Bloc de Branche Gauche (BBG)
- ◑ ◒ Bloc de Branche Droit (BBD)
- (red) Phénocopies
- +/- Muté / non muté
- (+) Transmetteur obligatoire

Figure 40 – Représentation de la ségrégation du variant LMNA-E347K dans une partie de la famille A

A – Représentation de la relation génotype-phénotype du variant LMNA-E347K dans la famille A. Le génotype pour ce variant est indiqué à droite au-dessus de l'icône de chaque individu (+ : porteur du variant ; - : non porteur)

B – Electrophorégramme obtenu après séquençage capillaire mettant en évidence le variant E347K chez les patients mutés.

Parmi les 21 autres variants, 7 (33,3 %) sont retrouvés chez 13 ou 14 des 18 patients BAVd séquencés et se sont révélés être de faux-positifs (voir les variants 16 à 22 sur Tableau 14). Les variants 14 et 15, eux aussi retrouvés chez des membres des trois autres familles, interviennent dans des zones répétées identifiées du génome pour lesquelles la recherche d'amorces spécifiques est impossible. Ces zones répétées identifiées du génome sont répertoriées dans les bases de données 'Segmental Duplication' (Bailey et al. 2001), 'Human Chained Self Alignments' (Chiaromonte, Yap, et Miller 2002) et 'RepeatMasker' (Smit 1996) disponibles depuis l'interface du site UCSC (<http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?redirect=auto&source=genome.ucsc.edu>). Ces variants ont une probabilité plus importante d'être de faux-positifs et ont également été retirés de l'analyse.

Les tests de coségrégation des variants 2 à 13 ont montré que pour chacun de ces variants, au moins 22,7 % des patients atteints ou probablement atteints répartis dans plusieurs branches de l'arbre familial ne sont pas porteurs du variant étudié. De plus, dans le cas des variants 3, 4 et 7 à 13), au moins un patient sain le possède (Tableau 14). Tous ces variants ont donc été éliminés de l'analyse.

➤ *Analyse de la famille B*

L'utilisation du workflow dédié aux analyses familiales pour cette famille a permis de mettre en évidence 3 variants détectés par GATK et Samtools pour lesquels les 5 patients sont hétérozygotes (Tableau 16).

		Famille B				
		J1837	CD00402	CD00422	CD00581	CD00593
Effets délétères (missense, stop_gain...)*	GATK	17612	16044	18103	15732	16071
	SamTools	14668	14801	14702	14509	14657
1000G-EVS*	GATK	5849	3551	6288	3349	3584
	SamTools	3068	2503	3129	2334	2409
Base locale 1*	GATK	3681	1360	4105	1219	1360
	SamTools	1416	747	1468	662	669
Base locale 2b*	GATK	2591	850	2972	812	823
	SamTools	960	637	996	586	571
ExAC - 63k exomes*	GATK	2093	691	2421	663	654
	SamTools	812	593	847	551	529
Nombre total de variants identifiés chez au moins un patient par GATK ou Samtools (GATK U Samtools)		5575				
Nombre de variants identifiés à l'état hétérozygotes par GATK et Samtools, chez les 5 patients séquencés de la famille (GATK ∩ Samtools)		3				
Novels**		0				

* La description des filtres utilisés, des bases sélectionnées et des seuils choisis est disponible en annexe page 173.

** Un variant est considéré novel s'il n'est pas référencé dans les bases de données utilisées lors de la génération des fichiers VCF (1000 Genomes, Exome Variant Server, NCBI dbSNP135).

Tableau 16 – Tableau récapitulatif de la sélection des variants dans la famille B à l'aide de différents filtres mis en application à l'aide de Knime4Bio

Après analyse individuelle, aucun de ces variants n'intervient dans un transcrit codant de la base de NCBI. L'analyse de liaison réalisée sur cette famille avait cependant permis de mettre en évidence un locus en 16q23. Les critères de l'analyse ont donc été relâchés pour cette famille et nous avons recherché des variants présents à l'état hétérozygote chez seulement 4 des 5 patients de la famille afin de voir si un variant dans ce locus pouvait être détecté.

Un seul variant a pu être identifié sur le chromosome 16, mais localisé à 22,6 Mb du locus 16q23. Il intervient dans le gène *MMP2* qui code une métalloprotéinase matricielle jouant un

rôle dans la régulation du collagène (Tableau 17). Il s'agit de la substitution au niveau protéique d'une glycine par une arginine en position 551. Il est prédit comme délétère par les deux algorithmes utilisés permettant de prédire l'impact de variants faux-sens (missense) au niveau de la structure et de la fonction protéique, SIFT et PolyPhen-2.

Gene	Exon	Chr	Pos	ID	Nucléotide	Acide Aminé	Conséquence
<i>MMP2</i>	11	16	55532242		c.1651 G>A	p.G551R	missense_variant

Tableau 17 – Variant identifié sur le chromosome 16 à l'état hétérozygote chez 4 ou 5 patients de la famille B par GATK et/ou Samtools

Une étude relativement récente (Bozkaya et al. 2008) a mis en évidence une augmentation des taux sériques de marqueurs de la synthèse de collagène ainsi qu'une diminution du taux sérique de marqueurs de la dégradation du collagène tels que MMP2 chez une vingtaine de patients atteints de TdC comparé à des patients témoins correspondants. Il en résulte une accumulation de collagène caractéristique du phénomène de fibrose qui se traduit par l'accumulation de matrice extracellulaire et un ralentissement de la conduction, comme cela a été décrit par Lenègre au début des années 60 (Lenègre 1964).

Du fait de la localisation du variant sur le chromosome 16 et surtout de la fonction du gène, une étude poussée de la ségrégation de ce variant a été entreprise. Cent sept patients ont pu être testés (Tableau 18). Une partie de la ségrégation est visible sur l'arbre de la Figure 41.

	Mutés	Non mutés	Total
Atteints	8	3	11
Probablement atteints	1	4	5
Sains	5	48	53
Probablement sains	7	14	21
Statut inconnu	0	17	17
	21	86	107

Tableau 18 – Tableau récapitulatif du test de validation du variant G551R de *MMP2* dans la famille B

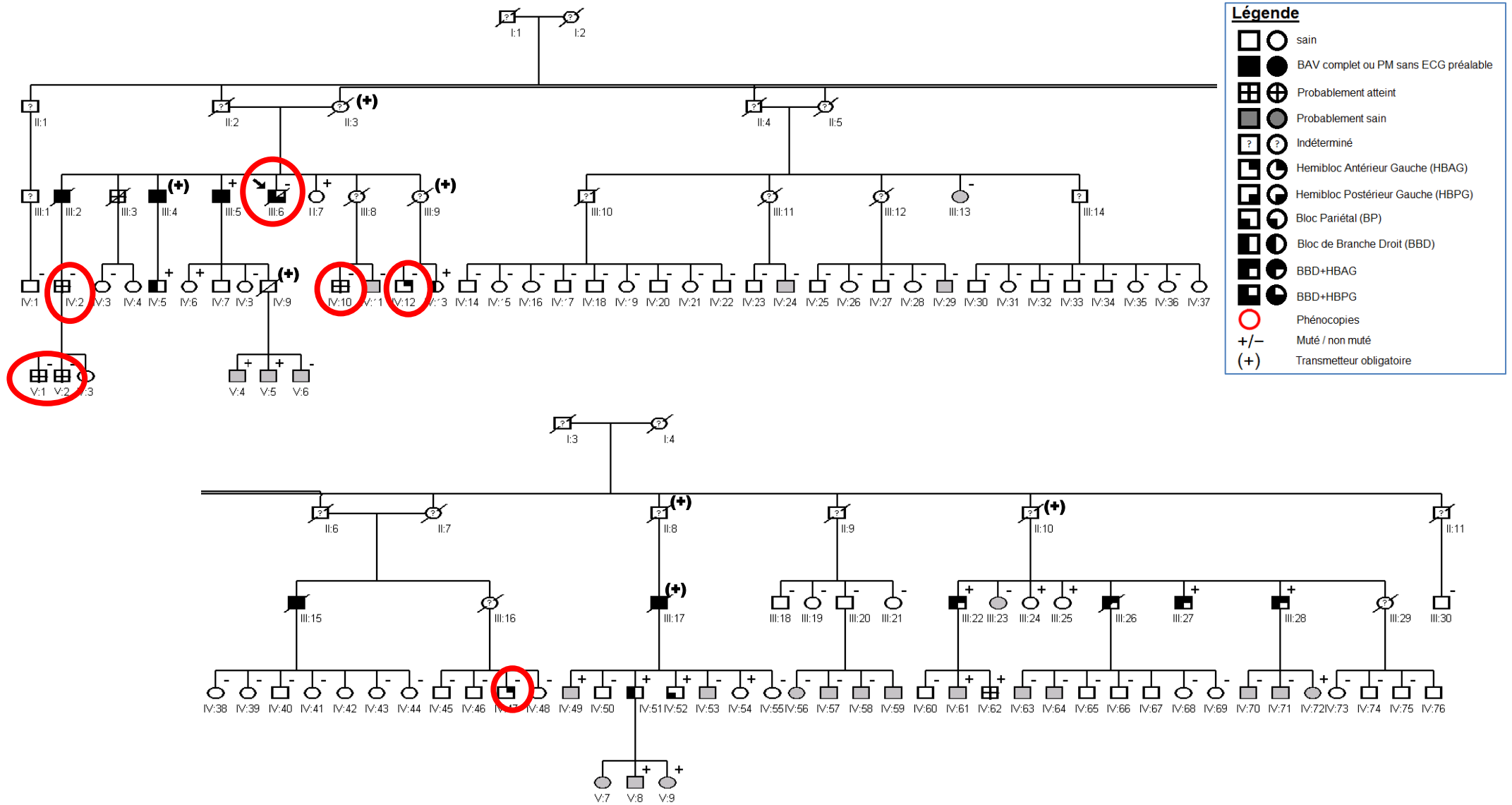


Figure 41 – Ségrégation du variant G551R du gène *MMP2* dans la famille 2

On observe une suggestion d'enrichissement de ce variant chez les patients atteints de la famille par rapport aux individus sains puisque 8 des 11 patients atteints (72,7 %) testés le possèdent contre seulement 5 des 53 individus sains (9,4 %).

Ces observations suggèrent que ce variant est potentiellement intéressant même s'il ne peut toutefois pas expliquer à lui seul les BAV de cette famille.

➤ *Analyse des familles C et D*

L'utilisation du workflow dédié aux analyses familiales a également permis de mettre en évidence 3 et 13 variants pour les familles C et D respectivement pour lesquels l'ensemble des patients séquencés sont hétérozygotes (Tableau 19). Néanmoins, après une analyse précise, aucun variant d'intérêt n'a pu être identifié.

Famille C		CD01464	CD01803	CD01851	CD02022	CD02025
Effets délétères (missense, stop_gain...)*	GATK	17968	17165	17883	16330	18245
	SamTools	14837	14467	14773	15011	14980
1000G-EVS*	GATK	6017	5643	5948	3490	6239
	SamTools	3113	3122	3085	2414	3162
Base locale 1*	GATK	3816	3485	3714	1308	3994
	SamTools	1438	1446	1378	696	1441
Base locale 2b*	GATK	2682	2412	2589	831	2880
	SamTools	947	959	893	590	956
ExAC - 63k exomes*	GATK	2139	1985	2118	675	2357
	SamTools	796	811	766	551	816
Nombre total de variants identifiés chez au moins un patient par GATK ou Samtools (GATK U Samtools)		8634				
Nombre de variants identifiés à l'état hétérozygotes par GATK et Samtools, chez les 5 patients séquencés de la famille (GATK ∩ Samtools)		3				
Novels**		0				

Famille D		CD00266	CD00272	CD00305	CD01127
Effets délétères (missense, stop_gain...)*	GATK	16716	17107	17405	17336
	SamTools	14272	14859	14663	14605
1000G-EVS*	GATK	5331	4796	5656	5675
	SamTools	3014	2747	3110	3144
Base locale 1*	GATK	3211	2533	3491	3474
	SamTools	1359	994	1427	1448
Base locale 2b*	GATK	2184	1477	2403	2344
	SamTools	893	654	921	950
ExAC - 63k exomes**	GATK	1797	1176	1964	1873
	SamTools	759	596	766	793
Nombre total de variants identifiés chez au moins un patient par GATK ou Samtools (GATK U Samtools)		4894			
Nombre de variants identifiés à l'état hétérozygotes par GATK et Samtools, chez les 4 patients séquencés de la famille (GATK ∩ Samtools)		13			
Novels**		1			

* La description des filtres utilisés, des bases sélectionnées et des seuils choisis est disponible en annexe page 173.

** Un variant est considéré novel s'il n'est pas référencé dans les bases de données utilisées lors de la génération des fichiers VCF (1000 Genomes, Exome Variant Server, NCBI dbSNP135).

Tableau 19 – Tableau récapitulatif de la sélection des variants dans les familles C et D à l'aide de différents filtres mis en application à l'aide de Knime4Bio

I.4. Discussion

➤ Identification du variant *LMNA-p.E347K* dans la famille A

Dans la famille A, le variant *p.E347K* ségrège de manière autosomique dominante avec la pathologie malgré deux phénotopies (patients V-1 et V-13) et une pénétrance incomplète (patients VI-5, VI-33, VI-34, VI-35 et VII-3).

La phénotopie V-1 est très intéressante. Il est effectivement atteint de troubles de conduction mais ceux-ci sont tout à fait différents de ceux présentés par le reste de la famille. En effet, ce patient présente une atteinte classique de BBD complet correspondant à la description classique des PFHB (*Progressive Familial Heart Block*) de type 1. Ceux-ci correspondent à une atteinte progressive des branches du faisceau de His, débutant classiquement par la branche droite, puis la branche antérieure gauche et évoluant progressivement vers un BAV3. Cette pathologie n'est pas rare au sein de la population de plus de 70 ans dont fait partie ce patient né en 1937 (Combrink, Davis, et Snyman 1962; Schaal et al. 1973; A. J. Brink et Torrington 1977; van der Merwe et al. 1991; Stéphan, de Meeus, et Bouvagnet 1997; Makita et al. 2012; Gourraud et al. 2012).

On peut donc supposer qu'il s'agisse d'un patient développant une pathologie commune pour son âge dans une famille qui présente un facteur génétique impliquant une pathologie voisine mais différente. En effet, au sein de la branche délimitée par les patients V-6 et V-17 sur l'arbre de la Figure 40, on voit clairement un phénotype familial clair et différent, caractérisé par l'apparition d'un HBAG, puis d'un BAV1 qui s'aggravent avec le temps. Avec l'âge, l'HBAG s'étend à la branche postérieure pour donner un BBG complet et l'on observe l'apparition d'un BP. Au final, le bloc se complète et finit en BAV3. Peut-être que cela peut constituer une nouvelle forme de BAV que l'on pourrait dénommer PFHB de type 3 et caractérisée par une atteinte spécifique de la branche gauche, pourtant la moins fragile, et évoluant par la suite vers un BAV complet.

La majorité des patients indéterminés appartiennent à la branche familiale rapportée en bleu sur l'arbre de la Figure 40, dans laquelle plusieurs cas de varices ont été diagnostiqués. Dans cette branche rapportée, le variant *LMNA-E347K* ne semble pas être présent ce qui est cohérent avec le fait qu'il soit rare. La présence de deux patients atteints dans cette branche (patients IV-6 et IV-8), tous deux atteints d'un hémibloc antérieur gauche, laisse supposer l'existence éventuelle d'un autre facteur génétique potentiel prédisposant aux troubles de la conduction cardiaque. Ce

déterminant génétique pourrait expliquer la phénotypie V-13 qui le partagerait avec sa mère (IV-6), son oncle (IV-8) et peut-être d'autres patients de la branche en bleu.

On observe également une pénétrance incomplète puisque onze patients porteurs du variant ne semblent pas être atteints. Tous ces patients non-pénétrants appartiennent aux deux dernières générations VI et VII. Il s'agit donc des patients les plus jeunes et étant donné l'aspect dégénératif de la pathologie, ces statuts sains peuvent évoluer avec l'âge. Ces patients jeunes, pour l'instant sains et porteurs du variant devront faire l'objet d'un suivi médical particulier, tout comme les patients probablement sains et mutés. De même, dans le cadre du syndrome de Brugada, une étude a montré que la pénétrance était complète chez des adultes présentant le variant SCN5A mais qu'elle n'était que de 17 % chez les enfants porteurs d'un variant similaire (Schulze-Bahr et al. 2003).

La grande informativité de la famille notamment due à sa taille et l'implication déjà connue du gène *LMNA* dans des formes non isolées de TdC semblent bien montrer ici la causalité de ce gène. Il s'agit de la description de la première famille de cette taille atteinte de troubles de la conduction isolés pour laquelle un variant dans ce gène a été identifié. Ce variant p.E347K a cependant déjà été décrit dans deux articles :

- Le premier (Vytopil et al. 2003) décrit le cas d'un patient implanté d'un PM à l'âge de 44 ans. Il présentait un phénotype proche de celui de notre famille sans aucun signe de cardiomyopathie dilatée ni d'atteinte des muscles squelettiques. Ses parents étaient cependant cousins et il avait un oncle paternel et une tante maternelle décédés d'un AVC *a priori* cardio-embolique dû à une arythmie. Ses deux sœurs, dont la plus âgée présentait des contractures aux coudes et avait été implantée d'un PM, sont décédées brutalement à l'âge de 25 et 32 ans. Un de ses deux frères présentait un taux relativement élevé de CPK alors que l'autre présentait des troubles de la conduction atrioventriculaire. Le propositus, la tante maternelle et le frère, tous les trois atteints de TdC, étaient porteurs de la mutation 1039G>A conduisant à la substitution d'une alanine par une lysine en position 347 sur la protéine (E347K).
- Le deuxième (Benedetti et al. 2007) décrit le cas d'un patient également implanté d'un PM chez qui deux variants ont été identifiés dans le gène *LMNA* : R331Q et E347K. Ce patient hétérozygote composite ne semblait souffrir que d'une atteinte cardiaque (cardiomyopathie dilatée, fibrillation atriale) sans BAV mais il n'est pas précisé s'il présentait un bloc de branche gauche ou un hémibloc gauche. Ce patient présentait un électromyogramme normal, une biopsie musculaire normale mais un taux de CPK

légèrement supérieur à la normale. Il n'est pas précisé si ce patient, aujourd'hui décédé, présentait un HBAG ou un BBG caractéristique des PFHB de type 3. On peut supposer que la présence de ces deux variants confèrent au patient un phénotype plus sévère que la présence d'un seul des deux, comme cela a été montré chez deux patients, frère et sœur, atteints de troubles conductifs très sévères et présentant les deux variants W156X, hérité de leur mère, et R225W, hérité de leur père, dans le gène *SCN5A* (C. R. Bezzina et al. 2003).

De plus, nos résultats renforcent ceux de plusieurs études, dont celle de Benedetti *et al.* (Benedetti et al. 2007; Bertrand et al. 2011a), qui suggéraient l'existence de plusieurs mécanismes pathogéniques plus ou moins sévères liés aux variants dans le gène *LMNA*. Les plus sévères correspondent aux phénotypes à apparition précoce probablement liés à un effet dominant négatif ou un gain de fonction toxique du variant tandis que les moins sévères correspondent aux phénotypes à apparition tardive pouvant survenir par un mécanisme de perte de fonction secondaire à une haploinsuffisance. Cela a été décrit dans une étude réalisée sur des souris *Lmna*^{+/-} qui montrait, suite à l'haploinsuffisance induite, une atteinte progressive des cellules du tissu de conduction d'abord, puis une atteinte *a priori* indépendante des cardiomyocytes non conducteurs menant ainsi à un phénotype CMD-TdC avec une apparition plus précoce des TdC (Wolf et al. 2008). On observe ainsi, comme cela a été décrit en introduction de cette thèse, un continuum des pathologies selon leur sévérité. Le spectre des atteintes squelettiques s'étend des formes congénitales de dystrophie musculaire (L-CMD), les plus sévères, aux formes les moins sévères correspondant aux cardiopathies isolées (CDM-TdC) en passant par les formes juvéniles (EDMD) et les formes adultes (LGMD1B) touchant également les muscles squelettiques.

Dans notre cas familial, on observe bien une apparition tardive de l'atteinte cardiaque isolée. Il s'agit d'une forme de laminopathie parmi les moins sévères. On peut supposer que le variant p.E347K, s'il est effectivement causal, correspond à un mécanisme d'haploinsuffisance ou à une perte de fonction non létale et de sévérité moyenne. Plusieurs études, dont celle de Bollati *et al.* qui s'est intéressée à la structure des mutants R335W et E347K, suggèrent que la localisation du variant à la fin du domaine en double hélice et à la surface des dimères de lamines (Benedetti et al. 2007; Bollati et al. 2012) peut interférer dans la stabilisation et dans les interactions des lamines, entre elles d'abord affectant ainsi la dimérisation des lamines et impliquant un défaut de la lamina nucléaire, et avec d'autres polypeptides ensuite, les lamines A/C présentant de nombreuses interactions avec des facteurs de transcription, la chromatine et les histones.

Ceci est cohérent avec les deux des trois hypothèses de pathogénicité des variants dans le gène *LMNA* décrites en introduction pour tenter d'expliquer la grande diversité des phénotypes associés aux laminopathies (Broers et al. 2006; Bertrand et al. 2011a; Bertrand et al. 2011b) :

- la première, l'« hypothèse structurale », basée sur le rôle primordial des lamines A/C dans le maintien l'intégrité des cellules en liant le nucléosquelette au cytosquelette (Haque et al. 2006). Les mutations du gène *LMNA* entraîneraient des défauts d'assemblage des filaments de lamines et une faiblesse de la lamina nucléaire qui impliqueraient une incapacité de la cellule à résister aux dommages induits par le stress. Cela serait particulièrement délétère au niveau des tissus contractiles tels que le cœur et les muscles squelettiques à cause des contractions répétées des cellules de ces tissus expliquant ainsi l'apparition tardive du phénotype familial décrit dans cette thèse. Il surviendrait suite à une fatigue anormale du cœur due à une usure progressive de la lamina nucléaire ;
- et la deuxième, l'« hypothèse de régulation génique », basée sur les nombreuses interactions des lamines A/C avec des facteurs de transcription, la chromatine et les histones. Dans cette hypothèse, les mutations *LMNA* provoqueraient des défauts d'interaction avec ses partenaires et donc des défauts épigénétiques (altération de la conformation de la chromatine) et/ou de régulation de voies de signalisation par le biais d'une altération du potentiel électrostatique de surface des dimère de lamines (Benedetti et al. 2007; Bollati et al. 2012). L'acide glutamique (acide aminé acide E) présente en effet un point isoélectrique à 3,15 très différent de celui de la lysine (acide aminé basique K) à 9,60 et le variant p.E347K, situé en plein domaine d'interactions en double hélice, modifie donc les propriétés électriques de la protéine produite, pouvant ainsi altérer la qualité, l'intensité et la quantité des multiples interactions des lamines. Cette hypothèse est cependant plus difficile à concilier que la première avec l'apparition tardive du phénotype mais, comme le montre la complexité de la relation encore largement incomprise génotype/phénotype dans le cadre des laminopathies, ces deux hypothèses physiopathologiques (structurale et régulation génique) ne s'excluent pas et sont probablement en jeu de manière concomitante. Ainsi, l'usure progressive de la lamina nucléaire pourrait altérer tout aussi progressivement ses interactions avec ses partenaires tels que l'émerine. Ceci corrèle avec l'analyse des mutations de *LMNA* qui montre qu'il s'agit principalement de mutations faux-sens qui n'affectent pas le taux de lamines A/C au niveau de la lamina nucléaire mais qui altèrent ses interactions avec ses protéines partenaires (Vytöpil et al. 2003).

La troisième hypothèse de « toxicité cellulaire » suggérant une accumulation de lamines mutées et immatures ayant une fonction extrêmement toxique pour les cellules ne peut pas être exclue mais elle paraît tout de même plus cohérente pour expliquer des phénotypes plus sévères, plus précoces et plus généralisés tels que les syndromes de vieillissement prématuré ou les formes congénitales de dystrophie musculaire (L-CMD) caractérisées par une atrophie et une faiblesse musculaire avant l'âge d'un an avec une atteinte des muscles axiaux et cervico-axiaux, des muscles des membres, une rigidité de la colonne vertébrale avec une lordose thoracique et, dans les cas les plus sévères, une absence totale de développement moteur. L'évolution de la pathologie conduit ensuite au développement rapide d'une atteinte respiratoire (Bertrand et al. 2011a; Bertrand et al. 2011b).

Cependant, de nombreuses observations montrent que dans tous les types de laminopathies, les trois hypothèses physiopathologiques (structurale, régulation génique et toxicité cellulaire) ne s'excluent pas et sont probablement en jeu (Bertrand et al. 2011a) mais on peut légitimement supposer que leur degré d'implication varie en fonction de la localisation du variant étudié. Dans le cas de la famille décrite dans cette thèse, le variant impacte directement les sites d'interactions de la lamine, ce qui concorde mieux avec les deux premières hypothèses.

Ainsi, comme pour le gène *SCN5A*, on observe un certain continuum dans les laminopathies qui ne correspondent pas un groupe de pathologies distinctes et sans relation. Comme décrit en introduction, 11 % des mutations identifiées dans le gène *LMNA* impliqueraient des phénotypes chevauchant appartenant à différents sous-groupes de laminopathies et touchant des tissus différents (Bertrand et al. 2011a; Bertrand et al. 2011b). Une même mutation peut aussi impliquer des phénotypes différents. C'est notamment le cas de la mutation p.E358K qui a été identifiée chez des patients atteints de LGMD1B à l'âge adulte, chez des patients atteints de formes précoces d'EDMD et chez des patients atteints de formes congénitales de dystrophie musculaire (L-CMD) (Mercuri E et al. 2004). De plus, au sein même d'une famille, on peut observer des phénotypes différents, certains individus développant une atteinte cardiaque et musculaire de type EDMD ou LGMD1B, tandis que chez d'autres individus, seuls le phénotype cardiaque se manifeste à l'âge adulte (Bécane et al. 2000; Brodsky et al. 2000).

Malgré leur large diffusion et leur rôle dans l'architecture nucléaire, les mutations dans le gène *LMNA* sont responsables d'un certain nombre de troubles très spécifiques, assez hétérogènes puisque différents tissus peuvent être atteints (tissus musculaire, cardiaque, nerveux, adipeux) mais les atteintes cardiaques sont semblables dans les cardiomyopathies dilatées (CMD), dans les dystrophies musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) et dans les dystrophies musculaires des

ceintures (LGMD1B) (Vytopil et al. 2003). Les caractéristiques communes de ces trois troubles affectant les muscles cardiaque et squelettiques semblent montrer que ce sont trois expressions d'une même pathologie et que les frontières entre ces trois phénotypes sont floues. De plus, il a été montré que la majorité des patients présentant une mutation dans le gène *LMNA* responsable de formes diverses de dystrophies musculaires développaient des complications cardiaques caractérisées notamment par des TdC, des arythmies, des dilatations ventriculaires et/ou des dysfonctions menant à l'insuffisance cardiaque (Sylvius et Tesson 2006).

Même si l'on observe donc cette notion de continuum, au niveau cardiaque, l'atteinte des cellules du tissu de conduction semble être indépendante de l'atteinte des autres cardiomyocytes (Wolf et al. 2008). De plus, une même mutation pouvant conduire à différents types de dystrophies musculaires, on peut supposer que le fond génétique de chaque patient influence l'expression pathologique de la laminopathie, tant au niveau du phénotype que de sa sévérité (Vytopil et al. 2003). Cela expliquerait également la difficulté d'établir une relation génotype/phénotype dans le cadre des laminopathies malgré plus de 460 mutations décrites (Vytopil et al. 2003; Bertrand et al. 2011a; Bertrand et al. 2011b; Luo, Mastaglia, et Wilton 2014). Dans le cas de notre famille, le fond génétique étant commun, la seule atteinte observée concerne la conduction cardiaque, les dosages CPK et les tests neuromusculaires étant normaux.

A une échelle encore plus fine, au sein même d'une famille, cela expliquerait l'apparition de phénotypes très légèrement différents, deux individus apparentés, même très proches, à part des vrais jumeaux, n'ayant jamais exactement le même fond génétique. La description d'une famille dans laquelle le père est atteint d'une CMD pure, le fils d'une LGMD1B et la fille d'une EDMD (Brodsky et al. 2000) va dans ce sens. L'expression de phénotypes proches – c'est le tissu musculaire qui est touché dans les trois cas – mais différents d'une unique pathologie pourrait s'expliquer par les faibles différences génétiques existant entre ces patients très proches, les facteurs environnementaux pouvant légitimement être éliminés des causes potentielles dans le cadre de ce noyau familial. Dans le cas de la famille dans laquelle le variant p.E347K a été identifié, certains patients développent un HBAG se développant en BBG alors que d'autres présentent un HBAG avec un BP, le BBG et le BP traduisant tous les deux l'altération de la conduction ventriculaire.

L'étude de cette famille permet donc de mettre en avant le rôle majeur joué par le gène *LMNA* dans des formes isolées de TdC, ce qui n'était pas encore reconnu ni décrit. Une seule étude d'une équipe chinoise datant de 2013 (Lai et al. 2013) allait dans ce sens. Le séquençage des exomes de 5 patients proches (3 frères et sœurs atteints de BAV de différents degrés, leur mère

saine et le fils sain de l'un d'eux) leur a permis de mettre en évidence plusieurs variants candidats. Cependant, les trois patients atteints présentaient également une dysfonction sinusale ainsi que des épisodes de fibrillation atriale paroxystique. Ils ont conclu que le variant p.G232V intervenant dans *LMNA* était le candidat le plus probable. Il est intéressant de souligner également que les variants p.G232E (G. Bonne et al. 2000) et p.G232R (Rudenskaya et al. 2008) ont été décrits chez des patients atteints de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss.

➤ *Autres familles*

L'absence de résultat probant pour les trois autres familles étudiées nous amène à nous questionner sur nos hypothèses de travail. Depuis le début, nous n'avons envisagé qu'un modèle monogénique de transmission autosomique dominant. Pourtant, plusieurs modèles peuvent coexister et c'est ce qui semble être le cas pour le syndrome de Brugada. Suite à une étude d'association réalisée sur des patients atteints du syndrome de Brugada par notre laboratoire en collaboration avec l'équipe de Connie Bezzina à Amsterdam, il a été montré que la présence de trois variants fréquents augmentait le risque statistique de développer la pathologie avec un odds ratio allant jusqu'à 21,48 pour les patients présentant les 6 allèles à risques (C. R. Bezzina et al. 2013). Ainsi, pour le syndrome de Brugada, on observe le glissement de la conception d'un mode de transmission mendélien monogénique de la pathologie liée au gène *SCN5A*, vers la conception d'un modèle oligogénique, avec un gène principal (*SCN5A* expliquant environ 20 % des cas) et des variants modulateurs communs ou de fréquence faible, le tout pouvant être régulé par d'autres facteurs tels que l'âge, le genre ou l'environnement (Probst, Gourraud, et Le Marec 2012). Il existe aujourd'hui un continuum entre les formes monogéniques, oligogéniques et polygéniques des pathologies. En effet, au sein de la majorité des maladies monogéniques des défauts de pénétrance sont souvent constatés et ils peuvent être attribués à la présence de variants communs ou peu fréquents à effet mineur régulant l'expression pathologique de certaines mutations (Kääb et Schulze-Bahr 2005).

On peut concevoir un modèle similaire pour les troubles de la conduction isolés, voire un modèle polygénique puisque plusieurs gènes principaux ont déjà été décrits dans cette pathologie (*SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4*, *GJA5*, *LMNA*) et l'on peut donc supposer que, dans les trois familles restantes, ce n'est pas un mais plusieurs variants qu'il faut rechercher. C'est d'ailleurs également le cas dans la famille A de ce projet puisque, deux patients atteints n'étant pas porteurs du variant *LMNA*-p.E347K, nous avons émis l'hypothèse d'un variant secondaire

responsable des TdC dans la branche indiquée en bleu sur la Figure 40 à la page 93. En outre, de nombreuses études familiales rapportent l'existence de phénocopies et l'on peut alors se demander si ces grandes familles que l'on recrute plutôt facilement ne sont justement pas recrutées parce qu'il existe un phénomène d'agrégation des effets de plusieurs variants rares. Ce n'est encore qu'une hypothèse mais un moyen de la vérifier serait de séquencer systématiquement des gènes candidats (grâce à HaloPlex par exemple), l'exome voire, encore mieux, le génome de tous les patients atteints d'une famille, et de constituer le groupe de variants rares le plus petit pour que chaque patient atteint en possède au moins un, ou un seul en fonction de la sévérité du phénotype par exemple. Une étude récente d'ailleurs a mis en évidence l'existence de deux variants, l'un dans le gène *SCN5A* et l'autre dans le gène *SNTA1*, dans une petite famille dont plusieurs membres souffraient du syndrome du QT long. Les patients chez qui les deux variants ont été identifiés présentaient les phénotypes les plus sévères (R.-M. Hu et al. 2013).

Cependant, avec cette hypothèse, le risque est d'observer plus d'individus non-pénétrants. Ceux-ci seraient cependant explicables par l'existence de variants à effet modulateur. Comme pour les patients atteints qui présentent un variant modulateur de leur état sain, certains patients sains pourraient avoir un variant délétère modulé par un autre variant qui nuance leur phénotype. C'est ce que postulent Sallmeyer *et al.* (Stallmeyer et al. 2012) et Vytopil *et al.* (Vytopil et al. 2003) pour expliquer les différences phénotypiques entre porteurs d'un même variant *TRPM4* ou *LMNA*. On peut alors supposer qu'un tel variant, au-delà de nuancer le phénotype du patient pourrait même le protéger. Partant dans ces hypothèses, on voit clairement que l'on peut, en continuant dans cette voie, arriver à des modèles génétiques personnalisés tout comme l'on arrive aujourd'hui à la notion de médecine personnalisée. Ces modèles sont néanmoins difficiles à explorer et seraient longs et très coûteux à vérifier.

Ainsi le variant *MMP2*-p.G551R identifié dans la famille B pourrait être intéressant en assumant ce modèle polygénique. Ce gène intervient effectivement dans la régulation du collagène et on peut supposer qu'une altération de sa fonction pourrait aboutir à une accumulation excessive de collagène au niveau de la matrice extracellulaire (Bozkaya et al. 2008) et donc à un phénomène de fibrose, caractéristique des patients atteints de la maladie décrite par Lenègre (Lenègre et Moreau 1963). Il est d'autant plus intéressant que dans l'étude chinoise précédemment évoquée (Lai et al. 2013), un variant dans ce gène figurait dans les derniers candidats potentiels. Il a cependant été jugé non intéressant parce que le fils séquencé d'un des trois patients atteints est sain et porteur du variant. Cependant, en conclusion de l'article, il est stipulé que si le fils

devient atteint, alors le variant *MMP2* sera l'un des candidats les plus sérieux. De même, le variant p.82S intervenant dans le gène *SCNN1B* qui code pour la sous-unité β du canal sodique épithélial exprimé dans plusieurs organes dont le cœur a été identifié dans la famille D. Au vu de l'intérêt fonctionnel de ce gène, ce variant a été étudié, sans résultat.

On ne peut également pas exclure l'hypothèse de l'existence de variants non codants pour les trois autres familles. Un tel variant pourrait en effet se trouver au niveau du locus d'intérêt identifié par l'analyse de liaison de la famille B.

I.5. Conclusion

Ce projet semble mettre en avant un rôle majeur joué par le gène *LMNA* dans les TdC. Avec l'identification d'une famille de 160 membres sur sept générations, il peut s'agir du cinquième gène décrit dans les formes isolées de TdC. Même en l'absence de signe de laminopathie autre que les TdC, ce gène devrait systématiquement être criblé chez les patients atteints de cette pathologie.

De plus un nouveau type de TdC peut être décrit grâce à cette famille. Il s'agit du PFHB (*Progressive Familial Heart Block*) de type 3 caractérisée par une atteinte spécifique de la branche gauche, pourtant la moins fragile, et évoluant par la suite vers un BAV complet.

I.6. Perspectives

De nouvelles évaluations cliniques sont nécessaires pour ce type de grandes familles, non seulement pour mettre à jour les phénotypes étant donné l'aspect dégénératif de la pathologie, mais également afin de recruter de nouveaux membres dans de nouvelles branches familiales. Ceci pourrait notamment être intéressant dans la branche de la famille A indiquée en bleu sur la Figure 40 afin d'identifier d'éventuels nouveaux patients atteints dans les générations les plus jeunes.

Il serait aussi judicieux de refaire l'analyse de liaison de la famille B en fonction de l'évolution des phénotypes, ces derniers influençant évidemment l'analyse. Pour ce faire, il pourrait être profitable de développer un outil informatique permettant de réaliser une analyse de liaison à partir des données de séquençage d'exome.

Pour la famille A, une enquête génétique dans la branche rapportée indiquée en bleu (Figure 40) pourrait permettre de mettre en évidence l'existence d'un second facteur génétique expliquant la phénocopie V-13. Le séquençage de l'exome d'éventuels nouveaux patients atteints pourrait être appliqué ou, à défaut, l'utilisation du kit HaloPlex permettant une analyse gènes candidats à haut-débit afin d'identifier un nouveau facteur génétique partagé par les atteints de cette branche et par la phénocopie V-13.

Pour les familles B, C et D, une nouvelle analyse pourrait être réalisée en classant les variants par le nombre de patients chez qui ils sont identifiés. Cela permettrait de pouvoir déterminer le groupe le plus restreint de variants rares tel que tous les patients atteints en possède au moins un et, ainsi, de mettre en application l'hypothèse d'un modèle génétique polygénique. L'hypothèse du modèle oligogénique a, quant elle, déjà été explorée. Nous avons en effet entrepris une étude d'association génome entier (GWAS) afin d'identifier de possibles variants communs modulateurs. Elle sera présentée dans le projet 2.

Une nouvelle analyse avec relâchement de certains critères (nombre de patients hétérozygotes, fréquences alléliques admises...) pourrait permettre d'explorer encore le modèle monogénique en s'affranchissant de possibles erreurs de séquençage NGS. Par exemple, dans la famille B, le variant intervenant dans le gène *MMP2* n'est pas présent chez le propositus et a été identifié grâce au relâchement du critère portant sur le nombre de patients hétérozygotes pour ce variant.

Enfin, des études fonctionnelles portant sur le variant *LMNA*-p.E347K devrait permettre de valider ou d'invalider l'implication de ce variant dans cette pathologie. Cela permettrait également de mieux comprendre pourquoi l'atteinte des PFHB de type 3 débute par la branche la moins fragile. Une hypothèse est que les taux d'expression des lamines A/C pourraient être supérieurs dans la branche gauche.

II. PROJET 2 : Recherche de variants rares dans les gènes de susceptibilité aux TdC dégénératifs

II.1. Présentation du projet

L'avènement des technologies de nouvelle génération de séquençage (NGS) permet aujourd'hui d'envisager de nouvelles stratégies d'analyse parmi lesquels le criblage à grande échelle de zones spécifiques du génome.

Nous avons donc développé un kit à façon basé sur la technologie HaloPlex™ (Agilent) afin de réaliser le séquençage haut-débit systématique des régions codantes de 163 gènes à implication cardiaque connue ou supposée. Nous avons inclus 46 gènes connus dans les troubles du rythme et de la conduction cardiaque, 45 gènes connus dans les cardiomyopathies ainsi que 72 gènes candidats supposés ou identifiés comme tels suite à des approches basées sur le séquençage d'exomes d'autres patients (Tableau 20). La liste des 163 gènes inclus dans le système de capture HaloPlex ainsi que le motif de leur sélection se trouve en annexe D.II – Liste des gènes inclus dans le premier design du système de capture HaloPlex (BAVd) à la page 190.

Pathologies	Nombre de gènes testés
Cardiomyopathies	45
Arythmies (TdC, BrS, QTL...)	46
Gènes candidats	72
Total	163 (≈ 500kb)

Tableau 20 – Nombres de gènes inclus dans le design du kit HaloPlex 1

Au total, les sondes de notre kit, afin d'assurer la couverture des 500 kb de régions codantes ciblées (les exons) +/- 10 pb, permettent le séquençage de 1,365 Mpb de séquences génomiques. Ce kit a été validé sur 39 patients atteints du syndrome de Brugada pour lesquels 68 variants avaient déjà été validés par séquençage capillaire. Soixante-sept des 68 (98,5 %) variants ont pu

être retrouvés, le variant manquant étant dans une région couverte moins de 10 fois. Suite à ces premières expériences, afin de limiter au maximum le nombre de variants non détectés faute de couverture, un seuil de couverture moyenne a été fixé à 100X pour les analyses suivantes réalisées à l'aide de l'HiSeq d'Illumina.

Ce projet vise à cribler l'ensemble des 163 gènes de ce kit sur 95 patients (27 femmes et 68 hommes) non apparentés atteints de troubles de la conduction cardiaque idiopathiques. Ces patients ont pu être recrutés grâce à l'étude réalisée par les cliniciens de notre équipe et basée sur une approche épidémiologique qui a permis le recrutement des quatre grandes familles étudiées dans le projet 1 de cette thèse ainsi que de près de 300 cas sporadiques atteints de BAVd (Gourraud et al. 2012). Ces patients ont été considérés comme atteints puisqu'ils ont tous été implantés d'un pacemaker suite à leurs TdC (voir la méthode de recrutement des patients sur le papier de Gourraud (Gourraud et al. 2012)).

II.2. Description clinique globale des patients

Les 95 patients sélectionnés présentent des phénotypes atteints et ont tous été implantés d'un PM à cause des TdC dont ils souffrent. Le diagnostic de TdC idiopathique a été établi après l'exclusion de toute cardiopathie structurale par échocardiographie.

L'âge moyen lors du dernier examen clinique était de 69 ± 9 ans (29 ans pour le plus jeune et 80 ans pour le plus âgé). La fréquence cardiaque moyenne était de 52 ± 19 bpm, avec des intervalles moyens PR et QTc de 233 ± 69 ms et 435 ± 60 ms respectivement, et un complexe QRS de 132 ± 30 ms supérieur à la normal (un QRS plus large que 100 ms est considéré comme pathologique). La primo implantation d'un pacemaker a eu lieu à un âge moyen de 70 ± 9 ans (29 pour le plus jeune et 86 pour le plus âgé).

Les données cliniques de ces 95 patients sont disponibles sur le Tableau 35 en annexe D.III page 193. Les patients présentaient différents troubles de la conduction tels que des BBD isolés ou associés à un HBAG, des HBAG isolés, des BBG ou une déviation de l'axe QRS gauche (DAG). Le BBD était le principal phénotype électrocardiographique présenté par 57,9 % des patients (55/95) et 44,2 % des patients (42/95) avaient un BAV complet (BAV3).

II.3. Résultats des analyses des cas sporadiques

➤ Séquençage NGS des 95 patients

Les données de couverture du séquençage NGS utilisant la technologie HaloPlex sont disponibles dans le Tableau 36 en annexe D.IV à la page 196.

L'ensemble des 163 gènes du kit HaloPlex ont été séquencés chez les 95 patients atteints de BAV isolés avec une couverture moyenne globale de 539,3X, chaque patient présentant une couverture moyenne supérieure à 100X. En moyenne 96,1 % des reads ont pu être alignés sur le génome (ou mappés) et 80,5 % des reads ont pu l'être dans des régions ciblées appartenant aux 163 gènes d'intérêt.

➤ Recherche de variants rares causaux

Nous avons tout d'abord cherché à identifier des variants d'intérêt chez ces patients isolés. L'analyse réalisée s'est focalisée sur 19 gènes d'intérêt : les 5 gènes associés aux troubles de la conduction ont été étudiés (*SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4*, *GJA5* et *LMNA*) ainsi que 14 gènes candidats (*GJA1*, *GJC1*, *SCN10A*, *NKX2-5*, *TBX5*, *SNTA1*, *PRKAG2*, *RYR2*, *EMD*, *BMP2*, *BMPRIA*, *GATA4*, *MSX2* et *TNNI3K*).

Dans cette étude, de même que pour le projet 1 s'intéressant aux formes familiales de BAVd, nous avons cherché à identifier des variants prédits délétères par VEP et/ou SnpEff, d'une fréquence inférieure à 1 % dans la population européenne. Les analyses ont été réalisées suivant la procédure décrite en annexe, au paragraphe 'Workflow Knime pour les analyses HaloPlex' page 176.

Un total de 45 variants a pu être identifié dont 11 variants novels (Tableau 21) et 34 variants rares (Tableau 22). Ils ont pu être identifiés et validés par cette approche chez 43 patients différents (45,3 % des 95 patients).

Patient	Gène	Nucléotide	Acide aminé	Conséquence	GT	Sift/PPH-2	Fréquences alléliques (%)			Morphologie QRS (ECG)	Phénotype	PM (Age)
							1000 Genomes	EVS	ExAC			
11H0451	TRPM4-ex9	c.1127 T>C	I376T	FS	0/1	délétère(0.02) bénin(0.323)	0	0	0	BBD+HBAG	Normal	32
CD07505	LMNA-ex4	c.342 G>C	K114N	FS	0/1	délétère(0.01) bénin(0.193)	0	0	0	BBG	BAV3	67
CD07714	TNNI3K-ex3	c.491 G>A	R164H	FS	0/1	délétère(0.01) probablement dommageable(0.992)	0	0	0	BBG	BAV3	74
CD09041	RYR2-ex65	c.9425 C>A	T3142N	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.992)	0	0	0	BBD	BAV3	67
CD09978	RYR2-ex21	c.2399 T>C	V800A	FS	0/1	toléré(0.28) bénin(0.176)	0	0	0	Normale	BAV3	68
CD10272	SNTA1-ex1	c.254 C>A	R85L	FS	0/1	délétère(0.03) bénin(0.011)	0	0	0	Normale	BAV3	65
CD10547	RYR2-ex36	c.4911 A>G	R1637	SE / synonyme	0/1		0	0	0	BBG	BAV3	59
CD10870	MSX2-ex2	c.418 A>C*	K140H	FS	0/1	délétère(0.02) probablement dommageable(1.000)	0	0	0	NP	BAV3	70
		c.420 G>T*			0/1		0	0	0			
CD11115	TNNI3K-ex17	c.2207 T>A	V736E	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.957)	0	0	0	BBD+HBAG	BAV3	64
CD11388	TRPM4-ex18	c.2240 G>A	R892H	FS	0/1	délétère(0.02) bénin(0.222)	0	0	0	BBD+HBAG	BAV3	64

* Ces deux variants se situent sur le même haplotype.

Tableau 21 – Tableau récapitulatif des 11 variants novels identifiés

FS = Faux-sens ; SE = Site d'épissage ; GT = Génotype (0/1 = hétérozygote) ; PM = Pacemaker ; BBD = Bloc de Branche Droite ; BBG = Bloc de Branche Gauche ; HBAG = HémiBloc Antérieur Gauche ; BAV_i $i \in (1,2,3)$ = BAV de degré i .

Patient	Gène	Nucléotide	Acide aminé	CSQ	GT	Sift/PPH-2	Fréquences alléliques (%)			Morphologie QRS (ECG)	Phénotype	PM (Age)
							1000 Genomes	EVS	ExAC			
CD08058	<i>EMD</i> -ex5	c.428 C>T	S143F	FS	0/1	toléré(0.11) bénin(0.308)	0,17	0,015	0,040	BBDi	BAV3	65
CD06805	<i>GJA5</i> -ex2	c.793 G>A	P265S	FS	0/1	toléré(0.14) bénin(0.096)	0	0,023	0,028	Normale	BAV3	74
CD06852	<i>GJA5</i> -ex2	c.793 G>A	P265S	FS	0/1	toléré(0.14) bénin(0.096)	0	0,023	0,028	Normale	BAV3	74
CD06836	<i>NKX2.5</i> -ex2	c.428 C>T	R143Q	FS	0/1	inconnu(0)	0	0	0,054	Normale	BAV3	72
CD09094	<i>NKX2.5</i> -ex2	c.428 C>T	R143Q	FS	0/1	inconnu(0)	0	0	0,054	BBDi	BAV2 type 2	79
CD08468	<i>PRKAG2</i> -ex3	c.247 G>A	P83S	FS	0/1	toléré(1) bénin(0.002)	0	0,070	0,057	BBD	BAV2 type 2	78
CD09094	<i>RYR2</i> -ex12	C>T		SE / intronique	0/1		0	0	0,002	BBDi	BAV2 type 2	79
CD10272	<i>RYR2</i> -ex36	c.5294 C>G	S1765C	FS	0/1	toléré(0.07) possiblement dommageable(0.891)	0	0	0,021	Normale	BAV3	65
CD10961	<i>SCN10A</i> -ex10	c.1370 T>C	E457G	FS	0/1	délétère(0.05) bénin(0.062)	0	0	0,026	BBD	BAV2 type 2	64
CD06822	<i>SCN10A</i> -ex15	c.2428 C>A	G810W	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.932)	0	0	0	BBD+HBAG	BAV3	79
CD08708	<i>SCN10A</i> -ex20	c.3675 A>C	I1225M	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.999)	0	0,023	0,003	BBD	BAV3	72
CD08468	<i>SCN10A</i> -ex26	c.4568 C>T	C1523Y	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.997)	0,13	0,267	0,190	BBD	BAV2 type 2	78
CD07473	<i>SCN10A</i> -ex27	c.4984 C>T	G1662S	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.997)	0,13	0,186	0,074	BBD+HBAG	BAV1	79
CD08708	<i>SCN10A</i> -ex27	c.4984 C>T	G1662S	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.997)	0,13	0,186	0,074	BBD	BAV3	72
CD06802	<i>SCN1B</i> -ex3	c.641 G>A	R214Q	FS	0/1	toléré(0.28) bénin(0.17)	0,13	0,469	0,562	BBD	BAV3	75
CD09978	<i>SCN1B</i> -ex5	c.632 G>A	C211Y	FS	0/1	délétère(0) possiblement dommageable(0.866)	0,26	0,047	0,052	Normale	BAV3	68
CD10272	<i>SCN5A</i> -ex2	c.100 G>A	R34C	FS	0/1	délétère(0) possiblement dommageable(0.679)	0,13	0,133	0,115	Normale	BAV3	65
CD06623	<i>SCN5A</i> -ex6	c.673 G>A	R225W	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.999)	0	0,012	0,003	BBD	BAV1	75
CD06960	<i>SCN5A</i> -ex12	c.1715 G>T	A572D	FS	0/1	toléré(0.63) bénin(0.005)	0	0,239	0,369	BBD+HBAG	Normal	57
CD11388	<i>SCN5A</i> -ex12	c.1715 G>T	A572D	FS	0/1	toléré(0.63) bénin(0.005)	0	0,239	0,369	BBD+HBAG	BAV3	64
CD08333	<i>SCN5A</i> -ex20	c.3578 C>T	R1193Q	FS	0/1	toléré(0.19) bénin(0.001)	0,26	0,128	0,126	BBD+HBAG	Normal	64
CD06714	<i>SCN5A</i> -ex25	c.3917 C>T	R1306H	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.992)	0	0	0,002	BBD+HBAG	BAV2 type 2	86
CD07471	<i>SCN5A</i> -ex28	c.6010 A>G	F2004L	FS	0/1	toléré(0.65) bénin(0.001)	0,13	0,311	0,294	Normale	BAV3	82
CD10281	<i>SCN5A</i> -ex28	c.6010 A>G	F2004L	FS	0/1	toléré(0.65) bénin(0.001)	0,13	0,311	0,294	BBD+HBAG	Normal	62

CD10575	<i>SCN5A</i> -ex28	c.6010 A>G	F2004L	FS	0/1	toléré(0.65) bénin(0.001)	0,13	0,311	0,294	BBD	BAV3	62
CD09041	<i>SNTA1</i> -ex7	c.1324 G>A	R442X	GCS	0/1		0	0,012	0,001	BBD	BAV3	67
CD07604	<i>TBX5</i> -ex4	c.331 C>A	D111Y	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.999)	1	0,488	0,492	NP	BAV3	80
CD09047	<i>TBX5</i> -ex4	c.331 C>A	D111Y	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.999)	1	0,488	0,492	BBG	BAV3	62
CD10281	<i>TBX5</i> -ex4	c.331 C>A	D111Y	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.999)	1	0,488	0,492	BBD+HBAG	Normal	62
CD08467	<i>TNNI3K</i> -ex5	C>T		SE / intronique	0/1		1	0,826	0,857	Normale	BAV2 type 2	79
CD08855	<i>TNNI3K</i> -ex5	C>T		SE / intronique	0/1		1	0,826	0,857	Normale	BAV1	72
CD09978	<i>TNNI3K</i> -ex5	C>T		SE / intronique	0/1		1	0,826	0,857	Normale	BAV3	68
CD08309	<i>TNNI3K</i> -ex21	c.2360 T>C	I787T	FS	0/1	délétère(0.01) bénin(0.27)	1	0,372	0,603	BBD+HBAG	BAV1	79
CD10982	<i>TNNI3K</i> -ex21	c.2360 T>C	I787T	FS	0/1	délétère(0.01) bénin(0.27)	1	0,372	0,603	BBDC	BAV2 type 2	64
CD07012	<i>TRPM4</i> -ex6	c.755 G>A	R252H	FS	0/1	délétère(0.01) possiblement dommageable(0.772)	0	0,628	0,818	BBD	BAV2 type 2	59
CD07551	<i>TRPM4</i> -ex6	c.755 G>A	R252H	FS	0/1	délétère(0.01) possiblement dommageable(0.772)	0	0,628	0,818	BBG	BAV2 type 2	79
CD10082	<i>TRPM4</i> -ex6	c.755 G>A	R252H	FS	0/1	délétère(0.01) possiblement dommageable(0.772)	0	0,628	0,818	Normale	BAV2 type 2	70
CD06852	<i>TRPM4</i> -ex7	c.858 G>A	T286	SE / synonyme	0/1		0	0	0,001	Normale	BAV3	74
CD10547	<i>TRPM4</i> -ex11	c.1294 G>A	A432T	FS	0/1	délétère(0) possiblement dommageable(0.6)	0,13	0,105	0,056	BBG	BAV3	59
CD08333	<i>TRPM4</i> -ex11	c.1324 C>T	R442C	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.998)	0	0,023	0,018	BBD+HBAG	Normal	64
CD06802	<i>TRPM4</i> -ex12	c.1682 A>C	D561A	FS	0/1	toléré(0.22) bénin(0.086)	0,13	0,547	0,618	BBD	BAV3	75
CD10575	<i>TRPM4</i> -ex12	c.1682 A>C	D561A	FS	0/1	toléré(0.22) bénin(0.086)	0,13	0,547	0,618	BBD	BAV3	62
CD10547	<i>TRPM4</i> -ex13	c.1744 G>A	G582S	FS	0/1	toléré(0.39) bénin(0.038)	0,13	0,105	0,060	BBG	BAV3	59
CD06660	<i>TRPM4</i> -ex16	c.2209 G>A	G737R	FS	0/1	toléré(0.33) possiblement dommageable(0.765)	0,4	0,174	0,180	BBG	BAV1 + BAV2 type 2	62
CD06703	<i>TRPM4</i> -ex16	c.2209 G>A	G737R	FS	0/1	toléré(0.33) possiblement dommageable(0.765)	0,4	0,174	0,180	BBD+HBPG	BAV1	70
CD11065	<i>TRPM4</i> -ex17	c.2531 G>A	G844D	FS	1/1	toléré(0.2) probablement dommageable(0.945)	0,13	0,155	0,431	BBD+HBAG	BAV 2/1, 3/1	29
CD08382	<i>TRPM4</i> -ex17	c.2561 A>G	Q854R	FS	0/1	toléré(0.29) bénin(0.029)	0,26	0,117	0,289	DAG	BAV2 type 2	74
CD09978	<i>TRPM4</i> -ex18	c.2674 C>T	R892C	FS	0/1	délétère(0) probablement dommageable(0.985)	0	0,105	0,081	Normale	BAV3	68
CD07717	<i>TRPM4</i> -ex24	c.3611 C>T	P1204L	FS	0/1	toléré(0.21) inconnu(0)	0,13	0,327	0,505	Normale	BAV3	71
CD10703	<i>TRPM4</i> -ex24	c.3611 C>T	P1204L	FS	0/1	toléré(0.21) inconnu(0)	0,13	0,327	0,505	BBD+HBAG	BAV1	65

Tableau 22 – Tableau récapitulatif des 34 variants rares identifiés

FS = Faux-sens ; SE = Site d'épissage ; GCS = Gain d'un codon-stop ; CSQ = Conséquence ; GT = Génotype (0/1 = hétérozygote ; 1/1 = homozygote) ; PM = Pacemaker ; BBD = Bloc de Branche Droite ; BBDi = Bloc de Branche Droit Incomplet ; BBG = Bloc de Branche Gauche ; HBAG = Hémibloc Antérieur Gauche ; HBPG = Hémibloc Postérieur Gauche ; BAV _{$i \in (1,2,3)$} = BAV de degré i ; DAG = Déviation de l'axe QRS Gauche.

Les variants protéiques indiqués en gras ont déjà été publiés.

Gène	Nombres de Variants	Nombres de Patients	
<i>EMD</i>	1	1	
<i>GJA5</i>	1	2	
<i>LMNA</i>	1	1	
<i>MSX2</i>	2	1*	*1 patient porte 2 variants
<i>NKX2.5</i>	1	2	
<i>PRKAG2</i>	1	1	
<i>RYR2</i>	5	5	
<i>SCN10A</i>	5	5*	*1 patient porte 2 variants
<i>SCN1B</i>	2	2	
<i>SCN5A</i>	6	9	
<i>SNTA1</i>	2	2	
<i>TBX5</i>	1	3	
<i>TNNI3K</i>	4	7	
<i>TRPM4</i>	13	17*	*1 patient porte 2 variants
	45	43**	** 11 patients portent 2 variants, 2 en portent 3 et 1 en porte 4

Tableau 23 – Tableau récapitulatif du nombre de patients et de variants identifiés

A total, 45 variants différents ont été validés. Quarante-trois patients sont porteurs d'au moins un variant, 29 n'en possèdent qu'un, 11 en possèdent 2, 2 en possèdent 3 et 1 en possède 4 (Tableau 23).

Le gène *TRPM4*, déjà décrit dans des formes familiales de TdC (Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010), semble être l'un des gènes majoritaires liés aux TdC : 13 variants ont été retrouvés chez 17 patients (Figure 42).

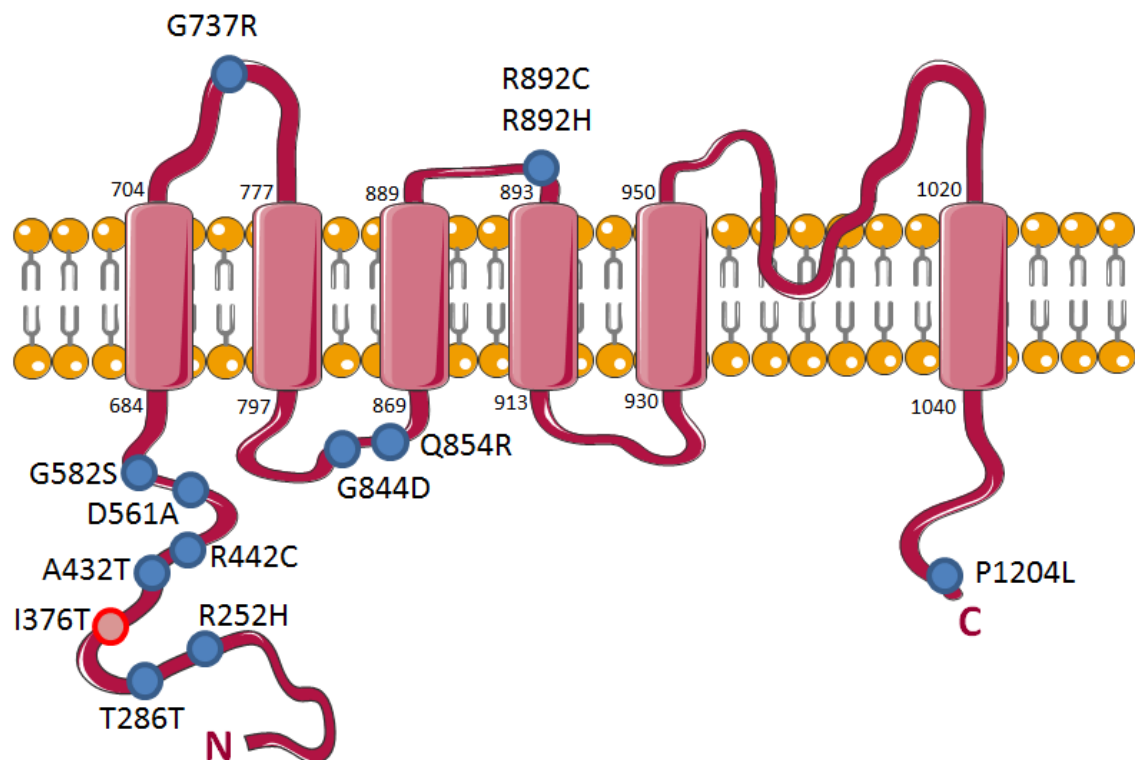


Figure 42 – Variants identifiés dans le gène *TRPM4*

En rouge, le variant I376T a été identifié dans une grande famille de l'ouest de la France et des analyses fonctionnelles ont été réalisées.

Le noyau familial du patient 11H0451, porteur du variant *TRPM4-I376T*, a pu être relié à une famille de la région rennaise souffrant elle aussi de troubles de la conduction cardiaque. Au total, une famille de 96 membres a pu être reconstituée et 57 membres dont 13 atteints ont été recrutés. L'analyse fonctionnelle de ce variant a été réalisée par l'équipe du Professeur Hugues Abriel à Berne en Suisse. Elle a permis de mettre en évidence un gain de fonction avec une augmentation de la densité de canaux TRPM4 à la membrane cellulaire. Cette étude a fait l'objet d'un article soumis dans le journal *Basic Research in Cardiology* (voir article 1 page 119).

Article 1 :

Xavier Daumy*, Mohamed-Yassine Amarouch* *et al.* (* Equal contribution)

***Basic Res Cardiol.* « A novel TRPM4 gain-of-function mutation is associated with human progressive familial heart block type I »**

(Manuscrit en préparation)

Abstract

Progressive familial heart block type I (PFHBI) is a progressive cardiac conduction defect (PCCD) form characterized by a progressive cardiac bundle branch disease in the His-Purkinje system that exhibits autosomal-dominant inheritance. PCCD has been mostly associated to rare mutations in SCN5A, SCN1B and TRMP4 influencing cardiac excitability, LMNA encoding lamina proteins responsible for the nuclear lamina structure and GJA5 involved in cell-to-cell communication. TRMP4 gain-of-function mutations associating impaired endocytosis have initially been reported in large Afrikaner and Lebanese pedigrees suffering from PFHBI. This pathology exhibits further genetic heterogeneity but genetic testing allows guidance for better patient care and sudden cardiac death prevention.

Here we identified the novel TRPM4 c.T1127C variant resulting in the substitution of threonine for isoleucine (p.I376T) in 39 relatives of a large French 4-generation pedigree. A total of 13 patients in this family were carrying the TRPM4 c.T1127C mutation. Clinical screening identified 9 individuals with PFHBI and three patients suffering from congenital atrioventricular block. Patients were considered as affected in the presence of complete bundle branch block or high degree conduction disturbance without structural heart disease. Functional analysis was performed using HEK293 cells, in whole-cell patch-clamp configuration and Western blotting. The TRPM4 p.I376T results in an increased current density that appears to be due to an elevated TRPM4 channel density at the cell surface as previously reported for TRPM4-PFHBI mutations.

This study identified the third largest pedigree diagnosed with TRMP4- PFHBI.

D'autres enquêtes familiales sont actuellement en cours afin de recruter les familles des patients mutés. Certains exemples sont présentés sur la Figure 43.

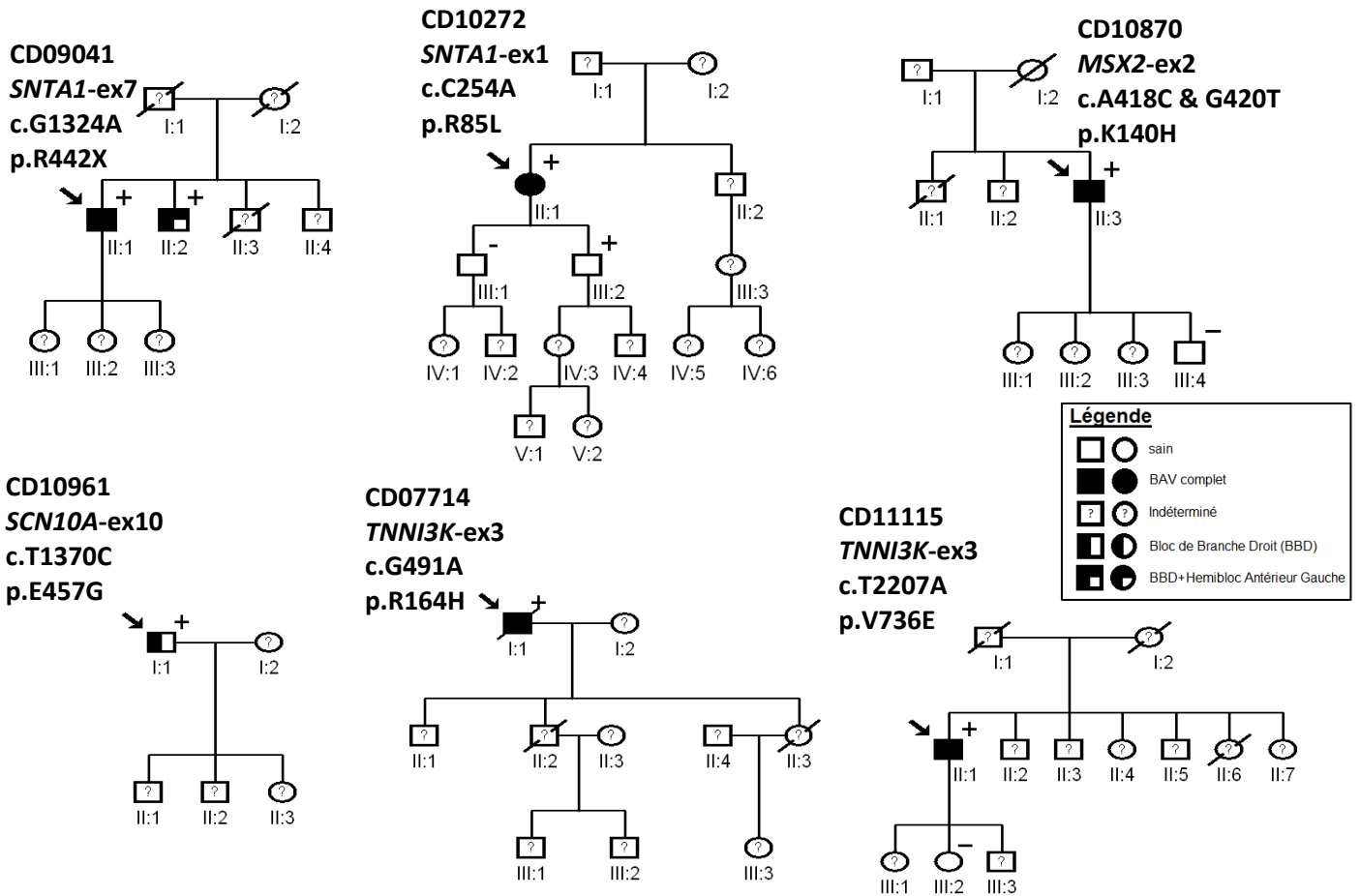


Figure 43 – Exemples de noyaux familiaux recrutés

Le signe + indique les patients porteurs du variant familial.

➤ **Enrichissement en variants rares**

Une seconde approche a été mise en place. Elle visait à identifier des gènes enrichis en variants rares chez les patients étudiés comparativement à une population contrôle de 167 patients atteints de rétrécissement aortique calcifié (RAC) originaires de la même région (ouest de la France). Ce test d'enrichissement ('*Burden test*') a été réalisé pour comparer la proportion de patients et de témoins porteurs d'au moins un variant rare avec conséquence fonctionnelle potentielle dans chacun des 163 gènes inclus dans le kit HaloPlex.

Sur les cinq gènes décrits dans les TdC, seul *TRPM4* présente un enrichissement significatif associé aux TdC avec 16,84 % (16) des patients BAVd porteurs d'au moins un variant d'intérêt comparativement aux 7,19 % (12) des témoins ($p = 0,021$) (Tableau 24). Cinq autres gènes sont également significativement enrichis en variants rares : *JPH2*, *MYH7*, *JUP*, *PITX2* et *TCAP* avec respectivement 5,26 % (5), 5,26 % (5), 6,32 % (6), 3,16 % (3) et 3,16 % (3) des patients BAVd porteurs d'au moins un variant d'intérêt comparativement aux 0 % (0) ; 0,6 % (1) ; 1,2 % (2) ; 0 % (0) et 0 % (0) des témoins. Les p valeurs respectives sont de 0,006 ; 0,025 ; 0,028 ; 0,047 et 0,047 (Tableau 24).

Afin de tester ces résultats avec une population témoin indépendante, nous avons réalisé ce test en utilisant 881 patients contrôles de la base britannique UK10K comme témoins. L'association significative de *TRPM4* avec les TdC a été confirmée avec cette seconde population témoin indépendante : 16,84 % (16) des patients BAVd contre 7,04 % (62) contrôles ($p = 0,002$) (Tableau 24). Un seul autre gène présente un enrichissement significatif pour les deux comparaisons effectuées. Dans la cohorte de BAVd, 6,32 % (6) des patients sont effectivement porteurs d'au moins un variant dans le gène *JUP* alors que ce n'est le cas que pour 1,25 % (11) des patients contrôles de la population UK10K ($p = 0,004$) (Tableau 24).

Gène	Comparaison 1 (BAV vs RAC)				Comparaison 2 (BAV vs UK10K)			
	Cas	Contrôles	p-val	OR	Cas	Contrôles	p-val	OR
<i>JPH2</i>	5,26 % (5)	0 % (0)	0,006	Infini	3,16 % (3)	0,91 % (8)	0,083	3,55
<i>TRPM4</i>	16,84 % (16)	7,19 % (12)	0,021	2,61	16,84 % (16)	7,04 % (62)	0,002	2,67
<i>MYH7</i>	5,26 % (5)	0,6 % (1)	0,025	9,15	5,26 % (5)	2,27 % (20)	0,087	2,39
<i>JUP</i>	6,32 % (6)	1,2 % (2)	0,028	5,52	6,32 % (6)	1,25 % (11)	0,004	5,32
<i>PITX2</i>	3,16 % (3)	0 % (0)	0,047	Infini	3,16 % (3)	1,36 % (12)	0,173	2,36
<i>TCAP</i>	3,16 % (3)	0 % (0)	0,047	Infini	3,16 % (3)	1,82 % (16)	0,420	1,76
<i>SCN5A</i>	9,47 % (9)	5,39 % (9)	0,215	1,83	9,47 % (9)	5,33 % (47)	0,105	1,86
<i>GJA5</i>	2,11 % (2)	0,6 % (1)	0,298	3,55	2,11 % (2)	0,57 % (5)	1	0
<i>LMNA</i>	1,05 % (1)	1,2 % (2)	1	0,88	1,05 % (1)	6,81 % (60)	0,024	0,15
<i>SCN1B</i>	2,11 % (2)	2,99 % (5)	1	0,70	2,11 % (2)	0,34 % (3)	0,337	3,11

Tableau 24 – Tableau récapitulatifs des tests CAST pour les gènes significatifs et les gènes impliqués dans les TdC

OR = Odds Ratio ; p-val = p valeur, significative si inférieure à 0,05. Les valeurs significatives sont indiquées en rouge.

Aucun autre gène décrit dans les TdC isolés, y compris *SCN5A*, n'est significatif pour aucun des deux tests. Cela souligne l'hétérogénéité génétique de cette pathologie.

➤ *Recherche de variants fréquents par étude d'association génome entier*

Au vu des résultats obtenus lors de l'étude d'association génome entier (GWAS) réalisée sur une cohorte de patients atteints du syndrome de Brugada (C. R. Bezzina et al. 2013), une étude similaire a été réalisée sur une cohorte de 184 patients atteints de TdC, incluant les 95 patients séquencés à l'aide du kit HaloPlex. Le but de cette étude était de détecter une éventuelle association de variants fréquents avec les TdC. La population contrôle utilisée pour cette étude est la population DESIR (Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance) composée de 898 individus de la région ouest de la France.

Sur les 184 patients, seuls 178 patients ont été effectivement analysés. Aucun SNP ne dépasse le seuil de significativité de $5 \cdot 10^{-8}$, ni même le seuil de suggestivité 10^{-6} , et aucune région significative ne se dégage (Figure 44).

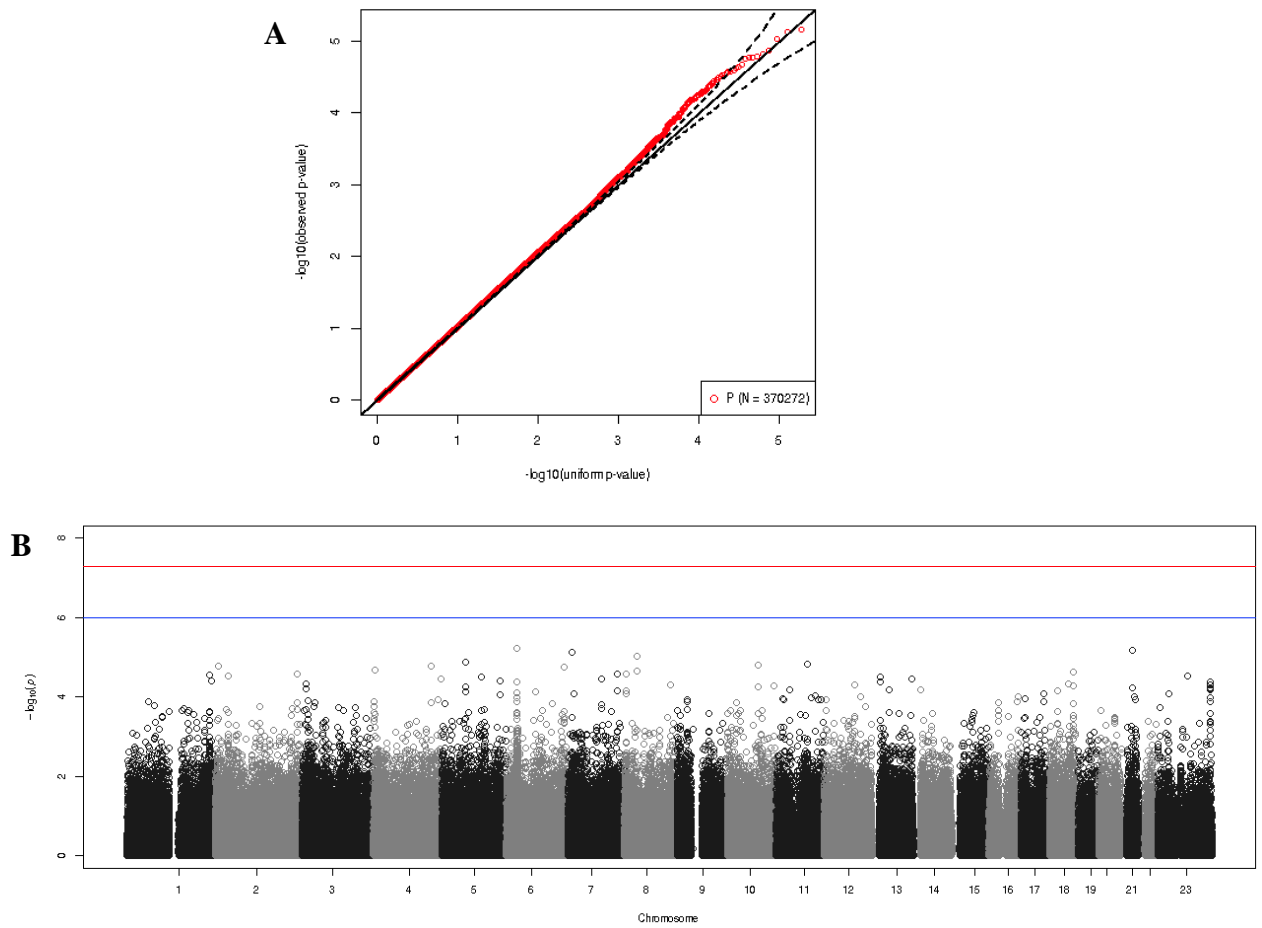


Figure 44 – Résultats de l'étude d'association génome entier réalisé sur les 174 patients atteints de TdC

A – 'QQ-plot'; B – 'Manhattan plot'.

En bleu est indiqué le seuil de suggestivité matérialisant le seuil au-delà duquel un pic de SNP doit être considéré. Le seuil de significativité correspondant à un p-valeur de 5.10^{-8} est indiqué en rouge. Au-delà de cette valeur, un pic de SNP est statistiquement associé à la pathologie.

II.4. Discussion

➤ *Etude des variants rares*

Les tests d'enrichissement en variants rares réalisés montrent que sur les cinq gènes impliqués dans des formes isolées de TdC (*SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4*, *GJA5*, *LMNA*), seul *TRPM4* est significativement associé aux TdC dans les deux comparaisons effectuées. Nos résultats confirment donc le rôle primordial de ce gène, déjà décrit comme impliqué dans des formes familiales de TdC (Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010), en montrant qu'il s'agit bien d'un des principaux gènes liés aux TdC dans la population européenne. Bien que *SCN5A* ait été le premier gène décrit dans les BAV, il semble bien que *TRPM4* ait un rôle encore plus important dans la conduction cardiaque.

Outre le fait qu'ils aient permis de souligner l'importance du gène *TRPM4* dans les TdC, ces tests ont également mis en lumière un nouveau gène, jamais évoqué dans les TdC isolés. Il s'agit du gène *JUP* qui code pour la plakoglobine, un membre de la famille des caténines capables de se lier aux desmogléines 1, des cadhérines situées au niveau des desmosomes. La plakoglobine est un composant clé des desmosomes et des jonctions adhérentes, et c'est un composant important pour l'adhérence de nombreux types cellulaires, notamment au niveau du cœur et de la peau. De par la fonction et la localisation de la protéine, une hypothèse physiopathologique peut être proposée : un variant dans le gène *JUP* pourrait induire une incapacité de la jonction intercellulaire à résister aux dommages induits par le stress ce qui serait particulièrement délétère au niveau des tissus contractiles tels que le cœur et les muscles squelettiques à cause des contractions répétées des cellules de ces tissus. Au niveau cardiaque, cela pourrait induire une faiblesse mécanique de la jonction intercellulaire responsable de l'altération de la transmission des potentiels d'action et donc de la conduction cardiaque.

Ce gène a cependant déjà été décrit dans des cas de dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD), une cardiomyopathie caractérisée par le remplacement progressif des cardiomyocytes par du tissu fibro-adipeux (McKoy et al. 2000). Une délétion homozygote de 2 pb a été identifiée chez 19 patients atteints de la maladie de Naxos, une DAVD à transmission récessive associée à des anomalies de la peau (kératodermie) et des cheveux (cheveux laineux). Cette délétion homozygote induisait un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon-stop prématuré et il est possible que la jonction intercellulaire soit très altérée au point que les cellules mortes sont remplacées par du tissu fibro-adipeux (McKoy et al. 2000). On peut supposer que les porteurs hétérozygotes d'une mutation dans ce gène pourraient développer une

atteinte cardiaque moins sévère. On observerait toutefois toujours le phénomène de fibrose dégénérative, accentuée avec le temps au fur et à mesure des contractions, pouvant atteindre le système de conduction comme cela a été décrit par Lenègre et Lev (Lenègre et Moreau 1963; Lenègre 1964; Lev et al. 1964). Dans notre étude, huit patients sont porteurs d'un variant dans le gène *JUP* et l'on observe des BAV de tous degrés et des atteintes des branches gauches et droites (Tableau 25). Ainsi, malgré l'implication de variants à l'état homozygote dans une pathologie du ventricule droit (DAVD), l'atteinte à l'état hétérozygote ne semble pas spécifique et touche l'ensemble du tissu de conduction. L'apparition de BBG dans le cadre de la maladie de Naxos a déjà décrite (Protonotarios et al. 1986).

Patient	Variant	Morphologie QRS	Phénotype	Autre(s) variant(s)
CD09041	P710S	BBD	BAV3	<i>RYR2</i> -T3142N <i>SNTA1</i> -R442X
CD06686	N690S	BBG	BAV3	-
CD07717	T452S	Normale	BAV3	<i>TRPM4</i> -P1204L
CD09096	R203C	HBAG	BAV2 type 2	-
CD11115	M193T	BBD + HBAG	BAV3	<i>TNNI3K</i> -V635E
CD07473	V159L	BBD + HBAG	BAV1	<i>SCN10A</i> -G1662S
CD09094	V648I	BBD incomplet	BAV2 type 2	<i>RYR2</i> -ex12+7pb (intronique) <i>NKX2.5</i> -R143Q
CD10009	V648I	BBG	BAV1	-

Tableau 25 – Patients porteurs d'un variant dans le gène *JUP*

*BBD = Bloc de Branche Droite ; BBG = Bloc de Branche Gauche ; HBAG = Hémibloc Antérieur Gauche ; BAV_i $i \in (1,2,3)$ = BAV de degré *i*.*

Quatre autres gènes sont de plus enrichis en variant rares lors du test utilisant la population de contrôle correspondante (comparaison 1 avec les patients atteints de rétrécissement aortique calcifié). Il s'agit des gènes *JPH2*, *PITX2*, *MYH7* et *TCAP*. La jonctophiline de type 2 codée par *JPH2* est un composant des complexes jonctionnels, complexes communs à tous les types de cellules excitables permettant les interactions entre la surface cellulaire et les canaux ioniques. Un variant dans cette protéine pourrait donc moduler l'adressage membranaire des canaux ioniques et donc altérer la conduction cardiaque. Ce gène a déjà été impliqué dans les cardiomyopathies hypertrophiques (Landstrom et al. 2007; Matsushita et al. 2007). La protéine codée par le gène *PITX2* agit comme un facteur de transcription régulant l'expression du gène codant la lysine hydroxylase, une enzyme indispensable à la formation et à la stabilisation du

collagène. Un variant dans le gène *PITX2* pourrait donc altérer la synthèse de la lysine hydroxylase et induire une accumulation de collagène responsable d'un phénomène de fibrose. Ce gène a déjà été impliqué dans diverses pathologies du développement et est fortement pressenti comme pouvant induire de la fibrillation atriale (Gudbjartsson et al. 2007; Boldt et al. 2010; Zhou et al. 2013). Le gène *MYH7* code pour la sous-unité bêta de la myosine cardiaque également exprimée dans certains muscles squelettiques. Des mutations dans ce gène ont été associées à diverses myopathies incluant des cardiomyopathies dilatées (Villard et al. 2005) et des cardiomyopathies hypertrophiques (Perrot et al. 2005). Le gène *TCAP* code lui pour une protéine présente dans le muscle strié cardiaque et qui se lie aux domaines Z1-Z2 de la titine. Ces interactions sont supposées être critiques pour l'assemblage des sarcomères. Des mutations dans ce gène ont été associées à des cardiomyopathies dilatées, hypertrophiques (Hayashi et al. 2004) et des dystrophies musculaires des ceintures (Moreira et al. 2000; Francis et al. 2014). On observe que les gènes statistiquement enrichis en variants rares sont plus des gènes impliqués dans des cardiopathies structurales que des gènes codant des canaux ioniques. Cela suggère que cette voie structurale joue un rôle de premier plan dans les TdC.

Enfin, les tests d'enrichissement montrent curieusement que le gène *LMNA* présente un enrichissement significatif seulement lorsque le test est appliqué à la population contrôle UK10K (comparaison 2) ($p = 0,024$) mais avec un odds ratio inférieur à 1. Cela signifie que des variants rares interviennent dans ce gène plus fréquemment chez les témoins que chez les patients. Ce résultat est probablement dû à un biais de comparaison entre deux sets d'origine et de nature différentes. En effet, la population témoin britannique utilisée ne correspond génétiquement pas à la population de cas dans la mesure où ces cas proviennent de l'ouest de la France. Lorsque la population de témoins internes (comparaison 1) provenant également de l'ouest de la France est utilisée, le test n'est pas significatif ($p = 1$). Même si de nouveaux tests en incluant plus de cas sont nécessaires, il est plus probable que le résultat issu du test avec la population interne comme témoin soit le plus pertinent. Une autre raison possible est l'existence d'un biais technique, nos patients ayant été séquencés à l'aide de la technologie HaloPlex et les individus UK10K avec la technologie SureSelect. Ces résultats montrent que le mieux est d'utiliser des sets de contrôles correspondants, de même origine que les patients étudiés et séquencés à l'aide de la même technologie.

En plus des tests d'enrichissement effectués, plusieurs variants, rares et novels, ont pu être identifiés dans des gènes d'intérêt (*TBX5*, *MSX2*, *NKX2.5*, *GJA5*, *PRKAG2*, *TNNI3K*, *RYR2*,

EMD, *LMNA*, *SNTA1*, *SCN10A*, *SCN1B*, *SCN5A* et *TRPM4*) et plusieurs voies physiopathologiques menant à l'apparition de TdC peuvent être proposées.

La voie concernant les canaux ioniques à travers les gènes *SNTA1*, *SCN10A*, *SCN1B*, *SCN5A* et *TRPM4* semble être confirmée par nos résultats. Le gène *TRPM4* a déjà été décrit comme impliqué dans des formes familiales de TdC (Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010) et au total, une dizaine de variants a déjà été identifiée chez des patients présentant des TdC (PFHB1, BAV, BBD) isolés. Ces derniers induiraient soit une dépolarisation membranaire réduisant le nombre de canaux sodiques disponibles en augmentant la probabilité que ces derniers soient inactivés altérant ainsi la conductance membranaire (Abriel et al. 2012; H. Liu et al. 2013; Kruse et Pongs 2014), soit une modification de la concentration $[K^+]$ extracellulaire qui éloignerait le potentiel membranaire de sa valeur optimale conduisant à une altération de la propagation des PA (Abriel et al. 2012; Kruse et Pongs 2014).

Nos résultats confirment le rôle primordial de ce gène. En plus des résultats des tests d'enrichissement réalisés qui montrent qu'il s'agit d'un des principaux gènes liés aux TdC dans la population européenne, treize variants, dont onze déjà publiés, ont été identifiés dans des cas isolés de TdC. L'un des deux variants novels, le variant *TRPM4*-I376T identifié chez le patient 11H0451, ségrège parfaitement avec la pathologie dans la famille de ce patient comprenant près de 100 membres. Des études fonctionnelles ont confirmé une augmentation de l'adressage membranaire de canaux TRPM4 se traduisant par l'effet gain de fonction comme cela a déjà été classiquement décrit (Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010). L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article soumis dans le journal *Basic Research in Cardiology* (voir article 1 page 119). L'autre variant novel, le variant faux-sens *TRPM4*-R892H, prédit délétère par SIFT a été identifié chez un patient également porteur du variant *SCN5A*-A572D.

Les gènes *SCN5A* et *SCN1B* codent tous deux pour des sous-unités des canaux sodiques et ont déjà été identifiés dans des formes familiales de TdC (Schott et al. 1999; Probst et al. 2003; Watanabe et al. 2008). Des études fonctionnelles ont montré que les mutations *SCN5A* et *SCN1B* décrites induisaient des TdC par la perte de fonction des canaux sodiques due à une haploinsuffisance (pour *SCN5A* et *SCN1B*) ou un effet dominant négatif (pour *SCN1B*).

Le gène *SNTA1* code pour la syntrophine $\alpha 1$, une protéine de la membrane cytoplasmique. Les isoformes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 2$ de la syntrophine, associées à la dystrophine et à la dystrobrevine, forment un complexe multiprotéique qui se lie au cytosquelette d'actine des cardiomyocytes. Ce complexe dystrophine-syntrophine interagit avec l'extrémité C-terminale du canal sodique

cardiaque voltage-dépendant Nav1.5 (Abriel 2010) et peut réguler le niveau d'expression de Nav1.5 et le courant sodique (Gavillet et al. 2006), c'est pourquoi il s'agit d'un bon gène candidat pour les TdC. Une mutation gain de fonction au sein de ce gène a été identifiée chez un patient atteint du syndrome du QT long de type 3 (Ueda et al. 2008), et la combinaison d'une mutation dans ce gène avec une mutation dans le gène *SCN5A* induit, elle aussi par un mécanisme de gain de fonction, la prolongation de la durée du potentiel d'action menant au phénotype du syndrome du QT long (R.-M. Hu et al. 2013). Les variants identifiés dans ce gène pourraient induire une perte de fonction des canaux sodiques entraînant des TdC. Il est intéressant de noter que l'on retrouve un variant entraînant le gain d'un codon-stop R442X. Le variant S385X a également été retrouvé dans l'analyse similaire d'un patient atteint du syndrome de Brugada et présentant des TdC (BBD et HBAG). De nombreux variants altérant la voie des canaux sodiques par un mécanisme de perte de fonction impliquent soit des TdC soit le syndrome de Brugada soit les deux (voir Tableau 3 en introduction à la page 50) (C. Bezzina et al. 1999; Kyndt et al. 2001). Une étude a d'ailleurs montré que le phénotype principal dans les familles de patients porteurs d'un variant dans le gène *SCN5A* et atteint du syndrome de Brugada correspondait aux troubles de la conduction similaires à la description du phénotype de la maladie de Lenègre (Probst et al. 2006). Il est donc probable que l'haploinsuffisance du gène *SNTA1* induite par ces deux variants entraîne une diminution de l'expression du canal sodique Nav1.5 et donc, par un mécanisme perte de fonction, une diminution des courants sodiques et un allongement du QRS, signe de l'altération de la conduction cardiaque, comme cela a été précédemment décrit sur un modèle murin (Gavillet et al. 2006). Les mécanismes responsables de l'apparition de TdC isolés, du syndrome de Brugada isolé ou des deux ne sont pas connus et dépendent peut-être du fond génétique, du sexe ou de l'âge du patient (Viswanathan, Benson, et Balsler 2003; C. R. Bezzina et al. 2006; C. R. Bezzina et al. 2013; van den Boogaard et al. 2014).

Le gène *SCN10A* code lui pour une sous-unité alpha du canal sodique $Na_v1.8$ qui est préférentiellement exprimé dans le système His-Purkinje de la souris par rapport au myocarde ventriculaire. Il a été montré que des bloqueurs spécifiques de ces canaux entraînaient une prolongation de l'intervalle QRS, indiquant le ralentissement de la propagation de l'influx dans le système de conduction ventriculaire spécialisé et l'activation retardée du myocarde ventriculaire (Sotoodehnia et al. 2010). De plus, une étude récente (van den Boogaard et al. 2014) a montré qu'un activateur situé dans le gène *SCN10A* interagissait avec le promoteur de *SCN5A*, régulant ainsi son activité, et qu'il était essentiel pour l'expression cardiaque de *SCN5A*. Cette étude a également permis d'associer un polymorphisme de *SCN10A*, déjà corrélé à l'altération de la conduction, à une diminution de l'expression de *SCN5A* dans le cœur. De plus, des

polymorphismes de ce gène ressortent souvent des études d'association s'intéressant à des paramètres électrocardiographiques caractéristiques de la conduction tels que la durée du PR ou du QRS (Chambers et al. 2010; Holm et al. 2010; Sotoodehnia et al. 2010; Pfeufer et al. 2010) et un autre polymorphisme de ce gène a récemment été associé de la même manière à une augmentation du risque de présenter un syndrome de Brugada (C. R. Bezzina et al. 2013). Ces résultats permettent de poser l'hypothèse selon laquelle un variant dans le gène *SCN10A* pourrait également induire une perte de fonction de Nav1.5 en régulant l'expression du gène *SCN5A* ce qui pourrait, de la même manière que les variants dans *SNTA1*, entraîner l'apparition de TdC et/ou d'arythmies.

Une autre voie concerne les gènes *NKX2.5*, *TBX5* et *MSX2* qui codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la morphogénèse cardiaque. Chez l'homme, la mise en place du réseau de conduction cardiaque est régie par l'interaction de plusieurs partenaires protéiques (*Alk3*, *Bmp2*, *Msx2*, *Nkx2.5*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5*) qui permettent la formation du NAV et du NSA ainsi que des voies de conduction des 4 cavités cardiaques. En finalité, cette cascade de signalisation réprime la transcription des gènes du développement des chambres cardiaques contenant une T-box (*Nppa*, *GJA5*, *GJA1* et *SCN5A*) maintenant le phénotype typique des voies de conduction cardiaques, notamment dans le NAV (Basson et al. 1997; Harris, Gourdie, et O'brien 2005; Christoffels et Moorman 2009).

Le gène *NKX2.5* est impliqué dans le contrôle de la septation et dans l'embryogénèse des voies de conduction, en particulier du nœud atrioventriculaire, puis dans leur maturation et le maintien de leur intégrité au cours de la vie (Schott et al. 1998; Moskowitz et al. 2007). Plusieurs mutations ont été décrites chez des patients présentant des malformations cardiaques congénitales associées à des TdC. Elles induisaient une haploinsuffisance, altérant la fixation du facteur de transcription *NKX2.5* à l'ADN (Schott et al. 1998). Une étude récente montre que *NKX2.5* semble réguler la prolifération des cardiomyocytes atriaux ainsi que du tissu de conduction (Nakashima et al. 2014). Tout comme *NKX2.5*, le gène *TBX5* joue un rôle majeur dans la spécification du système de conduction cardiaque, ventriculaire notamment (Moskowitz et al. 2007). Des mutations gain de fonction de ce gène causent diverses malformations cardiaques de gravité variable auxquels peuvent être associés des troubles du rythme et de la conduction (McDermott, Fong, et Basson 1993; Basson et al. 1997; Baban, Postma, et al. 2014; Baban, Pitto, et al. 2014; Bogarapu et al. 2014). De même que pour le projet 1, dans lequel on a montré qu'un gène impliqué dans des TdC associés à des cardiomyopathies dilatées (*LMNA*) pouvait être associé à des TdC isolés, on peut supposer que des variants, gain ou perte de

fonction, dans les gènes *NKX2.5*, *TBX5* ou *MSX2* peuvent modifier les taux physiologiques des facteurs de transcription correspondant et ainsi altérer la mise en place, le développement et/ou le maintien au cours de la vie du tissu conduction seul, sans atteinte morphologique cardiaque.

Outre cette voie physiopathologique directe, une seconde voie, peut être indirectement concernée par un variant dans l'un de ces gènes. En effet, il a également été montré que les protéines *Msx2*, *Tbx2*, *Tbx3* et *Tbx5* pouvaient interagir et réguler négativement l'expression de la connexine cardiaque majoritaire, la connexine 43 (Cx43) codée par *GJA1* (Boogerd et al. 2008). Un variant dans l'un des gènes correspondants, dont *TBX5* et *MSX2*, pourrait affecter les propriétés des canaux Cx43 et leur capacité à former des jonctions-gap de faible résistance entre cellules, altérant ainsi plus ou moins la propagation des potentiels d'action entre cellules en fonction du nombre de sous-unités mutées dans chaque jonction-gap, comme cela a été montré pour la connexine 45 codée par *GJA5* (Makita et al. 2012), gène dans lequel 2 variants faux-sens ont été identifiés.

Les gènes *TNNI3K* et *PRKAG2* codent tous les deux pour des protéines kinases et des variants dans ces gènes pourraient induire des mécanismes physiopathologiques non encore élucidés. Il a cependant déjà été montré que des variants dans *PRKAG2* étaient associés à divers phénotypes cardiaques incluant des cardiomyopathies hypertrophiques, le syndrome de Wolff-Parkinson-White, des troubles du rythmes et de la conduction et même des myopathies (Blair et al. 2001; Gollob, Green, et al. 2001; Gollob, Seger, et al. 2001; Arad et al. 2002; Charron et al. 2007; Pochmalicki et al. 2007; Govindan, Ward, et Behr 2010; B. Zhang et al. 2013). Le gène *TNNI3K* pourrait réguler la contractilité cardiaque et jouer plusieurs rôles de premier plan dans le système cardiaque (Y. Zhao et al. 2003). Une étude récente montre que le gène *Tnni3k* est un très bon candidat dans le contrôle de la durée de l'intervalle PR chez la souris (Lodder et al. 2012).

Le gène *RYR2* joue un rôle dans la signalisation calcique et dans le couplage excitation-contraction au niveau des cardiomyocytes. Des mutations dans ce gène sont associées à diverses cardiopathies telles que les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques (Laitinen et al. 2001; Priori et al. 2001), le syndrome du QT long (Tester et al. 2005), les dysplasies arythmogènes du ventricule droit (Tiso et al. 2001), les dysfonctions des nœuds sinusal et atrioventriculaire, les fibrillations atriales, les paralysies atriales et les cardiomyopathies dilatées (Bhuiyan et al. 2007). Localisé à la membrane du réticulum sarcoplasmique, ce canal est responsable du relargage du calcium dans le cytoplasme en réponse à une entrée de calcium dans la cellule par les canaux calciques voltage-dépendants de type L. Des mutations de ce gène pourraient altérer les mécanismes de la libération de Ca^{2+} , notamment pendant la phase 2 du

potentiel d'action. Ceci pourrait réguler (positivement en cas de gain de fonction ou négativement en cas de perte de fonction) l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, dont le but est de permettre l'entrée d'ions Na^+ afin de diminuer la concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ au niveau du cytoplasme, et jouer sur la durée du potentiel d'action. Un gain de fonction augmenterait la concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ cytoplasmique, augmenterait également le courant net entrant dépolarisant et ralentirait davantage le repolarisation en impliquant des post-dépolarisations retardées (DAD, 'Delayed After Depolarization'). Au contraire, une perte de fonction pourrait induire une repolarisation précoce. Plusieurs hypothèses sont évoquées pour les mécanismes cellulaires impliquant des tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques mais il semble que la grande majorité des mutations *RYR2* impliquent un gain de fonction (Wehrens 2007).

De plus, un autre variant novel a été identifié dans le gène *LMNA*. Il s'agit du variant *LMNA*-p.K114N validé chez le patient CD07505. Ce patient présente un phénotype de BAV3 avec une morphologie QRS de BBG complet. Ce phénotype est tout à fait compatible avec celui de la famille A décrite dans le projet 1 et renforce l'idée de la possibilité de définir un nouveau type de TdC, le PFHB de type 3, caractérisé par une atteinte initiale spécifique de la branche gauche et évoluant vers un BAV complet.

Enfin, le gène *EMD* (*STA*) code pour l'émerine qui est une protéine nucléaire transmembranaire partenaire privilégiée des lamines A/C et qui semble essentielle pour la fonction des muscles squelettiques et cardiaque. Des mutations dans le gène *EMD* impliquent un phénotype de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) (Bione et al. 1994; Nagano et al. 1996) à transmission liée à l'X, semblable à celui induit par certains variants dans le gène *LMNA* à transmission autosomique dominante (Gisèle Bonne et al. 1999). Dans les deux cas, les patients atteints d'EDMD présentent souvent des TdC. La plupart des mutations dans ce gène *EMD* inhibent la production d'émerine fonctionnelle mais les mécanismes physiopathologiques menant aux TdC restent à déterminer. La localisation cardiaque de l'émerine au niveau des desmosomes et des jonctions adhérentes intercellulaires (*fasciae adherens*), ainsi que sa fonction, permettent toutefois d'envisager un mécanisme physiopathologique menant aux TdC comparable au mécanisme évoqué dans le cas de mutations dans le gène *JUP* (Cartegni et al. 1997).

Compte-tenu de la forte interaction émerine-lamines et même si ce gène n'a pas encore été décrit dans des cas de TdC isolés, on peut supposer que le variant *EMD*-p.S143F, identifié chez le patient CD08058 atteint d'un BAV3, intervient dans la même voie physiopathologique que les variants identifiés dans le gène *LMNA*. Ce patient présente en effet un BBD incomplet et un

BAV3, phénotype non incompatible avec le phénotype de PFHB de type 3 si l'on considère que les BBD incomplets droits constituent une atteinte tout à fait banale présente dans une proportion non négligeable de la population saine. Au niveau du cœur, une hypothèse physiopathologique serait, à l'image de l'hypothèse structurale décrite dans le cas des laminopathies, que des mutations du gène *EMD* pourraient entraîner des défauts d'adhésion cellulaire. Ceux-ci impliqueraient une faiblesse mécanique de la jonction intercellulaire responsable de l'altération de la transmission des potentiels d'action et donc de la conduction cardiaque. Cela pourrait induire une incapacité de la jonction intercellulaire à résister aux dommages induits par le stress ce qui serait particulièrement délétère au niveau des tissus contractiles tels que le cœur et les muscles squelettiques à cause des contractions répétées des cellules de ces tissus. Cela correspondrait au phénotype de BAV dégénératif observé chez le patient CD08058 porteur du variant *EMD*-p.S143F.

➤ *Un modèle polygénique pour les TdC ?*

Le modèle monogénique n'est pas le seul modèle envisagé dans ces travaux. La combinaison de plusieurs variants rares et/ou fréquents pourrait être tout aussi causale que l'intervention d'un unique variant délétère. Cela conviendrait d'ailleurs mieux à un modèle de pathologie sporadique dans lequel la seule présence d'un variant rare ne suffirait pas pour développer la pathologie, et cela expliquerait également le fait que la pathologie ne se transmette pas ou peu au sein des familles des patients sporadiques. Cette hypothèse polygénique est cependant très difficile à vérifier, d'autant plus dans des cas sporadiques comme ici.

Au vu des résultats obtenus lors de l'étude d'association génome entier (GWAS) réalisée sur une cohorte de patients atteints du syndrome de Brugada (C. R. Bezzina et al. 2013), une étude similaire a été réalisée sur une cohorte de patients atteints de TdC afin de détecter l'éventuelle association de variants fréquents avec cette pathologie. A ce stade, aucun signal d'association n'a dépassé le seuil de significativité. En utilisant le logiciel Quanto, logiciel libre développé par l'université californienne USC (University of Southern California) et disponible sur le site <http://biostats.usc.edu/Quanto.html>, nous avons estimé que dans le cadre de l'étude réalisée, pour un variant fréquent (entre 20 et 30 % de la population générale), nous n'obtenions, avec une puissance satisfaisante (> 80 %), que des variants associés à des risques relatifs supérieurs à 3 correspondant à des effets forts. Cela signifie qu'avec notre population, nous ne pourrions identifier que des variants à effet fort. Si un effet identique à celui observé dans le Syndrome de

Brugada avait existé (C. R. Bezzina et al. 2013), nous aurions donc eu de fortes chances de l'identifier mais cela ne semble pas être le cas ici pour cette pathologie.

Si aucun variant fréquent à effet faible n'a pu être associé aux TdC, d'autres éléments appuient l'hypothèse de l'intervention de plusieurs facteurs génétiques dans les TdC. En effet, on observe, parmi les 95 patients non apparentés séquencés grâce au kit HaloPlex, 16 patients présentant plusieurs variants, soit dans des gènes différents, soit dans le même (Tableau 26). Plusieurs effets pouvant se cumuler, il est impossible de dire quels sont les variants causaux et quels sont ceux qui n'ont pas d'effet fonctionnel marqué, même si plusieurs variants ont déjà été décrits.

Patient	Variants
CD06802	TRPM4-D561A¹ ; SCN1B-R214Q
CD06852	TRPM4-T286 (synonyme) ; GJA5-P265S
CD07473	SCN10A-G1662S ; JUP-V159L
CD07717	TRPM4-P1204L¹ ; JUP-T452S
CD08333	TRPM4-R442C ; SCN5A-R1193Q
CD08468	SCN10A-C1523Y ; PRKAG2-P83S
CD08708	SCN10A-I1225M ; SCN10A-G1662S
CD09041	RYR2-T3142N ; SNTA1-R442X ; JUP-P710S
CD09094	RYR2-intronique (ex12+7pb) ; NKX2.5-R143Q
CD09978	RYR2-V800A ; TRPM4-R892C ; SCN1B-C211Y ; TNNI3K-intronique (ex5-8pb)
CD10272	RYR2-S1765C ; SNTA1-R85L ; SCN5A-R34C
CD10281	SCN5A-F2004L³ ; TBX5-D111Y
CD10547	RYR2-R1637R ; TRPM4-G582S¹ ; TRPM4-A432T^{1,2}
CD10575	SCN5A-F2004L³ ; TRPM4-D561A¹
CD11115	TNNI3K-V635E ; JUP-M193T
CD11388	TRPM4-R892H ; SCN5A-A572D

Les variants décrits sont indiqués en gras :

¹ (Stallmeyer et al. 2012)

² (H. Liu et al. 2010)

³ Ce variant a été identifié chez des patients atteints du syndrome de Brugada, du syndrome du QT long de type 3, de fibrillation atriale et dans des cas de mort subite du nourrisson (D. W. Wang et al. 2007; Bébarová et al. 2008; Olesen, Yuan, et al. 2012)

Tableau 26 – Patients de la plaque BAVd 1 chez qui plusieurs variants ont été identifiés

Au vu de ces résultats, il est cependant légitime de proposer l'hypothèse de la coexistence de plusieurs modes de transmission. Le patient CD08708 est hétérozygote composite puisqu'il présente deux variants dans le gène *SCN10A*, d'autres sont porteurs de plusieurs variants dans des gènes candidats, jusqu'à quatre pour le patient CD09978 dans les gènes *TRPM4*, *SCN1B*, *TNNI3K* et *RYR2*. Ainsi, le modèle polygénique doit-il être considéré. Ceci est notamment illustré par le fait que la combinaison des deux variants *TRPM4-G582S* et *TRPM4-A432T*, qui sont des variants très rares, a déjà été identifiée par Stallmeyer *et al.* (Stallmeyer et al. 2012) chez un patient atteint d'un BAV, le variant *TRPM4-A432T* ayant été identifié seul dans une grande famille dont le phénotype principale est le BBD. Un autre patient, récemment criblé grâce au même kit HaloPlex, présente (données non montrées) les deux variants *LMNA-R545H* et *TRPM4-W525X*, présentant une fréquence allélique inférieures à 0,13 % dans les populations européennes séquencées dans les projets EVS et 1000 Genomes. Il est intéressant de souligner le fait qu'il présente un BAV2 de type 2 ainsi qu'une morphologie QRS de BBG, compatible avec la forme de PFHB de type 3 décrite. Chez ce patient, on peut supposer que les deux variants induisent chacun un effet. L'haploinsuffisance due au gain d'un codon-stop prématuré dans le gène *TRPM4* impliquerait une perte de fonction de ce canal qui pourrait conduire à une hyperpolarisation du potentiel de membrane, et ainsi de réduire l'excitabilité cellulaire et altérer la conduction (H. Liu et al. 2013). Le variant faux-sens dans le gène *LMNA* impliquerait des altérations de la conduction se manifestant notamment par l'apparition du phénotype de BBG caractéristique des PFHB de type 3, selon les mécanismes potentiels proposés dans la discussion de la partie 1 de cette thèse.

Ainsi, on peut supposer que les modes de transmission autosomique dominant, hétérozygote composite, polygénique sont applicables aux TdC. Même si des cas familiaux avec transmission de type autosomique dominante ont été décrits (Schott et al. 1999; Watanabe et al. 2008; Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010; famille A du projet 1; famille décrite dans l'article 1 page 119), ce n'est probablement pas le seul mode de transmission et peut-être pas le majoritaire.

II.5. Conclusion

Ce projet met en avant le rôle prépondérant du gène *TRPM4* dans les TdC. Bien que *SCN5A* ait été le premier gène décrit dans les BAV, *TRPM4* semble bien être un gène au moins aussi important, comme le montrent les tests d'enrichissement.

Les tests d'enrichissement réalisés ont permis de mettre en lumière cinq nouveaux gènes candidats aux TdC : *JUP*, *JPH2*, *MYH7*, *PITX2* et *TCAP*. Il existe un enrichissement significatif en variants rares dans ces gènes chez les 95 patients BAVd comparativement aux 167 patients constituant la population témoin RAC utilisée.

Ce projet permet également de mettre en avant le fait que plusieurs modes de transmission doivent être pris en considération (autosomique dominant, hétérozygote composite et polygénique).

II.6. Perspectives

L'absence de résultat pour l'étude d'association génome entier (GWAS) réalisée peut vouloir signifier qu'il n'existe pas de marqueur génétique associé aux TdC, mais cela peut aussi venir du fait que la cohorte de patients utilisée est peu conséquente. En effet, seuls 178 patients ont été effectivement analysés et l'inclusion de nouveaux patients dans l'étude permettra peut-être d'atteindre la puissance statistique nécessaire à la détection d'une éventuelle association.

L'ensemble des patients inclus dans de cette étude d'association mais qui ne font pas partie des 95 patients déjà séquencés à l'aide du kit HaloPlex sont en cours de séquençage. Cela va permettre de continuer les études d'enrichissement pour éventuellement identifier de nouveaux gènes candidats (comme les gènes *JUP*, *JPH2*, *MYH7*, *PITX2* et *TCAP*). De nouveaux variants pourront également être identifiés et conduire au recrutement de nouvelles familles à l'image de celle du patient 11H0451 recrutée suite à l'identification du variant *TRMP4*-p.I376T (voir article 1 page 119).

Les recrutements en cours se poursuivent afin de valider la ségrégation des variants identifiés qui feront ensuite l'objet d'études fonctionnelles afin de valider leur implication dans les TdC.

Les patients porteurs homozygotes de variants dans le gène *JUP* présentent tous la maladie de Naxos. Selon notre hypothèse, un patient porteur hétérozygote pourrait présenter une atteinte cardiaque moins sévère pouvant se traduire par des TdC. Afin de le vérifier, il pourrait être intéressant de vérifier les phénotypes de l'ensemble des individus apparentés aux 19 patients présentant la délétion décrite dans l'étude de McKoy *et al.* à l'état homozygote (McKoy *et al.* 2000). Dans cet article, 29 patients diagnostiqués sains pour la maladie de Naxos, apparentés aux 19 patients atteints et porteurs à l'état hétérozygote de la même mutation n'ont pas été

spécifiquement explorés pour des TdC. L'analyse des données électrocardiographiques de ces 29 patients pourraient nous permettre de valider notre hypothèse.

III. PROJET 3 : Recherche de variants rares responsables de formes congénitales de TdC

III.1. Présentation du projet

Notre équipe a réalisé un recrutement multicentrique national qui a permis de constituer une cohorte de 141 enfants atteints d'un BAVc isolé et non lupique sélectionnés de manière rétrospective. Les enfants diagnostiqués jusqu'à 15 ans et traités entre 1980 et 2009 pour un BAV ont été sélectionnés (Baruteau, Fouchard, et al. 2012) dans 13 centres de cardiologie pédiatrique. Il s'agit de la plus grande cohorte mondiale publiée de BAVc.

Le BAV était asymptomatique chez 119 patients (84,4 %) et complet chez 100 d'entre eux (70,9 %). Le BAV de 29 des 41 patients (70,7 %) inclus présentant un BAV incomplet s'est complété.

Parmi ces patients, 15 enfants ont été sélectionnés avec leurs parents suivant plusieurs critères : les ADN du trio complet (père, mère et enfant) devaient être disponibles, les parents devaient être sains et il ne devait pas y avoir d'antécédent familial connu.

III.2. Description clinique globale des patients sélectionnés

Pour les 15 patients atteints, l'âge moyen lors du dernier examen clinique était de 6 ± 7 ans (Tableau 27). La fréquence cardiaque moyenne était de 57 ± 16 . Les données ECG n'étant pas disponibles pour deux patients (CD03661 et CD05916) et 11 patients présentant un BAV3, l'intervalle PR n'a pu être mesuré que pour deux patients seulement à 237 ms et 392 ms (315 ± 110 ms). Le complexe QRS moyen était de 83 ± 31 ms et l'intervalle QTc de 458 ± 103 ms. Dix patients ont été implantés d'un pacemaker dont la primo implantation a eu lieu à un âge moyen de 5 ± 6 ans (à la naissance pour les plus jeunes jusqu'à 22 ans pour le plus âgé).

Les données cliniques de ces 15 patients sont disponibles sur le Tableau 27 ci-dessous.

Trio	Individu	Age au dernier examen	FC	PR	QRS	QTc	Conduction/ Morphologie QRS	Phénotype	PM (Age)
0	CD11143 (F)	12	47	-	78	389	Normale	BAV3	2
1	CD03838 (F)	22	60	-	158	494	BBD	BAV3	22
2	CD03859 (H)	0	75	-	70	498	Normale	BAV3	3
3	CD03902 (F)	0	39	-	125	755	BBG	BAV3	0
4	CD05294 (H)	0	56	-	122	325	BBG	BAV3	0
5	CD05334 (F)	5	49	-	60	495	Normale	BAV3	5
6	CD04384 (H)	2	60	-	63	442	Normale	BAV3	
7	CD03661 (F)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	0
8	CD03666 (H)	4	50	-	55	385	Normale	BAV3	
9	CD05916 (H)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	9
10	CD03848 (H)	18	51	237	73	483	Normale	BAV1 + BAV2 type 1	
11	CD08330 (H)	3	100	392	64	415	Normale	BAV1	
12	R1384 (F)	5	50	-	65	443	Normale	BAV3	5
13	CD05367 (H)	2	60	-	75	397	Normale	BAV3	2
14	CD06155 (H)	4	43	-	70	433	Normale	BAV3	4
Moyenne		6 ± 7	57 ± 16	315 ± 110	83 ± 31	458 ± 103			5 ± 6

Tableau 27 – Données cliniques des 15 patients atteints de BAV congénital

Les patients hommes sont indiqués par (H) et les femmes par (F).

Pour les 30 parents sains, l'âge moyen lors du dernier examen clinique était de 41 ± 5 ans (Tableau 28). La fréquence cardiaque moyenne était de 70 ± 12 bpm avec des intervalles moyens PR et QTc de 145 ± 25 ms et 401 ± 33 ms respectivement, et un complexe QRS de 89 ± 12 ms.

Les données cliniques de ces individus sont disponibles sur le Tableau 28 ci-dessous.

Trio	Individu	Age au dernier examen	FC	PR	QRS	QTc	Conduction/ Morphologie QRS	Phénotype	Statut
0	CD00359 (F)	43	53	170	88	412	Normale	Normal	Sain
0	CD11242 (H)	46	74	184	94	418	Normale	Normal	Sain
1	CD03839 (F)	49	75	121	101	404	Normale	Normal	Sain
1	CD03840 (H)	50	67	173	91	398	Normale	Normal	Sain
2	CD03860 (F)	36	75	157	95	426	Normale	Normal	Sain
2	CD03861 (H)	37	60	145	83	389	Normale	Normal	Sain
3	CD03903 (H)	43	61	160	100	400	Normale	NP	Sain
3	CD03904 (F)	43	59	140	80	360	Normale	NP	Sain
4	CD05295 (H)	51	85	120	80	405	Normale	Normal	Sain
4	CD05296 (F)	30	73	150	80	397	Normale	Normal	Sain
5	CD05335 (F)	37	80	132	90	418	Normale	Normal	Sain
5	CD05336 (H)	36	90	194	101	473	Normale	Normal	Sain
6	CD04385 (F)	33	80	97	55	341	Normale	Normal	Sain
6	CD04386 (H)	37	75	102	79	318	Normale	Normal	Sain
7	CD03662 (H)	43	65	126	100	445	Normale	Normal	Sain
7	CD03663 (F)	40	60	123	85	390	Normale	Normal	Sain
8	CD03664 (H)	45	75	137	93	421	Normale	Normal	Sain
8	CD03665 (F)	41	78	127	103	446	Normale	Normal	Sain
9	CD05917 (F)	41	79	160	90	413	Normale	Normal	Sain
9	CD05918 (H)	40	61	140	110	380	BBD incomplet	NP	Probablement Sain
10	CD03849 (H)	46	70	175	99	412	Normale	Normal	Sain
10	CD03850 (F)	44	100	154	98	403	Normale	Normal	Sain
11	CD08331 (F)	39	69	122	88	437	Normale	Normal	Sain
11	CD08332 (H)	42	43	188	88	403	Normale	Normal	Sain
12	CD06654 (H)	39	48	159	88	353	Normale	Normal	Sain
12	CD06655 (F)	39	75	140	66	391	Normale	Normal	Sain
13	CD05366 (F)	38	60	116	69	351	Normale	Normal	Sain
13	CD05368 (H)	39	80	170	70	388	Normale	Normal	Sain
14	CD06156 (F)	37	60	130	92	409	Normale	Normal	Sain
14	CD06157 (H)	43	78	143	104	420	Normale	Normal	Sain
Moyenne		41 ± 5	70 ± 12	145 ± 25	89 ± 12	401 ± 33			

Tableau 28 – Données cliniques des parents des 15 patients atteints de BAV congénital

Les patients hommes sont indiqués par (H) et les femmes par (F).

III.3. Résultats des analyses des trios

➤ Recherche de variants de novo

La première hypothèse de notre étude est l'hypothèse *de novo*. Elle se base sur les estimations actuelles du taux moyen de mutations nucléotidiques simples germinales. Ce dernier est évalué à $1,18 \cdot 10^{-8}$ par position par génération ce qui correspond à environ 74 par génome par génération (the 1000 Genomes Project 2011; Veltman et Brunner 2012).

Dans cette étude, de même que pour les projets précédents, nous avons cherché à identifier des variants prédits délétères par VEP et/ou SnpEff, d'une fréquence inférieure à 1 % dans la population européenne. Les analyses ont été réalisées suivant la procédure décrite en annexe, au paragraphe 'Workflow Knime pour les analyses des trios suivant l'hypothèse de novo' page 178.

Pour mettre en application cette hypothèse, nous avons constitué deux pools : un pool des 15 patients BAVc atteints et un pool des 30 parents sains et nous avons cherché les variants présents dans le premier pool et absent du second. Le cas d'un variant partagé par un patient atteint et un membre du pool parents sains autre que son père ou sa mère ne nous intéresse pas dans la mesure où dans ce cas, le parent étant sain, ce variant pourrait être considéré comme non rare et non causal.

Au total, 143 variants ont pu être identifiés (138 variants différents dont 5 variants présents chez deux patients) comme potentiellement *de novo* suite à l'analyse des fichiers VCF. Ces variants ont tous été analysés individuellement par visualisation des alignements à l'aide de l'outil IGV (« *Integrative Genome Viewer* ») et, comme indiqué en annexe D.I.6 – Analyse bioinformatique tertiaire à la page 171, tous les faux-positifs flagrants et tous ceux qui n'intervenaient pas dans un transcrit codant de la base de NCBI ('*RefSeq Genes*') ont été éliminés de l'analyse.

Parmi les 96 variants restants, 19 ont été validés *de novo* par séquençage capillaire (Tableau 29), dont 14 faux-sens, 3 variants intervenant dans des sites d'épissage, 1 variant impliquant le gain d'un codon-stop prématuré et 1 délétion de 8 bases induisant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon-stop prématuré.

Trio	Gène	Nucléotide	Acide Aminé	Conséquence	Prédictions SIFT/PPH-2
0	<i>NSUN6</i>	c.956 C>T	p.R319Q	Faux-sens	délétère(0.01) probablement dommageable(0.997)
1	<i>GCN1L1</i>	G>T		Site d'épissage (intronique)	
2	<i>SHBG</i>	c.74G>A	p.R25H	Faux-sens	toléré(1) bénin(0)
2	<i>CNTROB</i>	c.137G>A	p.R46Q	Faux-sens	toléré(0.09) bénin(0.057)
3	<i>USH2A</i>	c.82T>A	p.I28L	Faux-sens	toléré(0.61) bénin(0.002)
3	<i>SOS2</i>	c.58G>C	p.R20G	Faux-sens	délétère(0) bénin(0.005)
4	<i>GPR107</i>	c.1396C>A	p.L466I	Faux-sens	toléré(1) bénin(0)
6	<i>PTGER3</i>	C>A		Site d'épissage (intronique)	
7	<i>TTC21B</i>	c.3641 T>C	p.D1214G	Faux-sens	délétère(0) probablement dommageable(0.982)
7	<i>C7orf61</i>	c.209 A>G	p.L70S	Faux-sens	toléré(0.06) possiblement dommageable(0.621)
8	<i>TEX29</i>	G>C		Site d'épissage (5'-UTR)	
9	<i>LPHN2</i>	c.296 A>G	p.N99S	Faux-sens	toléré(0.05) bénin(0.227)
9	<i>RHOBTB1</i>	c.1259 G>A	p.T420M	Faux-sens	délétère(0) probablement dommageable(0.933)
10	<i>RYR2</i>	c.10361 G>A	p.R3454H	Faux-sens	délétère(0) probablement dommageable(0.988)
11	<i>ZNF683</i>	c.1219_1226 delCTGCACTG	p.Q407CfsX461	Frameshift & protéine tronquée	
11	<i>ZNF22</i>	c.85 C>T	p.Q29X	Gain d'un codon-stop	
11	<i>GJC1</i>	c.224 C>T	p.R75H	Faux-sens	délétère(0) probablement dommageable(1)
11	<i>ATAD2B</i>	c.4212 C>G	p.L1404F	Faux-sens	délétère(0) probablement dommageable(0.995)
14	<i>DOPEY2</i>	c.6697 C>T	p.R2233C	Faux-sens	délétère(0.03) possiblement dommageable(0.585)

Tableau 29 – Tableau récapitulatif des 19 variants *de novo* identifiés

Outre ces variants *de novo*, 62 autres variants ont été testés par séquençage capillaire (dont 51 hérités d'un des deux parents, souvent mal couvert, et 11 faux-positifs dus à des biais d'expérimentation et/ou erreurs informatiques de détection secondaires à une mauvaise couverture de la région) et 15 variants n'ont pas pu l'être, notamment parce que 13 d'entre eux interviennent dans des régions répétées identifiées du génome répertoriées dans les bases de données 'Segmental Duplication' (Bailey et al. 2001), 'Human Chained Self Alignments' (Chiaromonte, Yap, et Miller 2002) et/ou 'RepeatMasker' (Smit 1996) (Tableau 30).

Trio	<i>De novo</i>	Hérité	Faux-positif
0	1	5	3
1	1	1	1
2	2	2	1
3	2	0	0
4	1	9	1
5	0	12	0
6	1	2	1
7	2	1	1
8	1	2	0
9	2	3	0
10	1	1	0
11	4	2	0
12	0	4	1
13	0	7	1
14	1	0	1
Totaux	19	51	11

Tableau 30 – Validations des variants d'intérêt chez les 15 enfants atteints de BAVc

➤ *Recherche de variants hétérozygotes composites*

Une seconde hypothèse a été proposée dans notre étude : l'hypothèse d'hétérozygotie composite (hétérozygotie composite au sens strict, c'est-à-dire que l'enfant hérite de deux variants hétérozygotes différents, chacun d'un de ses parents, et récessivité, c'est-à-dire que l'enfant homozygote hérite deux fois du même variant hétérozygote). Cette dernière se base sur une publication récente de notre équipe s'intéressant à 130 des parents des 141 enfants BAVc recrutés dans notre cohorte. Il a été montré par des analyses électrocardiographiques que ces parents présentaient plus d'anomalies électriques cardiaques bénignes que des individus témoins correspondants (Baruteau, Behaghel, et al. 2012), notamment des altérations légères de la conduction cardiaque comme un intervalle PR allongé ou un bloc de branche (50,8 % contre 4,6 % seulement chez les contrôles). Notre deuxième hypothèse suppose donc l'existence de deux variants mineurs, un chez chacun des deux parents, dont l'enfant atteint hériterait et la combinaison de ces deux variants lui conférerait un phénotype très sévère.

Cette hypothèse est notamment soutenue par la description d'une famille dont le propositus est né avec difficulté en présentant des complexes QRS anormalement larges. Sa sœur est décédée à l'âge de 1 an des suites de troubles de la conduction avec le même type de complexes larges. Des études génétiques ont montré que ces deux patients avaient hérités de la mutation non-sens *SCN5A-W156X* de leur mère et de la mutation faux-sens *SCN5A-R225W* de leur père. Des études fonctionnelles ont montré que la mutation W156X correspondait à une perte de fonction des canaux sodiques alors que la mutation R225W impliquait une réduction importante de la densité de courant I_{Na} et était également associé à des modifications du gating de ces canaux. La combinaison de ces deux mutations induit donc un phénotype très sévère de TdC alors que la possession d'un seul de ces deux variants n'est pas létale (C. R. Bezzina et al. 2003).

Pour cette seconde hypothèse, dans la mesure où nous nous intéressons à des variants plus fréquents, l'utilisation de pools n'est pas une solution adaptée. Nous avons donc analysé les trios un par un et la procédure d'analyse est décrite en annexe, au paragraphe 'Workflow Knime pour les analyses des trios suivant l'hypothèse d'hétérozygotie composite' page 181.

Ainsi, 2630 variants ont pu être identifiés dans l'ensemble des 15 trios, soit 175,3 par trio en moyenne (Tableau 31). Il y a bien sûr beaucoup plus de variants par trio par rapport à l'hypothèse *de novo*, les variants *de novo* étant très rares, et il est impossible de tous les valider par séquençage capillaire. Une sélection a donc été réalisée pour n'en valider, au moins dans un premier temps, qu'une partie. Cette sélection, non exhaustive, a consisté à ne conserver que les variants intervenant dans des gènes potentiellement impliqués (gènes candidats, gènes à expression cardiaque, gènes codant des canaux ioniques, des sous-unités de collagène, des protéines d'adhésion et/ou de communication cellulaire...). Soixante-six (2,5 %) de ces variants ont donc été validés par inspection visuelle à l'aide de l'outil IGV (« *Integrative Genome Viewer* ») et les validations capillaires sont encore en cours.

Trio	Nombre de variants hétérozygotes composites	Validations IGV	Validations capillaires
0	111	6	6
1	147	2	2
2	169	5	5
3	169	2	2
4	344	9	4
5	163	4	3
6	200	4	0
7	114	3	2
8	190	5	0
9	195	4	0
10	143	5	2
11	215	0	0
12	166	3	3
13	143	0	0
14	161	14	11
Totaux	2630 (175,3 en moyenne)	66 (4,4 en moyenne)	40

Tableau 31 – Récapitulatif du nombre de variants identifiés à l'aide de cette hypothèse d'hétérozygotie composite

Quarante variants (60,6 %) ont été testés en séquençage capillaires et tous (100 %) ont été validés, aucun ne s'est révélé être un faux-positif.

L'ensemble des 66 variants sélectionnés sont listés dans le Tableau 32. Ils interviennent dans 16 gènes : *CACNA11*, *CMYA5*, *COL15A1*, *COL16A1*, *COL18A1*, *COL2A1*, *COL5A3*, *COL6A5*, *DST*, *FAT1*, *FBN3*, *ITGA2*, *NOTCH1*, *SCN7A*, *TRPM1* et *TRPM4*.

Trio	Gene	Autres trios	Nucléotide	Conséquence	Acide Aminé	Hérité de	SIFT	PPH-2
0	COL6A5		c.1742 C>T	Faux-sens	A581V	père		probablement dommageable(0.999)
0	COL6A5		c.2414 A>G	Faux-sens	H805R	mère		bénin(0.029)
0	TRPM1	2	c.4611 A>T	Faux-sens	H1537Q	mère	toléré(0.49)	bénin(0)
0	TRPM1		c.4300 C>T	Faux-sens	V1434I	père	toléré(0.55)	bénin(0)
0	TRPM1	2	c.4240 C>A	Gain d'un codon-stop	E1414X	mère		
0	TRPM1		c.3958 C>T	Faux-sens	E1320K	père	délétère(0.02)	possiblement dommageable(0.729)
1	ITGA2		c.1600 G>A	Faux-sens	E534K	mère	toléré(1)	bénin(0)
1	ITGA2		c.2678 T>C	Faux-sens	I893T	père	délétère(0)	possiblement dommageable(0.73)
2	COL15A1	9, 14	c.1518 A>C	Faux-sens	E506D	père		bénin(0.015)
2	COL15A1	4, 12	c.3994 G>A	Faux-sens	V1332I	mère		possiblement dommageable(0.538)
2	TRPM1	0	c.4611 A>T	Faux-sens	H1537Q	père	toléré(0.49)	bénin(0)
2	TRPM1		c.4252 G>T	Faux-sens	P1418T	mère	toléré(0.38)	bénin(0.019)
2	TRPM1	0	c.4240 C>A	Gain d'un	E1414X	père		

codon-stop								
3	TRPM4		c.301 G>A	Faux-sens	A101T	père	toléré(0.76)	bénin(0.002)
3	TRPM4		c.2209 G>A	Faux-sens	G737R	mère	toléré(0.33)	possiblement dommageable(0.765)
4	COL15A1	9, 12	c.1336 G>A	Faux-sens	G446R	père		bénin(0.001)
4	COL15A1	2, 12	c.3994 G>A	Faux-sens	V1332I	mère		possiblement dommageable(0.538)
4	COL16A1		c.1958 C>T	Faux-sens	G653D	mère	-	inconnu(0)
4	COL16A1		c.250 C>T	Faux-sens	V84M	père	-	inconnu(0)
4	FBN3		c.7620 A>C	Faux-sens	H2540Q	père	délétère(0.04)	probablement dommageable(0.989)
4	FBN3		c.3365 C>A	Faux-sens	G1122V	père	délétère(0.03)	bénin(0.032)
4	FBN3		c.1418 C>T	Faux-sens	R473Q	mère	toléré(0.5)	bénin(0.004)
4	FBN3		c.1113 C>T	Faux-sens	M371	mère	toléré(0.4)	bénin(0.002)
4	FBN3		c.751 A>G	Faux-sens	C251R	mère	délétère(0)	probablement dommageable(0.999)
5	COL18A1		c.538 G>A	Faux-sens	A180T	mère	toléré(0.86)	inconnu(0)
5	COL18A1	7	c.4318 G>A	Faux-sens	D1440N	père	délétère(0.01)	possiblement dommageable(0.668)
5	SCN7A		c.4901 C>T	Faux-sens	R1634H	père	délétère(0.03)	bénin(0.224)
5	SCN7A		c.3110 A>C	Faux-sens	V1037G	mère	délétère(0)	probablement dommageable(0.968)
6	FBN3		c.143 C>T	Faux-sens	R48Q	père	délétère(0.01)	probablement dommageable(0.992)
6	FBN3		c.2033 G>A	Faux-sens	T678M	mère	toléré(0.22)	bénin(0.028)
6	NOTCH1		c.4129 G>A	Faux-sens	P1377S	père	toléré(0.41)	bénin(0.002)
6	NOTCH1		c.3836 C>T	Faux-sens	R1279H	mère	toléré(0.16)	bénin(0.033)
7	COL18A1		c.2657 C>G	Faux-sens	P886R	mère	délétère(0)	probablement dommageable(0.945)
7	COL18A1		c.3835 G>A	Faux-sens	D1279N	père	toléré(0.25)	possiblement dommageable(0.803)
7	COL18A1	5	c.4318 G>A	Faux-sens	D1440N	père	délétère(0.01)	possiblement dommageable(0.668)
8	COL5A3		c.3584 A>G	Faux-sens	V1195A	père	délétère(0.04)	possiblement dommageable(0.883)
8	COL5A3		c.3365 C>T	Faux-sens	R1122H	mère	délétère(0.01)	possiblement dommageable(0.56)
8	FAT1		c.12653 T>C	Faux-sens	D4218G	père	toléré(0.29)	possiblement dommageable(0.571)
8	FAT1		c.8152 T>C	Faux-sens	I2718V	mère	toléré(0.71)	bénin(0.052)
8	FAT1		c.385 C>G	Faux-sens	V129L	mère	toléré(1)	bénin(0)
9	CACNA1I		c.4538 C>T	Faux-sens & site d'épissage	T1513M	père	toléré(0.22)	bénin(0.012)
9	CACNA1I		c.4603 G>T	Faux-sens	V1535L	mère	toléré(0.19)	possiblement dommageable(0.622)
9	COL15A1	4, 12	c.1336 G>A	Faux-sens	G446R	mère		bénin(0.001)
9	COL15A1	2, 14	c.1518 A>C	Faux-sens	E506D	père		bénin(0.015)
10	COL2A1		c.3991 C>T	Faux-sens	V1331I	mère	toléré(1)	inconnu(0)
10	COL2A1	14	c.426 T>A	Faux-sens	E142D	père	toléré(0.66)	inconnu(0)
10	DST		c.11161 C>T	Faux-sens	D3721N	mère	délétère(0.03)	probablement dommageable(0.988)
10	DST		c.10788 G>C	Faux-sens	S3596R	mère	délétère(0)	probablement dommageable(0.988)
10	DST		c.5780 T>C	Faux-sens	H1927R	père	toléré(0.07)	possiblement dommageable(0.795)
12	COL15A1	4, 9	c.1336 G>A	Faux-sens	G446R	mère		bénin(0.001)
12	COL15A1		c.3140 G>A	Faux-sens	G1047D	mère		bénin(0.005)
12	COL15A1	2,4	c.3994 G>A	Faux-sens	V1332I	père		possiblement dommageable(0.538)

14	CMYA5		c.191 A>G	Faux-sens	Y64C	mère	toléré(1)	bénin(0)
14	CMYA5		c.1046 G>A	Faux-sens	G349D	mère	toléré(1)	bénin(0)
14	CMYA5		c.1772 G>A	Faux-sens	G591D	mère	toléré(1)	bénin(0)
14	CMYA5		c.1951 A>C	Faux-sens	S651R	mère	toléré(0.78)	bénin(0)
14	CMYA5		c.3017 T>C	Faux-sens	V1006A	mère	toléré(0.26)	bénin(0)
14	CMYA5		c.4700 C>A	Faux-sens	A1567E	mère	toléré(0.48)	possiblement dommageable(0.628)
14	CMYA5		c.4795 T>G	Faux-sens	S1599A	mère	toléré(0.17)	bénin(0.121)
14	CMYA5		c.5161 A>G	Faux-sens	I1721V	mère	toléré(1)	bénin(0)
14	CMYA5		c.5758 A>G	Faux-sens	S1920G	mère	toléré(1)	bénin(0)
14	CMYA5		c.6784 G>C	Faux-sens	V2262L	mère	toléré(1)	bénin(0)
14	CMYA5		c.8718 A>C	Faux-sens	K2906N	mère	délétère(0.03)	bénin(0.103)
14	CMYA5		c.245 G>A	Faux-sens	G82E	père	délétère(0)	probablement dommageable(0.938)
14	COL15A1	2, 9	c.1518 A>C	Faux-sens	E506D	mère		bénin(0.015)
14	COL15A1		c.2959 G>A	Faux-sens	G987R	père		probablement dommageable(0.998)

Tableau 32 – Récapitulatif des 66 variants validés par inspection visuelle grâce à l’outil IGV

Le gène *CACNA1I* code pour la sous-unité alpha d'un canal calcique voltage-dépendant, le gène *CMYA5* correspond au gène ‘cardiomyopathy associated 5’, les gènes *COL15A1*, *COL16A1*, *COL18A1* (impliqué dans le syndrome de Knobloch), *COL2A1* (impliqué dans plusieurs pathologies squelettiques et oculaires parfois regroupées sous le terme de collagénopathies de type II), *COL5A3* et *COL6A5* codent pour des sous-unités alpha de collagènes, le gène *DST* code pour une protéine jouant un rôle d’adhérence au niveau des plaques de jonctions, le gène *FAT1* code également pour une protéine jouant un rôle dans l’adhésion cellulaire probablement important pour des processus développementaux et pour la communication cellulaire. Le gène *FBN3* est fortement exprimé dans les tissus fœtaux tout comme le gène *NOTCH1* qui joue un rôle-clef dans le développement et l’interaction entre cellules vicinales. Le gène *ITGA2* code pour une protéine intervenant dans l’adhésion à la matrice extracellulaire, le gène *SCN7A* code pour une sous-unité alpha d’un canal sodique voltage-dépendant et *TRPM1* code pour un canal cationique calcium dépendant de la même famille que le canal codé par le gène *TRPM4*, déjà impliqué dans les BAV.

III.4. Discussion

Dix-neuf variants *de novo* ont pu être identifiés. Parmi eux, deux apparaissent particulièrement intéressants : *RYR2*-p.R3454H et *GJC1*-p.R75H. Ces deux gènes faisaient partie des 19 gènes candidats particulièrement étudiés lors du projet 2.

Comme indiqué dans la discussion de la partie 2, le gène *RYR2* joue un rôle dans la signalisation calcique et dans le couplage excitation-contraction au niveau des cardiomyocytes. Localisé à la membrane du réticulum sarcoplasmique, ce canal est responsable du relargage du calcium dans le cytoplasme en réponse à une entrée de calcium dans la cellule par les canaux calciques voltage-dépendants de type L. Des mutations dans ce gène sont associées à diverses cardiopathies telles que les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques (Laitinen et al. 2001; Priori et al. 2001), le syndrome du QT long (Tester et al. 2005), les dysplasies arythmogènes du ventricule droit (Tiso et al. 2001), les dysfonctions des nœuds sinusal et atrioventriculaire, les fibrillations atriales, les paralysies atriales et les cardiomyopathies dilatées (Bhuiyan et al. 2007). Le variant *RYR2*-p.R3454H intervient en dehors des trois domaines dans lesquels les variants identifiés chez des patients atteints de tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques se concentrent (Postma et al. 2005).

De nouvelles mutations de ce gène pourraient altérer les mécanismes de la libération de Ca^{2+} , notamment pendant la phase 2 du potentiel d'action. Ceci pourrait réguler (positivement en cas de gain de fonction ou négativement en cas de perte de fonction) l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, dont le but est de permettre l'entrée d'ions Na^+ afin de diminuer la concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ au niveau du cytoplasme, et jouer sur la durée du potentiel d'action. Un gain de fonction augmenterait la concentration $[\text{Ca}^{2+}]$ cytoplasmique, augmenterait également le courant net entrant dépolarisant et ralentirait davantage le repolarisation en impliquant des post-dépolarisations retardées (DAD, 'Delayed After Depolarization'). Au contraire, une perte de fonction pourrait induire une repolarisation précoce.

Le gène *GJC1* code lui pour la connexine 45 (Cx45) qui est principalement exprimée au niveau des jonctions nodales ainsi qu'au niveau du faisceau de His et de ses branches. Plusieurs hypothèses physiopathologiques peuvent être avancées. En effet, il a été montré que les jonctions-gap jouaient un rôle très important dans la croissance et le développement. La délétion des gènes des connexines non seulement affecte leur fonction cardiaque spécifique mais induit également des altérations développementales (Veen, Rijen, et Opthof 2001). Dans une étude, les souris Cx45 KO mourraient *in utero* et le cœur embryonnaire était dilaté à cause d'un défaut

dans le développement vasculaire (Kruger et al. 2000). Une autre étude a montré l'apparition de blocs atrioventriculaires pendant les 24 premières heures au cours desquelles ces cœurs en développement se contractent *in utero* (Kumai et al. 2000). La première hypothèse, développementale, consiste à dire qu'un variant hétérozygote dans le gène de la Cx45 pourrait donc altérer le développement cardiaque *in utero* du patient et induire des malformations du tissu de conduction se traduisant par l'apparition de BAV congénitaux. Une seconde hypothèse électrophysiologique se base sur ce qui a été décrit pour la connexine 40 codée par *GJA5* (Makita et al. 2012). Un variant dans le gène de la Cx45 pourrait affecter les propriétés des canaux Cx45 en altérant leur capacité à former des jonctions-gap de faible résistance entre cellules, modulant ainsi plus ou moins la propagation des potentiels d'action entre cellules en fonction du nombre de sous-unités mutées dans chaque jonction-gap. Cette hypothèse est soutenue par une étude récente qui a montré que des souris adultes, Cx45 KO induites, présentaient une conductivité atrioventriculaire altérée (Frank et al. 2012). Les deux hypothèses formulées ne s'excluent pas et se complètent même. L'hypothèse électrophysiologique expliquerait l'apparition des BAV tandis que l'hypothèse développementale expliquerait la précocité de l'apparition des TdC dans la vie des patients et donc le caractère congénital de la pathologie.

La validation des 15 variants restant par séquençage capillaire est difficile puisqu'ils interviennent dans des régions dupliquées du génome. Ces variants sont d'ailleurs potentiellement de faux-positifs. En effet, l'algorithme BWA, qui aligne les reads sur le génome de référence, attribue chaque read à la région sur laquelle il est aligné avec la meilleure qualité d'alignement (MAPQ). Lorsqu'il existe plusieurs régions potentielles avec des MAPQ identiques, le read est attribué à l'une d'elle au hasard et l'on peut alors observer des faux-positifs dus à des reads mal alignés.

Au moins un variant *de novo* a été identifié et validé pour chaque trio exceptés les trios 5, 12 et 13, soulignant la nécessité d'envisager d'autres modes d'apparition de la pathologie. Dans le cadre de la recherche de variants hétérozygotes composites, la sélection des variants réalisée est totalement subjective. Des études approfondies sont nécessaires. Néanmoins, plusieurs voies peuvent également être proposées. Elles rejoignent les voies évoquées la discussion de la partie 2. Ainsi, on observe des patients hétérozygotes composites pour des variants intervenant dans des gènes codant des canaux ioniques, décrits (*TRPM4*) ou non (*TRPM1*, *CACNA1I*, *SCN7A*), dans des gènes intervenant dans des processus développementaux (*FBN3*, *NOTCH1*), dans des gènes jouant un rôle dans l'adhésion et la jonction intercellulaire (*DST*, *FAT1*, *NOTCH1*,

ITGA2). On observe également des variants hétérozygotes composites dans des gènes codant pour des sous-unités de collagène (*COL15A1*, *COL16A1*, *COL18A1*, *COL2A1*, *COL5A3*, *COL6A5*). La régulation du collagène semble particulièrement importante afin de garantir une conduction normale au niveau du tissu de conduction. Une fibrose excessive est effectivement associée à des troubles de la conduction (Lenègre et Moreau 1963; Lenègre 1964; Lev 1964). Des variants dans ces gènes ayant un effet gain de fonction pourraient induire des TdC.

III.5. Conclusion et perspectives

Même si les résultats ne sont encore que préliminaires, l'existence de variants *de novo* pourrait expliquer l'apparition de la pathologie dès l'enfance, voire *in utero* pour les cas les plus sévères de BAV congénital. Dix-sept nouveaux gènes candidats ont été mis en avant grâce à cette hypothèse.

Cependant, et c'est une limite de cette étude, l'utilisation de trios implique un trop faible nombre de cas pour pouvoir conclure sur la causalité de ces variants. C'est pourquoi ces gènes candidats seront testés à l'aide de la technologie HaloPlex sur l'ensemble de la cohorte BAVc, plus grande cohorte mondiale publiée. Un nouveau kit contenant ces gènes est en cours de conception et des tests d'enrichissement pourront aussi être appliqués. Des études fonctionnelles seront ensuite réalisées pour les gènes candidats.

Le recrutement de nouveaux cas de BAVc est essentiel afin d'agrandir la cohorte. Cela permettrait éventuellement d'envisager d'identifier par séquençage NGS de nouveaux gènes candidats et de nouveaux variants à tester en fonctionnel, de réaliser des tests statistiques d'enrichissement comme présenté dans le projet 2 voire de réaliser une étude d'association génome entier (GWAS).

L'hypothèse d'hétérozygotie composite semble plausible et plusieurs articles vont dans ce sens (C. R. Bezzina et al. 2003; Baruteau, Behaghel, et al. 2012). Le seuil de fréquence de 10 % choisi semble trop élevé et de nouvelles analyses avec un seuil abaissé à 5 % ont été lancées pour limiter le nombre de candidats à explorer. Cette pathologie présente une fréquence d'un cas toutes les 20 000 naissances environ (Michaelsson et Engle 1972; Camm et Bexton 1984; Kertesz, Fenrich, et Friedman 1997; Michaelsson, Riesenfeld, et Jonzon 1997; Balmer et al. 2002; Baruteau, Fouchard, et al. 2012). Une manière de filtrer cette liste serait de calculer le

produit des fréquences de chaque couple de variants identifié. Cela permettrait d'éliminer les couples dont la fréquence de coappartition serait supérieure à ce seuil. Nous n'avons, de plus, recherché que deux variants intervenant dans le même gène. Deux variants causaux pourraient en effet intervenir dans deux gènes différents, soit sur le même chromosome, soit sur des chromosomes différents. L'analyse de l'ensemble des combinaisons possibles risque d'être fastidieuse mais nous pourrions commencer par rechercher des couples de variants hétérozygotes éloignés d'un certain nombre maximum de paires de base.

Dans ces deux analyses, nous n'avons envisagé que les hypothèses monogénique (recherche de variant *de novo*) et digénique (recherche de variants suivant l'hypothèse d'hétérozygotie composite). L'existence de modèles épistasiques plus complexes, polygéniques ne peut être exclue et il faudra également explorer cette piste.

Le temps a manqué afin de pouvoir prendre en considération l'hypothèse de récessivité dans ce travail de thèse. Néanmoins, le workflow Knime a été créé et est expliqué en annexe, au paragraphe 'Workflow Knime pour les analyses des trios suivant l'hypothèse d'hétérozygotie composite' à la page 181. Compte-tenu de la prévalence de la pathologie, un seuil de 1,5 % a été choisi afin de garder une certaine marge de sécurité.

C. Discussion générale, conclusions et perspectives

➤ Principales conclusions

L'ensemble des résultats obtenus permet de mieux comprendre les bases génétiques responsables de la physiopathologie des troubles de la conduction cardiaque. L'importance de certains gènes dans cette pathologie a ainsi pu être réévaluée. Ainsi, le gène déjà décrit *TRPM4* semble jouer un rôle prépondérant et être le gène principal lié à cette pathologie dans la population européenne. L'identification du variant du *LMNA*-p.E347K permet de plus de proposer ce gène comme le cinquième identifié dans des formes isolées de TdC. Cela permet également la description d'un nouveau type de TdC, le PFHB (*Progressive Familial Heart Block*) de type 3 caractérisé par une atteinte spécifique de la branche gauche et évoluant par la suite vers un BAV complet. Cinq gènes, *JUP*, *JPH2*, *MYH7*, *PITX2* et *TCAP* ont également pu être identifiés comme des gènes candidats sérieux grâce aux tests d'enrichissement.

De nouveaux variants ont également pu être mis en évidence dans des gènes déjà décrits, dans des gènes candidats et dans de nouveaux gènes confirmant ainsi l'hétérogénéité génétique des TdC. En effet, avec le gène *LMNA*, cinq gènes ont été identifiés dans des formes isolées de la pathologie, et de nombreux variants ont été identifiés dans de nombreux gènes candidats. Cela reflète l'hétérogénéité phénotypique observée chez les patients : alors que l'atteinte est spécifique d'une branche ou d'une hémibranche dans certains cas, elle est plus généralisée dans d'autres, avec des BAV de degrés variables. L'âge d'apparition ainsi que la vitesse de progression des troubles conductifs varient également d'un patient à l'autre. Cela correspond aux conséquences fonctionnelles diverses des différents types de mutations intervenant dans l'un des nombreux gènes jouant un rôle dans les multiples voies physiopathologiques assurant la conduction cardiaque.

En effet, plusieurs voies physiologiques (canaux ioniques, développement, couplage et jonction cellulaires, couplage excitation-contraction, structure, modifications post-traductionnelles) ont été proposées. Bien sûr cette liste n'est pas exhaustive mais elle permet d'entrevoir l'hétérogénéité potentielle des TdC. De plus, toutes ces voies ne sont clairement pas indépendantes.

Enfin, ce travail permet également de mettre en avant le fait que plusieurs modes de transmission doivent être pris en considération. Si les modes autosomiques dominants et hétérozygotes composites avaient déjà été décrits, le mode de transmission hétérozygote

oligogénique et l'apparition de variant *de novo*, notamment dans le cadre des BAV congénitaux, ne peuvent être exclus et apparaissent même très vraisemblables.

➤ *Limites des différentes approches et stratégies utilisées*

Plusieurs limites principales sont à souligner dans ces études :

- la technologie utilisée : l'utilisation du haut-débit nous permet de séquencer l'ensemble de l'exome ou des gènes candidats de nos patients. Ceci serait impossible sans les NGS mais le séquençage de certaines régions est difficile avec ces technologies. De plus, l'efficacité des systèmes de capture n'est pas totale. Il peut exister des zones faiblement couvertes et de piètre qualité, voire pas couvertes du tout et des variants potentiellement intéressants peuvent être manqués ;
- les filtres utilisés pendant l'analyse : on ne peut exclure l'élimination, par certains filtres se basant sur la qualité des variants par exemple, de variants d'intérêt. L'utilisation de filtres moins stricts pourrait permettre de les prendre en considération mais cela ajouterait également beaucoup de variants faux-positifs qui rendraient l'analyse plus compliquée ;
- le choix de ne s'intéresser qu'aux régions codantes du génome : certes il s'agit des régions les plus connues, les mieux décrites et les plus faciles à analyser mais on ne peut éliminer l'hypothèse de variants causaux intergéniques, non codants mais régulant l'expression de certains gènes par exemple ;
- seuls les variants intervenant dans un transcrit codant répertorié dans la base de NCBI 'RefSeq' ont été considérés. En effet, cette base recense tous les transcrits dont l'existence a été démontrée. Une seconde analyse prenant en compte les variants intervenant dans des transcrits prédits de la base Ensembl pourrait être effectuée.

➤ *Hypothèses étiologiques différentielles des TdC*

Dans une même famille, il n'est pas rare de rencontrer des patients atteints de plusieurs phénotypes, plus ou moins proches.

Ainsi plusieurs familles ont été décrites dans lesquelles des patients, chez qui un même variant potentiellement causal a été identifié, présentent des TdC et/ou d'autres arythmies comme un syndrome de Brugada, un syndrome du QT long, une dysfonction sinusale, une fibrillation atriale.... Comme pour les laminopathies, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces différences modérées de phénotypes au sein d'une même famille : des facteurs environnementaux, le sexe et l'âge du patient, des facteurs génétiques et/ou épigénétiques modulateurs ou encore l'apparition simultanée fortuite de ces pathologies (Kyndt et al. 2001; Grant et al. 2002; McNair et al. 2004; Probst et al. 2006; Six et al. 2008; Watanabe et al. 2008; Vorobiof et al. 2008; Stallmeyer et al. 2012; Hothi, Ara, et Timperley 2014).

A une échelle plus fine, dans le cadre des TdC isolés, il n'est pas rare de rencontrer au sein d'une famille, des patients atteints de TdC affectant la branche droite du faisceau de His ainsi que des patients chez qui la branche gauche, ou une hémibranche, est affectée. C'est notamment le cas des familles dont le phénotype correspond aux maladies de Lenègre et de Lev et souvent lié à un variant dans le gène *SCN5A* (Lenègre et Moreau 1963; Lenègre 1964; Lev 1964; Schott et al. 1999; Probst et al. 2003). Les mêmes hypothèses sont avancées pour tenter d'expliquer les différences phénotypiques observées. Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse permettent également de soutenir l'idée qu'en fonction de l'importance de l'effet des variants identifiés, la modulation sera plus ou moins importante, quelle qu'en soit sa cause. Ainsi, dans toutes ces familles dans lesquelles les TdC sont associés à des arythmies, on peut supposer que les variants identifiés ont un effet assez fort pour causer des troubles du rythme et/ou de la conduction, mais pas assez fort pour ne pas être modulés. Au contraire, dans le cas de la famille A dans laquelle le variant *LMNA*-p.E347K a été identifié, tous les patients atteints souffrent de TdC affectant spécifiquement la branche gauche, pourtant la moins fragile et il ne semble pas y avoir une grande variabilité phénotypique avec une atteinte débutant par un BAV1, puis l'atteinte de la branche gauche spécifique (HBAG puis HBAG + BP puis BBG) puis BAV3 (phénotype des PFHB de type 3). Dans ce cas, on peut supposer que l'effet du variant est suffisamment fort pour ne pas pouvoir être modulé de manière importante. Cependant, la présence d'un patient présentant le variant *LMNA*-p.E347K et un phénotype HBAG avec fibrillation atriale pourrait suggérer la présence d'un effet modulateur fort chez ce patient. Sa mère étant atteinte, la cause environnementale peut être exclue, l'âge et le genre du patient correspondant à plusieurs autres

patients atteints de la famille peuvent aussi l'être. Dans ce cas, seules l'apparition fortuite des deux pathologies ou l'intervention d'un ou plusieurs facteurs génétiques (ou épigénétiques) pourrait expliquer ce phénotype différent.

Ainsi, il semble exister, à plusieurs niveaux, une compétition de différents facteurs, génétiques ou non, menant au phénotype précis et spécifique de chaque patient.

➤ *Les voies de signalisations impliquées ne sont pas indépendantes*

Plusieurs voies *a priori* distinctes ont été évoquées dans les TdC (Tableau 33) et l'on peut supposer qu'en dépit du fait qu'ils se ressemblent d'un point de vue phénotypique avec l'apparition de TdC, les BAVd et les BAVc semblent correspondre à deux entités bien distinctes. Dans le cas des BAV dégénératifs, la pathologie semble due, au moins en partie, à une altération progressive des propriétés des protéines codées par les gènes dans lesquels des variants ont été identifiés. Au contraire, dans le cas des BAV congénitaux, la pathologie intervient très tôt dans la vie, voire *in utero*. On peut donc supposer que leurs étiologies, même si elles concernent quelquefois les mêmes voies physiopathologiques, sont différentes.

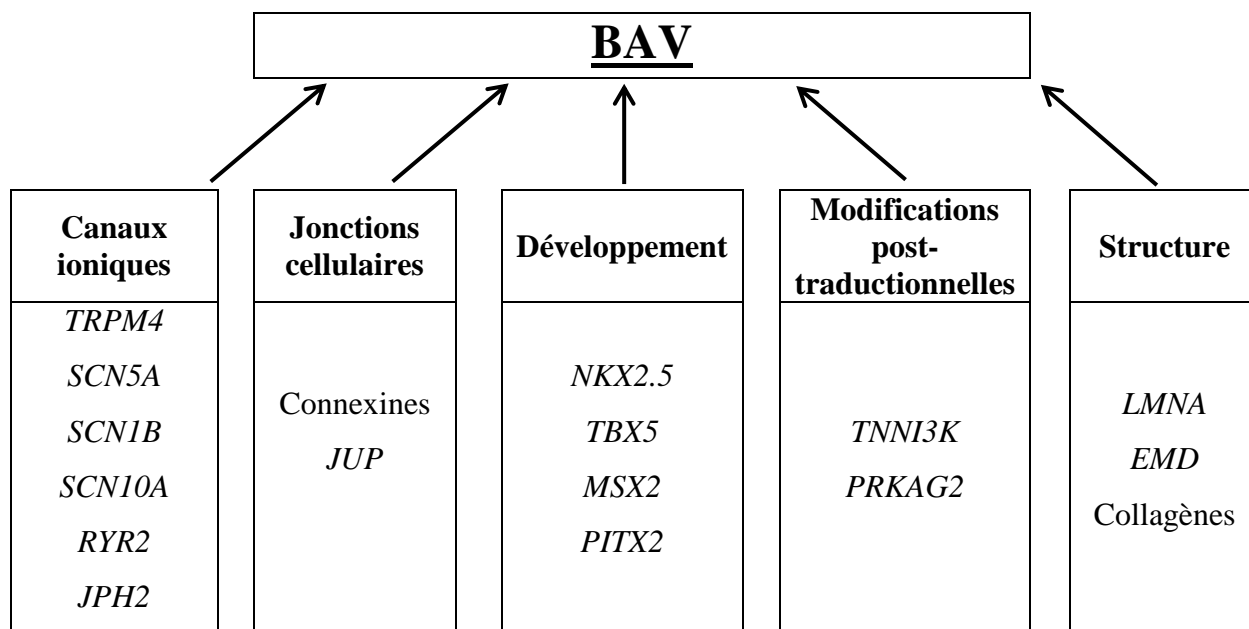


Tableau 33 – Tableau récapitulatif des voies physiopathologiques pouvant mener aux TdC

Dans le cas des BAVc, on peut envisager d'identifier plus de variants intervenant dans des gènes impliqués dans le développement tels que les connexines (GJA1, GJA5, GJC1) ou codant les facteurs de transcription impliqués dans la morphogenèse cardiaque (TBX5, MSX2, NKX2.5). Un variant délétère dans ces gènes pourrait effectivement avoir de graves conséquences qui se manifesteraient dès les premiers stades de développement cardiaque.

En revanche, dans le cadre des BAVd, on peut supposer que l'on trouvera plus de variants dans des gènes impliqués dans la structure cellulaire tels que *LMNA*, *EMD*, dans l'adhésion cellulaire tels que *JUP*, et dans la régulation du collagène, le phénomène de fibrose correspondant également à une altération progressive et dégénérative de cette régulation. Les protéines codées par ces gènes présentent effectivement des fonctions qui pourraient s'altérer avec le temps en cas de mutation délétère.

A l'échelle protéique, il a été suggéré que les deux canaux TRPM4 et Nav1.5 s'influencent l'un l'autre. L'hypothèse selon laquelle ils feraient partie de la même voie de signalisation, la principale activité du canal de TRPM4 pouvant être aussi de conduire les courants sodiques entrants lors de la dépolarisation des cellules cardiaques, a été proposée (Abriel et al. 2012; H. Liu et al. 2013; Kruse et Pongs 2014). De même, à l'échelle des voies de signalisation, certains résultats semblent accréditer la thèse selon laquelle certaines de ces voies s'influencent fortement et pourraient même n'en former qu'une unique.

En effet, les variants dans les gènes codant pour les canaux ioniques pourraient correspondre aux deux pathologies BAVc et BAVd, l'âge d'apparition et la vitesse de progression des TdC variant dans ce cas en fonction du type de mutation et de ses conséquences fonctionnelles (Benedetti et al. 2007; Meregalli et al. 2009). Les variants à effet fort, et notamment les variants *de novo* souvent plus délétères que les variants hérités (Veltman et Brunner 2012), impliqueraient l'apparition rapide des TdC et donc un phénotype de BAV congénital.

Les variants dans les gènes *SCN5A*, *SNTA1*, *SCN1B* et *SCN10A* semblent induire des phénotypes semblables de TdC non spécifiques. Cela n'est pas vraiment surprenant dans la mesure où il a été démontré que l'activité du premier était régulée par les trois autres (Gavillet et al. 2006; Watanabe et al. 2008; van den Boogaard et al. 2014).

De plus, le canal TRPM4 pourrait également intervenir dans la même voie en conduisant également les courants sodiques (Abriel et al. 2012; H. Liu et al. 2013; Kruse et Pongs 2014). Les variants dans le gène *TRPM4* semblent toutefois impliquer un phénotype des PFHB de type 1 correspondant à une atteinte plus spécifique de la branche droite, la plus fragile, associée à un

HBAG (Kruse et al. 2009; H. Liu et al. 2010). Ce phénotype plus précis pourrait éventuellement être dû à une expression des canaux TRPM4 plus importante dans la branche droite que dans la branche gauche, un canal TRPM4 altéré limitant alors préférentiellement la conduction dans cette branche.

Outre cette voie des canaux ioniques qui semble être la voie principale, plusieurs autres voies ont été proposées et ne semblent pas être très éloignées. Par exemple, la voie *LMNA-EMD* ne semble pas si éloignée de celle des canaux dans la mesure où des variants dans le gène *LMNA* peuvent induire des phénotypes semblables, qu'il s'agisse de troubles de la conduction (Famille A), du rythme – le séquençage à l'aide de la technologie HaloPlex de deux jumeaux présentant à la naissance un phénotype sévère de fibrillation atriale nous a en effet permis de mettre en avant l'intervention de la délétion *LMNA*-p.K114del *de novo* (données non fournies), ce que corrobore également le phénotype du patient hétérozygote composite (R331Q et E347K) atteint notamment de FA et CMD, décrit dans l'étude de Benedetti *et al.* (Benedetti et al. 2007) – ou autre (CMD). Une étude récente non publiée mais qui a fait l'objet d'une communication lors du congrès de la Heart Rhythm Society 2014, montre d'ailleurs que le variant *LMNA*-p.R545H semble induire une réduction significative du courant sodique I_{Na} (<http://ondemand.hrsonline.org/common/presentation-detail.aspx/15/34/1333/8546>). Des autopsies ont également montré une fibrose marquée et une métamorphose graisseuse du NSA, du NAV et du faisceau atrioventriculaire chez des patients porteurs de variants *LMNA* avec défauts de conduction (Fatkin et al. 1999; Arbustini et al. 2002; Lai et al. 2013). Une accumulation de collagène, des anomalies de la conduction et une diminution progressive de la fonction contractile cardiaque ont également été observées chez un modèle murin transfecté avec le variant humain p.E82K (Lu et al. 2010). Tous ces éléments concordent et vont dans le sens d'une grande similarité entre les gènes *SCN5A* et *LMNA*, et soulignent donc l'importance du gène *LMNA* dans la conduction cardiaque.

La voie impliquant les gènes du développement est également liée à la voie *SCN5A*. En effet, il a été montré qu'un polymorphisme intervenant au niveau d'une séquence amplificatrice du gène *SCN10A* pouvait affecter le site de fixation des facteurs de transcription TBX3/TBX5 et modulant ainsi l'expression et l'activité cardiaque de *SCN5A* (Arnolds et al. 2012; van den Boogaard et al. 2012; van den Boogaard et al. 2014). La mise en place du réseau de conduction cardiaque est régie par l'interaction de plusieurs partenaires protéiques codés par des gènes du développement (Alk3, Bmp2, Msx2, Nkx2.5, Tbx2, Tbx3, Tbx5). Ils permettent la formation du NAV et du NSA ainsi que des voies de conduction des 4 cavités cardiaques en réprimant la transcription des gènes du développement des chambres cardiaques contenant une T-box, dont

SCN5A, *GJA5* et *GJA1* (Basson et al. 1997; Harris, Gourdie, et O'brien 2005; Christoffels et Moorman 2009). La voie impliquant les jonctions communicantes intercellulaires semble donc également liée. Il a d'ailleurs été montré que la mutation *LMNA*-p.E82K impliquant une accumulation de collagène dans un modèle murin (Lu et al. 2010) diminuait également significativement l'expression de la connexine 43 et altérait sa localisation dans le cœur (L. Sun et al. 2010).

Ainsi, toutes les voies semblent interconnectées et l'apparition de TdC suite à la mutation d'un variant impliqué dans une des voies évoquées peut dérégler plusieurs autres voies, facilitant l'apparition de la pathologie.

➤ *Perspectives générales*

Dans le travail présenté dans le projet 2 de cette thèse, seuls les 163 gènes du kit HaloPlex ont été séquencés. Le coût du séquençage HaloPlex d'un patient sur le kit que l'on a conçu est de 150 € environ, capture et séquençage compris. D'autres gènes peuvent être impliqués mais il serait très coûteux, aujourd'hui en tout cas, de cribler l'ensemble de l'exome de tous ces patients. Les technologies actuelles ne cessent de se développer et l'on arrive maintenant au génome à 1000 \$. On peut donc espérer que, dans quelques temps, avec l'avènement de nouvelles technologies, l'on arrivera au génome à 100 \$. Les études réalisées dans ce projet sur un nombre limité de gènes (163 gènes candidats du kit HaloPlex) pourront alors l'être sur le génome entier, lorsqu'il sera mieux compris et mieux annoté.

Au niveau phénotypique, chaque patient est unique. La prise en compte du fond génétique et des facteurs environnementaux, liés à des mécanismes épigénétiques, jouant un rôle plus ou moins important qui reste à déterminer, semble nécessaire pour expliquer la grande diversité phénotypique observée.

Depuis quelques années, la notion de médecine personnalisée avec des pratiques médicales (diagnostic et choix de la procédure thérapeutique) sur mesure appropriées au génome du patient est apparue. Mais, malgré les interactions toujours plus importantes entre les médecins et les chercheurs, malgré les progrès technologiques et les progrès dans les domaines de la génétique et la génomique ayant permis d'améliorer nos connaissances des différentes pathologies et la stratification du risque, la médecine personnalisée ne semble pas encore être pour demain... Mais en 1995, le séquençage du génome entier était-il « pour demain » ?

D. ANNEXES

I. Matériel et méthodes

I.1. Bio-collections utilisées

Les ADN utilisés font partie de biocollections gérées par l'équipe Biocollection de l'institut du thorax et par le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nantes. A ce jour, plus de 1700 prélèvements sont liés aux TdC, dont 134 cas index atteints de BAV congénital et 453 cas index atteints de BAV dégénératif. Le consentement éclairé et validé par le comité d'éthique local a été obtenu pour chaque patient.

I.2. Séquençage capillaire

La méthode utilisée est le séquençage par terminaison de chaîne (selon la méthode de Sanger) avec le « Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » selon les instructions du fournisseur, puis migration électrophorétique sur séquenceur automatique 48-capillaires 3730 DNA Analyzer (Life technologies). Les séquences ont été analysées avec le logiciel SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) par une inspection visuelle.

I.3. Séquençage NGS

Lors d'une expérience de séquençage NGS, il y a deux phases :

- la première consiste à préparer ce que l'on appelle les « bibliothèques ». Il s'agit en fait de la préparation de l'ADN de nos patients en fonction de l'expérience que l'on veut réaliser. Il peut ainsi s'agir de l'ensemble de l'ADN dans le cadre d'un séquençage de génomes entiers, de l'ensemble des parties codantes de l'ADN dans le cadre d'un séquençage d'exomes, ou de gènes spécifiques dans le cadre d'un séquençage ciblé. Les ADN subissent de nombreuses opérations (variables en fonction du protocole choisi) parmi lesquelles une étape de fragmentation, une étape de capture (pas pour le séquençage du génome), plusieurs étapes de purification et d'amplification.

- la seconde est le séquençage proprement dit avec l'utilisation de l'HiSeq1000 d'Illumina.
- *Préparation de la librairie pour un séquençage d'exome (technologie SureSelect d'Agilent)*

Pour la capture et le séquençage des parties codantes du génome, nous avons utilisé le kit « SureSelect Human All Exon » d'Agilent (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Au cours de cette thèse, plusieurs versions de ce kit ont été utilisées. Les différences étant mineures, seule la cinquième et dernière version sera décrite. Elle permet de capturer 45 Mb de séquences génomiques comprenant 21 522 gènes. Le protocole « SureSelect^{XT} Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library » fourni par Agilent et dont une version est disponible sur le site http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G7530-90000_SureSelect_IlluminaXTMultiplexed_1.8.pdf a été scrupuleusement respecté. Je vais en décrire ici les principales étapes.

Pour cette technique 3 µg d'ADN par patient sont préalablement dégradés par sonication à l'aide du sonicateur Bioruptor (Diagenode, Denville, NJ, USA). Cette sonication dure une centaine de minutes, le sonicateur envoyant des ultrasons intenses pendant 30 secondes toutes les minutes, et permet d'obtenir des fragments de 150 à 200 pb. La dégradation est vérifiée à l'aide d'une TapeStation 2200 d'Agilent et est suivie d'une première étape de purification utilisant un système de billes magnétiques SPRI (Solide Phase Reversible Immobilisation).

Les fragments d'ADN subissent ensuite plusieurs étapes alternant avec des étapes de purification consistant à en réparer les extrémités, à phosphoryler l'extrémité 5', à ajouter un nucléotide A en 3' et à ajouter un adaptateur Illumina à chacune des deux extrémités (Figure 45) (un adaptateur « P5 » à une extrémité et un adaptateur « P7 » à l'autre). Ces adaptateurs permettront ensuite la fixation des fragments d'ADN sur la flow-cell lors du séquençage (voir la partie D.I.4 – Séquençage haut-débit – Illumina page 164). La librairie est ensuite amplifiée puis validée et quantifiée à l'aide de la TapeStation 2200 d'Agilent. Les fragments obtenus doivent alors avoir une taille entre 225 et 275 pb.

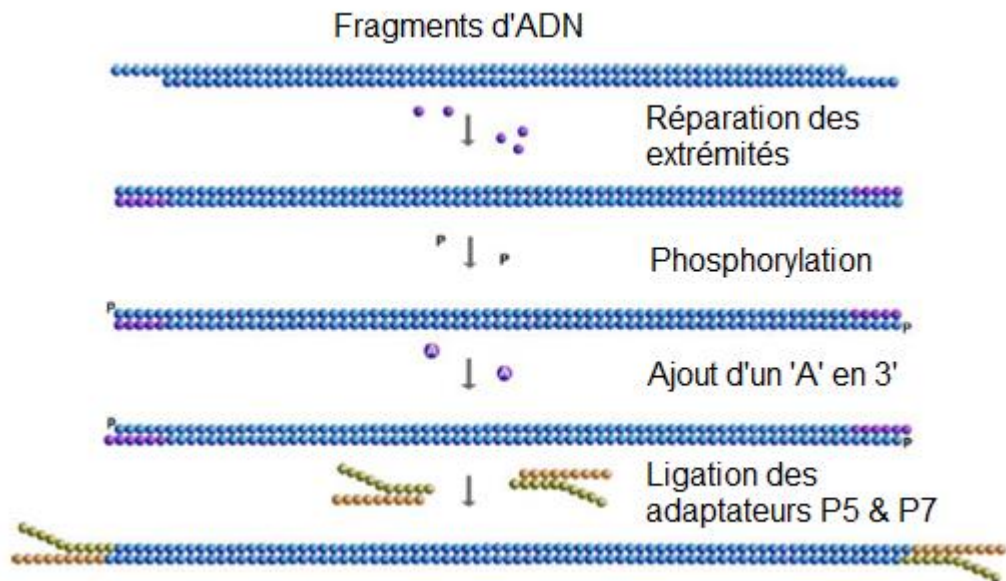


Figure 45 – Schéma de la préparation de la librairie pour un séquençage d'exome
L'ADN est fragmenté puis traité afin d'ajouter les adaptateurs P5 et P7 aux extrémités libres.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

La préparation d'ADN est ensuite lyophilisée dans un vacuum repris dans de l'eau ultra pure afin d'obtenir 3.4 µL d'ADN à 221 ng/µL. Les régions codantes vont alors ensuite être capturées à l'aide de sondes d'ARN biotinylées complémentaires des régions codantes de l'ADN. Cette étape de capture est réalisée pendant 24h dans un thermocycleur à 65°C. La capture des régions codantes est ensuite effectuée en utilisant des billes magnétiques sur lesquelles sont fixées des protéines de streptavidine (Figure 46). Une série de 3 lavages est réalisée et les billes sont enfin resuspendues dans 30 µL d'eau ultra pure.

Une étape d'amplification est ensuite réalisée durant laquelle se déroule l'ajout des index, séquences « code-barres » qui vont ensuite permettre d'identifier la correspondance entre une séquence et un patient. Cela permet de réaliser des multiplexages au cours desquels plusieurs individus sont séquencés simultanément sur la même ligne.

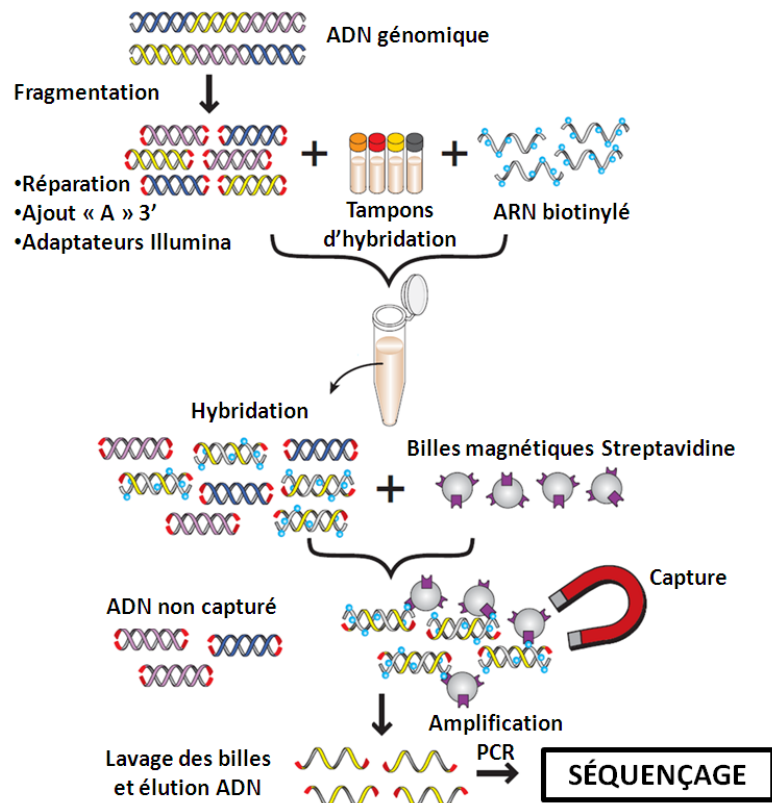


Figure 46 – Représentation du principe de capture des régions codantes avant séquençage haut-débit.

Des oligonucléotides d'ARN biotinylés complémentaires des séquences codantes du génome sont utilisés afin de les hybrider. Elles sont isolées grâce à l'utilisation de billes magnétiques sur lesquelles sont fixées des protéines de streptavidine. Des séries de lavages et une amplification finale permettent ensuite l'obtention d'une librairie prête à être séquencée.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Agilent (<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=3083>)

Enfin, une ultime étape de purification précède la quantification et la qualification des librairies à l'aide de la TapeStation 2200 d'Agilent (quantité et qualité) et par qPCR à l'aide du LightCycler 480 de Roche (F. Hoffmann-La Roche, Bâle, Suisse) (quantité). Les fragments finaux doivent être compris entre 300 et 400 nucléotides. L'étape de quantification est très importante afin de pouvoir séquencer approximativement la même quantité d'ADN de chaque patient lors du multiplexage. Dans le cas contraire, si l'ADN d'un patient est en excès, on risque d'obtenir une qualité de séquençage faible pour les autres patients.

➤ *Préparation de la librairie pour du séquençage ciblé (technologie HaloPlex d'Agilent)*

Pour la capture et le séquençage de régions ciblées du génome, il nous a été tout d'abord nécessaire de designer un kit sur le site internet dédié d'Agilent (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/index.htm>). Un kit HaloPlex comprenant 163 gènes d'intérêt a été conçu. Il est présenté en annexe D.II à la page 190.

Lors de la préparation des librairies, les échantillons d'ADN génomique sont tout d'abord digérés par 8 cocktails différents d'enzymes de restriction pendant 30 minutes à 37°C. Une étape de vérification utilisant la TapeStation 2200 d'Agilent permet de vérifier sur un ADN contrôle la qualité de la digestion.

Des sondes biotinylées complémentaires des régions d'intérêt que l'on a indiquées lors du design sont ensuite utilisées. Elles sont en réalité composées de deux extrémités complémentaires des extrémités des fragments digérés. La capture des séquences d'intérêt dure 3h à 54°C et implique donc la formation de molécules circulaires (Figure 47) non ligaturées.

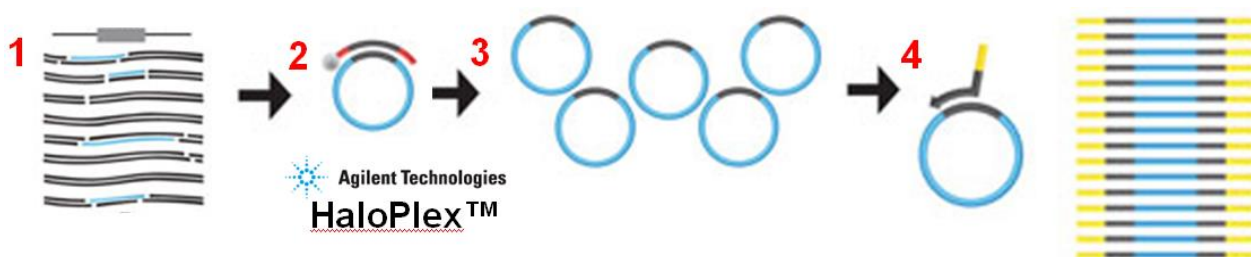


Figure 47 – Représentation des étapes du système de capture et d'enrichissement HaloPlex

1 – L'ADN est digéré par des cocktails d'enzymes de restriction. 2 – Les fragments obtenus sont ensuite hybridés avec des adaptateurs biotinylés spécifiques des régions digérées. L'inclusion des séquences « code barre » est effectuée à cette étape. 3 – L'ADN biotinylés est ensuite capturé grâce à des billes magnétiques couplées à la streptavidine. 4 – L'ADN circulaire ainsi récupéré est amplifié par PCR, permettant d'obtenir un nombre d'amplicon conséquent pour chaque fragment d'intérêt.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Agilent

<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=3081> <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=30>

Un index est également ajouté lors de cette étape. De même que pour le séquençage de l'exome, l'addition d'une séquence « code barre » permet de pouvoir réaliser un multiplexage, c'est-à-dire le séquençage simultané de l'ADN de plusieurs patients, tout en sachant à quel patient appartient tel fragment.

L'ADN biotinylé est ensuite capturé et purifié par une série de lavages-rinçages grâce à des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Ensuite, une étape de 10 minutes à 55°C permet la ligation des fragments et leur complète circularisation.

L'ADN circulaire résultant est ensuite amplifié par PCR. Cette amplification permet d'ajouter des adaptateurs Illumina « P5 » et « P7 » qui vont permettre à la librairie ainsi formée de se fixer sur la flow-cell (voir la partie D.I.4 – Séquençage haut-débit – Illumina page 164) lors du séquençage haut-débit. Cette étape linéarise également les fragments d'ADN.

Ces derniers sont ensuite purifiés en utilisant un système de billes magnétiques SPRI (Solide Phase Reversible Immobilisation). Une ultime étape de quantification et qualification des librairies à l'aide de la TapeStation d'Agilent (quantité et qualité) et par qPCR à l'aide du LightCycler 480 de Roche (quantité), permet de vérifier que les fragments ont une taille approximative comprise entre 175 et 625 pb et de quantifier les librairies. Là aussi, la quantification est une étape cruciale avant le séquençage afin d'éviter la surévaluation d'un patient par rapport aux autres et de permettre la couverture homogène des différents échantillons.

I.4. Séquençage haut-débit – Illumina HiSeq 1000

Une fois les librairies préparées, elles sont prêtes à être séquencées. Le séquençage haut-débit a été effectué à l'aide d'un séquenceur HiSeq 1000 d'Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA). Ce dernier permet de séquencer des fragments de 100 pb appelés « reads ».

Les librairies produites sont injectées dans une flow-cell, lame de verre sur laquelle va se dérouler le séquençage (Figure 48 - A). Les fragments « P5 » et « P7 » permettent de fixer les fragments d'ADN préparés sur la flow-cell qui est tapissée de sondes complémentaires de ces séquences.

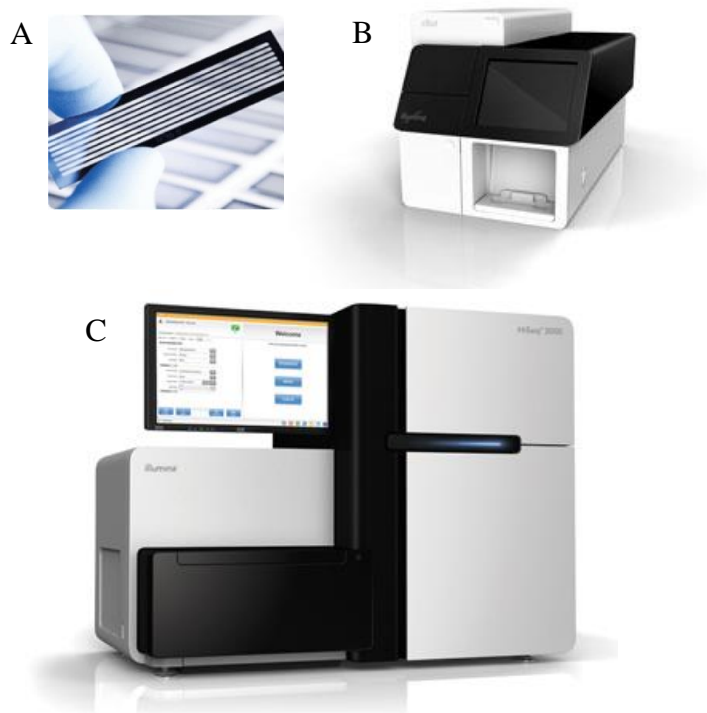


Figure 48 – Matériel utilisé pour le séquençage haut-débit

A – La flow-cell. Elle fait la taille d'une lame de verre standard. C'est sur les huit lignes qui la composent que va se dérouler l'étape d'amplification par pont ainsi que l'étape de séquençage. B – La cBot dans laquelle se déroule la première étape d'amplification par ponts. C – L'HiSeq 1000 dans lequel se déroule le séquençage par synthèse.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

La flow-cell est tout d'abord introduite dans une cBot (Figure 48 - B), machine permettant l'étape d'amplification « par ponts » de 35 cycles. Cette étape permet d'amplifier chaque fragment hybridé et de former ainsi des clusters (groupes d'un seul et même fragment). Un cluster correspond à environ 1000 molécules d'ADN identiques regroupées les unes juste à côté des autres (Figure 49). Ces clusters permettent de fournir, au moment du séquençage, un signal suffisamment fort pour détecter l'ajout de nucléotide. Lors d'un run, il est possible de générer jusqu'à 1,5 milliards de clusters avec une densité optimale d'approximativement 800 000 clusters/mm². L'injection d'une trop grande concentration de la préparation d'ADN peut engendrer un chevauchement des clusters qui rendra les séquences illisibles, d'où l'importance des étapes de quantifications grâce à la TapeStation 2200 d'Agilent et par qPCR, à l'aide du LightCycler 480 de Roche, à la fin des étapes de préparation des bibliothèques. Dans ce cas, les séquences obtenues ne sont pas utilisables et sont écartées de l'analyse.

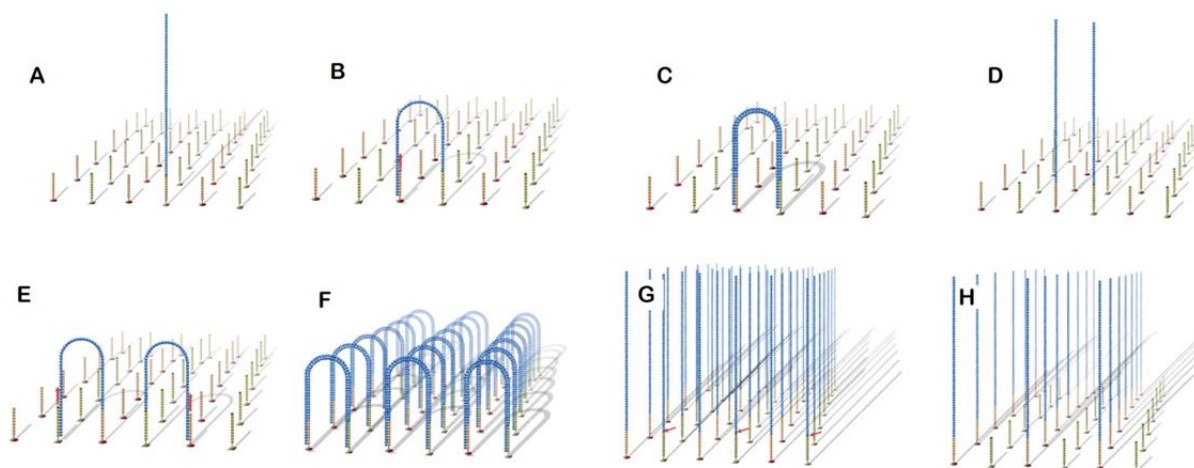


Figure 49 – Génération des clusters lors du séquençage Illumina

A – Génération d'un brin fixé sur la flow-cell suite à l'hybridation d'un fragment d'ADN de la librairie sur les sondes complémentaires. B – Le fragment « P7 » ou « P5 » se fixe à la sonde complémentaire lors du premier cycle en formant un « pont ». C – Un brin complémentaire fixé à côté du brin original est synthétisé. D – Les deux brins sens et anti-sens sont séparés. E, F – Répétition de cette procédure pendant 35 cycles. G – Clivage des fragments anti-sens à la base de la séquence adaptatrice de manière à ne lire uniquement, dans un premier temps, que les fragments sens. H – La constitution des clusters d'environ 1000 brins identiques est terminée et le séquençage peut débiter.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

Les fragments d'ADN constituant la librairie sont injectés dans la flow-cell recouverte de sondes complémentaires des adaptateurs « P5 » et « P7 ». Le flux est calculé pour que l'on observe une hybridation statistiquement homogène des fragments d'ADN sur la flow cell, par complémentarité des sondes fixées sur la flow-cell avec les adaptateurs « P5 » et « P7 ». Une première étape d'amplification et de lavage permet ainsi d'obtenir des brins répartis de manière homogène et fixés sur toute la flow-cell (Figure 49 – A).

Dans un premier temps, les brins sens sont conservés tandis que les brins anti-sens sont clivés. Ces brins vont ensuite se pencher et par complémentarité de leur extrémité libre avec les sondes fixées sur la flow-cell, un « pont » se forme (Figure 49 – B). Une étape d'amplification permet la génération d'un brin complémentaire fixé juste à côté du brin original (Figure 49 – C). Les deux brins sont ensuite séparés (Figure 49 – D) et ces étapes se répètent 35 fois (Figure 49 – E, F, G) jusqu'à la formation complète du cluster. La dernière étape consiste à ne garder que les brins sens et à cliver les brins anti-sens (Figure 49 – H).

L'étape suivante correspond au séquençage proprement dit. La flow-cell est alors retirée de la cBot et insérée dans l'HiSeq (Figure 48 - C). Chaque cycle réalisé au moment du séquençage va correspondre à la lecture d'un nucléotide. En d'autres termes, pour la lecture de 100 nucléotides, 100 cycles sont nécessaires. A chaque cycle est injectée une solution comprenant les quatre nucléotides, chacun étant bloqué et marqué à l'aide d'un fluorochrome spécifique. Après incorporation du nucléotide, le milieu est rincé permettant ainsi d'éliminer un maximum de bruit de fond généré par les fluorochromes non incorporés et d'optimiser la photo instantanée réalisée par une caméra. Avec cette photo, il est ensuite possible de déterminer pour chaque cluster quel nucléotide vient d'être ajouté. Une fois cette lecture terminée, les fluorochromes sont clivés ce qui permet débloquent également le nucléotide qui vient d'être incorporé. Un nouveau nucléotide peut alors se fixer et un nouveau cycle peut ensuite avoir lieu (Figure 50).

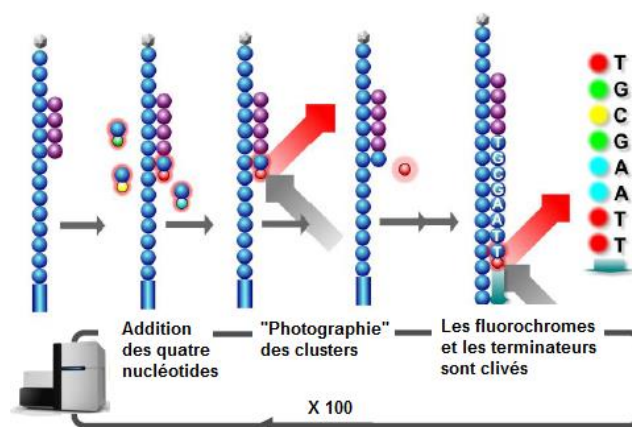


Figure 50 – Réaction de séquençage de la technologie Illumina.

Lors d'un cycle, l'ADN polymérase incorpore un nucléotide marqué et bloqué par un fluorochrome. La fluorescence est ensuite détectée puis le fluorochrome est clivé permettant ainsi la fixation d'un nucléotide supplémentaire. Cent un cycles sont ainsi effectués pour obtenir un « read » de 100 bases.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

Les séquences réalisées pendant ces travaux de thèse l'ont été en « *paired-end* ». Cela signifie que les fragments d'ADN constituant la librairie (ou « insert ») sont séquencés dans un sens (les 100 premiers cycles) puis dans l'autre. Ainsi, une fois les 100 premiers cycles effectués, une étape d'amplification par ponts débute, ce qui permet de produire pour chaque brin sens, un brin anti sens complémentaire. Les brins sens sont ensuite éliminés par clivage à la base de la séquence adaptatrice. Cette étape dite « *flip-flap* » n'aura eu pour conséquence que d'inverser les brins : si l'extrémité « P7 » était en haut, c'est maintenant leur extrémité « P5 » qui l'est. Puis le

séquençage de 100 cycles reprend comme décrit précédemment. Cela permet, pour un insert d'ADN de 300 pb de séquencer 100 pb en 3' puis 100 pb en 5' (Figure 51).

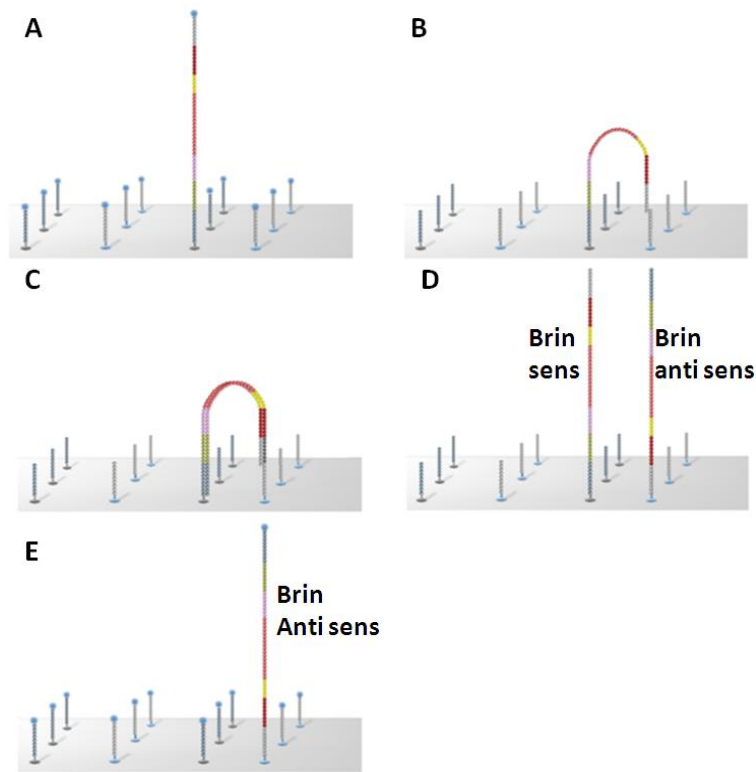


Figure 51 – Etape de « flip-flap » pour le séquençage des brins anti-sens par la technologie Illumina (*paired-end*)

A – Les brins sens ayant été séquencés sont organisés en cluster (ici, un seul brin représente le cluster). B – Les brins d'ADN d'un cluster se courbent et la séquence adaptatrice située sur l'extrémité libre se fixe à sa sonde complémentaire. C – Le brin complémentaire est synthétisé. D – Le brin sens est clivé à la base la séquence adaptatrice. E – Seuls les brins anti-sens sont présents sur la flow-cell permettant le séquençage de l'autre partie de l'insert.

Modifié d'après des documents issus du site internet d'Illumina (www.illumina.com/)

Les séquences des 100 pb ainsi obtenues, appelées « reads » sont ensuite alignées sur le génome de référence humain hg19/HGRC37. Cet alignement est facilité par le fait que les reads sont couplés deux à deux après un run *paired-end*. On sait en effet que les deux reads d'un couple doivent être alignés relativement proche l'un de l'autre (100-200 pb) sur le génome de référence pour être pris en compte et conservés pendant l'alignement.

Il est alors possible de procéder à la détection de variations génétiques en comparant les bases séquencées et alignées aux bases du génome de référence correspondantes.

I.5. Analyses bioinformatiques primaire et secondaire

Lors du séquençage haut-débit sur plateforme Illumina, les fichiers images enregistrés par la caméra sont convertis à chaque cycle en fichier BCL '.bcl' permettant d'identifier la base ajoutée au niveau de chaque cluster en y associant un score qualité. Des fichiers FASTQ '.fq' sont ensuite générés à partir des fichiers BCL à l'aide du logiciel CASAVA d'Illumina. Ce type de fichier permet de lister les reads séquencés et les scores qualités associés à toutes les bases qui les composent. Chaque séquence est alignée sur le génome humain de référence hg19/HGRC37 (human_g1k_v37.fasta) grâce à l'outil BWA qui associe également un score de qualité à chaque alignement réalisé. Les fichiers de sortie sont au format '.aln'.

Un algorithme de BWA, SAM PE, est ensuite utilisé. Il permet, à partir des fichiers '.fq' et '.aln' de générer des fichiers SAM '.sam' (Sequence Alignment/Map) qui comportent beaucoup d'informations pour chaque paire de reads R1 et R2 : son identifiant, sa séquence, sa qualité d'alignement, sa position indexée sur le génome de référence, toutes ces mêmes informations pour le read partenaire '*paired-end*' correspondant, la taille du fragment entre ces deux reads... Une nouvelle version de BWA, BWA-MEM, permet de s'affranchir des fichiers ALN et de générer directement les fichiers SAM à partir des FASTQ.

Ces fichiers SAM sont ensuite compressés en fichiers BAM '.bam' (Binary Alignment/Map), illisibles par l'homme, afin de pouvoir être compilés plus rapidement par l'outil informatique.

Les reads BAM sont ensuite triés et hiérarchisés sur le génome. Les reads identifiés comme dupliqués sont ensuite annotés avec Picard / MarkDuplicates. Lorsque la fragmentation du génome est réalisée avant séquençage par sonication (pour le séquençage d'exome notamment), la probabilité d'obtenir deux séquences alignées exactement de la même façon sur le génome est extrêmement faible. Par défaut, les algorithmes de détection ne prennent en compte dans ce cas que l'un des duplicons. Pour des systèmes de dégradation impliquant l'utilisation d'enzyme de restriction (technologie Haloplex), les séquences étant répétées un grand nombre de fois aux mêmes positions, cet outil doit être enlevé.

Les reads sont ensuite réalignés autour des insertions / délétions spécifiquement dans les régions d'intérêt. Une re-calibration des reads BAM est ensuite effectuée grâce à GATK. Cela permet d'affiner les scores de qualité d'alignement ou de '*mapping*'.

De manière à évaluer l'efficacité du séquençage, différents paramètres peuvent être considérés après alignement des séquences sur le génome de référence. Dans le cas de l'utilisation d'un

système d'enrichissement, on peut par exemple évaluer le pourcentage de séquences alignées dans les régions théoriquement capturées (ON target reads) ainsi que le pourcentage de séquences alignées dans les régions non capturées (OFF target reads). La qualité d'alignement des séquences fournie par BWA est également un paramètre à prendre en compte lors du contrôle qualité du séquençage.

La détection des variants (« variant calling ») est réalisée grâce aux deux algorithmes Samtools (H. Li et al. 2009) et GATK (McKenna et al. 2010) et un fichier VCF '.vcf' (Variant Call Format) est généré (Danecek et al. 2011) pour chaque patient par chacun de ces deux algorithmes. Il s'agit de fichiers tabulaires listant, pour le(s) patient(s) en question, l'ensemble des variants détectés. Une ligne correspond à un variant et plusieurs informations relatives à chaque variant sont disponibles : le chromosome sur lequel il intervient, sa position génétique, son éventuel identifiant, l'allèle de référence, l'allèle alternatif observé, la qualité du variant, le statut hétérozygote ou homozygote du patient... Un paramètre de Samtools permet de ne conserver que les reads pour lesquels le read partenaire '*paired-end*' est aligné. Pour le traitement des données HaloPlex, du fait des coupures enzymatiques liées à cette technologie et parce que l'alignement n'est réalisé que sur les régions cibles, il existe de nombreux reads partenaires manquants. Ce paramètre doit donc être désactivé pour permettre l'utilisation des reads orphelins (R1 aligné, R2 non).

Les variants sont ensuite annotés en utilisant deux algorithmes : VEP pour « *Variant Effect Predictor* » et SnpEff. Cette annotation, basée sur la base de données d'Ensembl⁵, permet de connaître l'effet du variant nucléotidique (prédiction du caractère délétère ou silencieux de la variation, variant synonyme ou non...) et ce sur l'ensemble des transcrits référencés dans cette base et dans lesquels intervient le variant en question.

Les fichiers VCF sont ensuite annotés et plusieurs informations sont ajoutées dans le champ 'INFO'. A l'aide des données du projet 1000 Genomes (1000 Genomes phase 1 - 379 individus d'origine européenne, version intégrée v3, téléchargée de <ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/vol1/ftp/release/20110521>) et du projet EVS pour « *Exome Variant Server* » (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) - 4300 individus d'origine européenne, version ESP6500SI-V2, téléchargée de <http://evs.gs.washington.edu/EVS>), la fréquence allélique dans la population générale européenne de chaque variation génétique détectée est ajoutée. Ces fichiers sont également annotés avec les scores de conservation GERP

⁵ Ensembl est un projet commun de l' 'European Bioinformatics Institute' (EMBL – EBI) et du 'Wellcome Trust Sanger Institute' dont le but est de développer un système informatique permettant l'annotation automatique de génomes eucaryotes.

pour « *Genomic Evolutionary Rate Profiling* » (Davydov et al. 2010). Ces scores permettent de quantifier la conservation nucléotidique inter-espèce et peuvent être un outil potentiel dans la priorisation de variants (Pollard et al. 2010). Les prédictions des algorithmes SIFT (Kumar, Henikoff, et Ng 2009) et PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2010) sur le potentiel pathogène des variants faux-sens au niveau de la structure et de la fonction protéique ont également été ajoutées. Ces 2 scores sont compris entre 0 et 1 et un variant faux-sens est prédit délétère s'il a un score proche de 0 pour SIFT et s'il a un score est proche de 1 pour PPH-2.

I.6. Analyse bioinformatique tertiaire

L'analyse bioinformatique tertiaire consiste à choisir et à appliquer des filtres basés notamment sur les bases de données disponibles afin de d'identifier le ou les variant(s) intéressant(s) parmi tous ceux listés dans le fichier VCF.

A titre d'exemple, pour une analyse du séquençage de l'exome d'un patient, un fichier VCF⁶ brut, issu de l'analyse secondaire et sans aucun filtre de qualité, peut contenir jusqu'à plus de 100 000 variants, dont la majorité sont des faux-positifs. La difficulté consiste à choisir et utiliser les bons filtres en fonction de plusieurs critères qu'il faut hiérarchiser (rareté de la pathologie, mode de transmission et mécanismes physiopathologiques supposés...), afin de retrouver le ou les quelques variant(s) qui nous intéresse(nt).

Ceci peut être réalisé grâce à des lignes de commande ou grâce à l'outil Knime4Bio développé par notre équipe (Lindenbaum et al. 2011), qui permet de s'en affranchir. L'utilisateur doit seulement choisir des petite boîtes, ou « nœuds », chacune réalisant une action précise comme filtrer les variants, les trier... Les nœuds mis les uns à la suite des autres constituent ainsi un « workflow » (Figure 52).

Comme c'est illustré sur la Figure 52, tous les workflows construits et utilisés traitent à la fois les fichiers VCF générés par GATK et ceux générés par Samtools c'est pourquoi la première partie de ces workflows (la partie de gauche) est dédoublée : les nœuds formant la partie supérieure traitent les fichiers VCF de GATK et les nœuds formant la partie inférieure traitent les fichiers VCF de Samtools.

⁶ VCF pour *variant call format* : il s'agit d'un format de fichiers créé pour le projet 1000 Genomes et collectivement adopté par la suite par la communauté scientifique. Ces fichiers sont générés lors de l'ultime étape de l'analyse secondaire bioinformatique des données issues d'un run NGS et listent l'ensemble des variants détectés (Danecek et al. 2011).

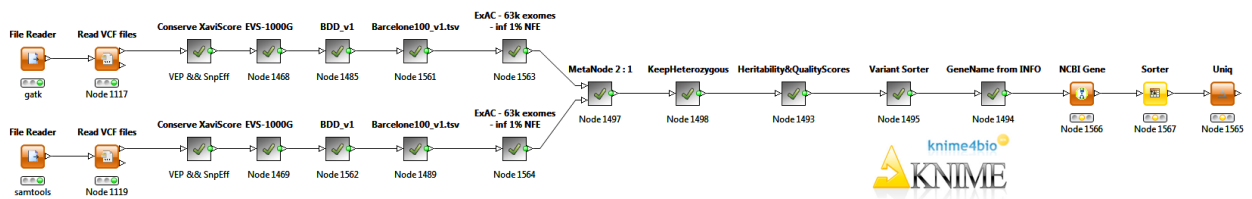


Figure 52 – Exemple de workflow Knime

Ce workflow a été utilisé dans le traitement des données issues du séquençage de l'exome de différents membres d'une même famille

Les workflows utilisés lors de cette thèse et décrits ci-dessous sont optimisés pour des fichiers VCF générés en « *single-calling* ». Il est en effet possible de générer, lors de l'analyse bioinformatique secondaire, des fichiers VCF pour plusieurs patients, en « *multi-calling* », mais, dans le cas de notre étude, nous avons choisi de générer un fichier VCF par patient.

Suite à divers tests que l'on a réalisés, nous avons choisi de nous intéresser aux variants détectés par GATK et par Samtools avec une qualité minimale de 25 pour Samtools. En effet, la majorité des variants détectés seulement par l'un des deux algorithmes présentent une qualité faible et sont très souvent des faux-positifs (Scouarnec et al. 2015).

Au cours des différentes analyses réalisées, seuls les variants annotés “transcript_ablation” (SO:0001893), “splice_donor_variant” (SO:0001575), “splice_acceptor_variant” (SO:0001574), “stop_gained” (SO:0001587), “frameshift_variant” (SO:0001589), “stop_lost” (SO:0001578), “initiator_codon_variant” (SO:0001582), “inframe_insertion” (SO:0001821), “inframe_deletion” (SO:0001822), “missense_variant” (SO:0001583), “transcript_amplification” (SO:0001889), “splice_region_variant” (SO:0001630), “incomplete_terminal_codon_variant” (SO:0001626), ou “coding_sequence_variant” (SO:0001580) sur un des transcrits de la base d'Ensembl par VEP et/ou SnpEff sont retenus.

Les variants passant tous les filtres sélectionnés ont été analysés individuellement et tous ceux qui n'interviennent pas dans un transcrypt codant recensé dans la base de NCBI (*RefSeq Genes*), qui regroupe l'ensemble des transcrits dont l'existence a été démontrée, ont été éliminés de l'analyse.

➤ *Workflow Knime pour les analyses familiales*

Ce workflow a été utilisé dans une approche familiale de séquençage d'exomes. Quatre à cinq patients atteints de formes sévères de BAVd ont été sélectionnés dans quatre familles afin d'en séquencer les exomes. Le séquençage a été réalisé au CRG à Barcelone en 2011 par l'équipe de Xavier Estivill. L'objectif est d'identifier un variant rare (<1 % dans la population européenne) voire novel⁷, partagé par les 4 ou 5 patients atteints séquencés d'une même famille.

La première étape de ce workflow consiste à lire les fichiers VCF de GATK (partie supérieure) et de Samtools (partie inférieure) de tous les patients grâce aux deux premiers nœuds 'File Reader' et 'Read VCF Files' (Figure 53).

La deuxième étape permet de mettre en place un premier filtre grâce au nœud 'Variants Délétères' afin de ne conserver que les variants prédits délétères par l'un des deux algorithmes VEP ou SnpEff au moins.

Les 4 nœuds qui suivent permettent d'interroger des bases données pour réaliser des filtres sur la fréquence des variants :

- Le premier, 'EVS – 1000G', permet d'interroger les bases d'Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) - 4300 individus d'origine européenne, version ESP6500SI-V2, téléchargée de <http://evs.gs.washington.edu/EVS>) et du projet 1000 Genomes (1000 Genomes phase 1 - 379 individus d'origine européenne, version intégrée v3, téléchargée de <ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/vol1/ftp/release/20110521>). Comme indiqué en annexe, au paragraphe D.I.5 – Analyses bioinformatiques primaire et secondaire page 169, ces bases sont interrogées en amont, lors de l'analyse bioinformatique secondaire, pendant la génération des VCF. Les fréquences EVS et 1000G des variants dans la population européenne sont alors ajoutées dans le champ 'info' du fichier VCF. Ce nœud permet donc de filtrer les variants pour ne conserver que ceux qui sont retrouvés dans moins de 1 % de la population européenne séquencée par EVS et par 1000G ;

⁷ Un variant novel est un variant non répertorié, inconnu des bases de données, et pour lequel aucune donnée de fréquence n'est disponible. Un tel variant est probablement extrêmement rare.

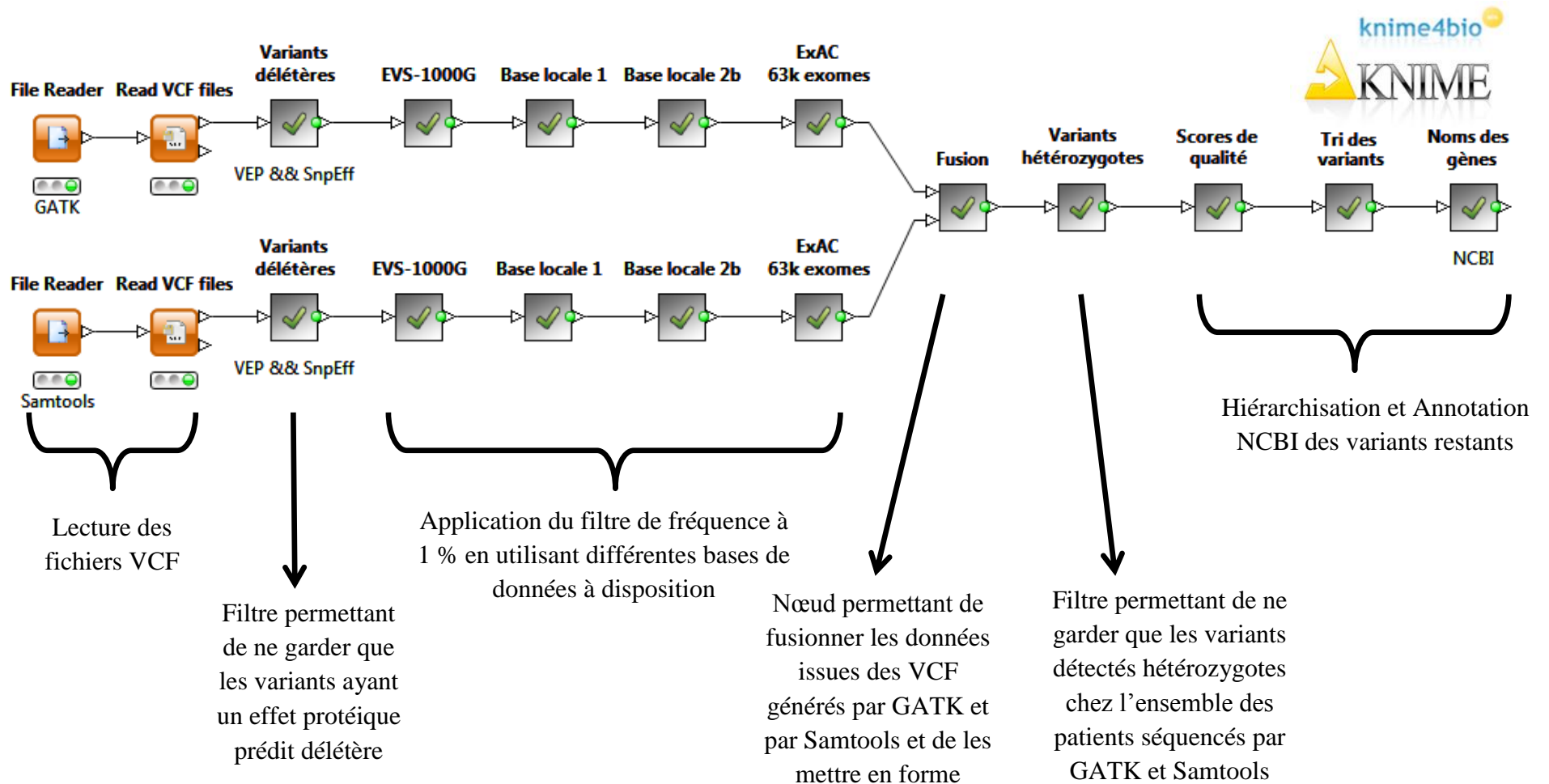


Figure 53 - Workflow Knime pour les analyses familiales

- Le deuxième, ‘Base locale 1’, correspond à une métabase de données regroupant 69 génomes de la firme Complete Genomics (Complete Genomics, Mountain View, CA, USA) incluant une famille de 17 membres et 2 trios, 499 génomes non apparentés du projet hollandais GoNL (Genome of the Netherlands) et 387 exomes du projet britannique UK10K incluant des apparentés. Les seuils de fréquences choisis pour ces filtres sont de 5 % pour les bases de Complete Genomics et de UK10K parce qu’elles contiennent des apparentés et de 1 % pour GoNL ;
- Le troisième, ‘Base locale 2b’, est une base locale dont l’unique objectif est d’éliminer les faux-positifs d’expérience dus à la technologie utilisée. Elle est constituée de patients séquencés sur la même machine dans le même laboratoire. Les exomes des 4 familles BAVd étudiées ayant été séquencés à Barcelone, cette base comportant nos 18 BAVd ainsi que 17 exomes de patients souffrant de varices et 65 exomes de patients souffrant de prolapsus valvulaire mitral a été sélectionnée. Un seuil de 20 % a été utilisé compte tenu des apparentements existants ;
- Le quatrième, ‘ExAC 63k exomes’, correspond à une métabase mise en ligne par le Broad Institute (Cambridge, MA, USA) en octobre 2014. Elle correspond aux données issues du séquençage de 60706 individus non apparentés issus de plusieurs projets parmi lesquels 1000G et EVS. Au total, les données de plus de 33 300 individus européens non finlandais ont été utilisées. Un seuil de 1 % dans la population européenne non finlandaise (NFE) a également été choisi pour cette base (version 1 téléchargée de ftp://ftp.broadinstitute.org/pub/ExAC_release).

Le nœud suivant, ‘Fusion’, permet de fusionner les fichiers VCF générés par Samtools et GATK et d’obtenir un fichier unique comportant tous les variants identifiés chez au moins un patient par l’un des deux algorithmes au moins. Comme il s’agit de fichiers VCF générés en « *single-calling* » initialement, ce nœud permet également de mettre en forme le fichier obtenu comme un unique fichier VCF généré en « *multi-calling* » afin qu’il soit plus facile de l’utiliser par la suite.

Le nœud ‘Variants hétérozygotes’ permet ensuite de ne conserver les variants pour lesquels l’ensemble des patients séquencés dans la famille sont hétérozygotes, pour GATK et pour Samtools. On recherche en effet des variants rares, ce qui est statistiquement incompatible avec la présence de variants homozygotes. L’utilisation de ce nœud implique de ne conserver que les variants détectés à la fois par GATK et par Samtools.

Les deux nœuds suivants, ‘Scores de qualité’ et ‘Tri des variants’ permettent de trier les variants restants en mettant en haut de la liste les variants de meilleure qualité pour lesquels les génotypes sont donc plus sûrs. Enfin, le dernier nœud ‘Nom des gènes’ permet d’aller interroger les bases de données de NCBI (National Center for Biotechnology Information – Bethesda, MA, USA) afin d’annoter les variants restants en ajoutant notamment des informations sur les gènes dans lesquels ils interviennent.

➤ *Workflow Knime pour les analyses HaloPlex*

Ce workflow a été utilisé dans une approche gènes candidats à haut-débit. Cent soixante-trois gènes à implication cardiaque connue ou supposée ont été séquencés chez plus d’une centaine de patients atteints de troubles de la conduction cardiaque isolés grâce au kit de séquençage ciblé HaloPlex d’Agilent. Le séquençage a été réalisé à Nantes dans notre laboratoire.

L’objectif théorique est d’identifier un/des variant(s) rare(s) (<1 % dans la population générale) voire novel⁸, non partagé(s) et de recruter la famille du/des patient(s) muté(s) afin d’entreprendre des tests de coségrégation.

Tout comme le workflow Knime précédemment décrit pour les analyses familiales, la première étape de ce workflow consiste à lire les fichiers VCF de GATK (partie supérieure) et de Samtools (partie inférieure) de tous les patients grâce aux deux premiers nœuds ‘File Reader’ et ‘Read VCF Files’ (Figure 54).

Le nœud suivant ‘Gènes Candidats’ permet de se focaliser sur les gènes associés aux troubles de la conduction ou suspectés de l’être. Ainsi, les cinq gènes décrits ont été étudiés (*SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4*, *GJA5* et *LMNA*) ainsi que quatorze gènes candidats (*GJA1*, *GJC1*, *SCN10A*, *NKX2-5*, *TBX5*, *SNTA1*, *PRKAG2*, *RYR2*, *EMD*, *BMP2*, *BMPRIA*, *GATA4*, *MSX2* et *TNNI3K*).

⁸ Un variant novel est un variant non répertorié, inconnu des bases de données, et pour lequel aucune donnée de fréquence n’est disponible. Un tel variant est probablement extrêmement rare.

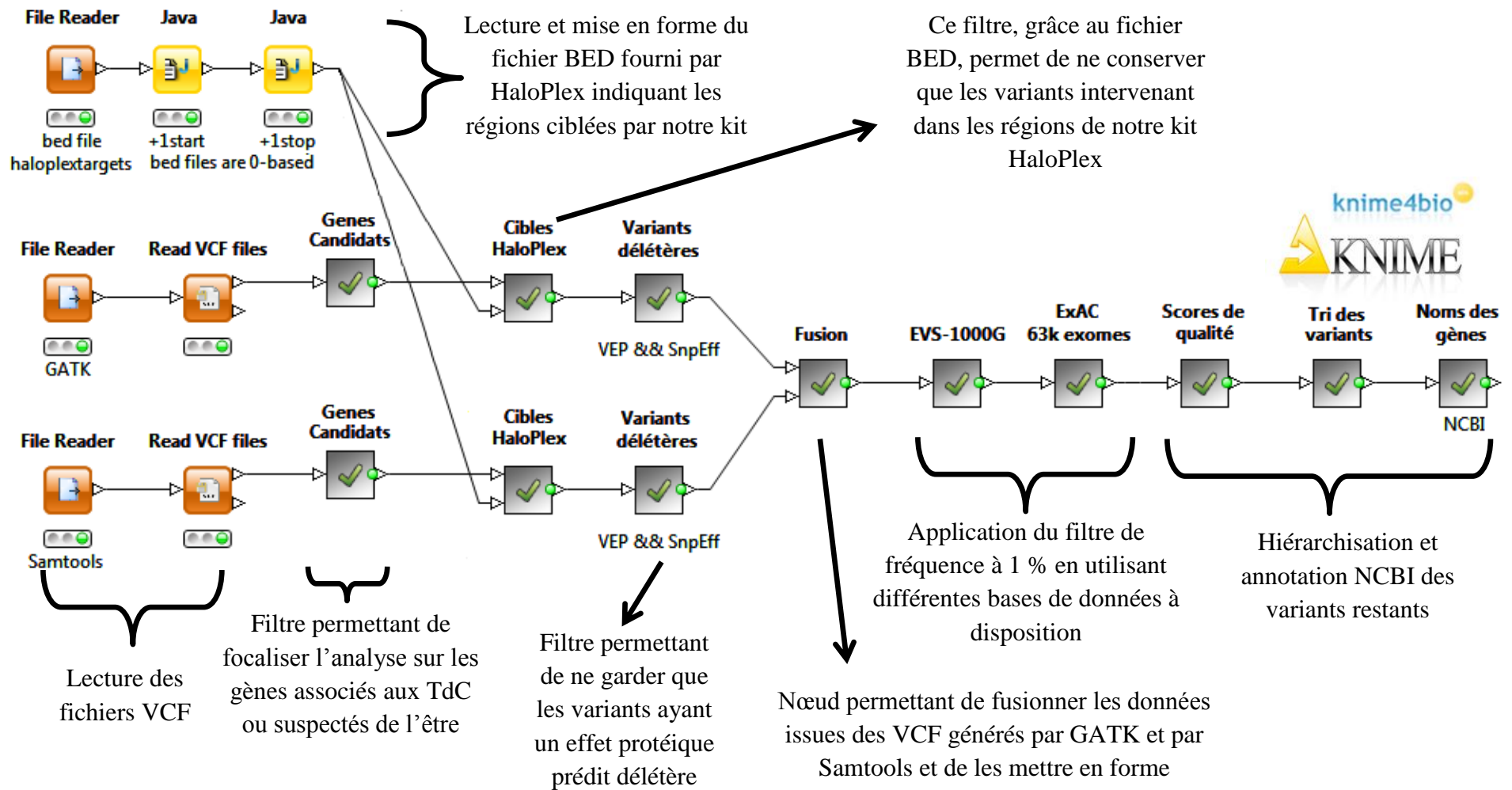


Figure 54 – Workflow Knime pour les analyses HaloPlex

Le nœud ‘Cibles HaloPlex’ permet ensuite, en utilisant le fichier BED correspondant aux zones ciblées par notre kit HaloPlex, de ne conserver que les variants intervenant dans ces zones. En effet, aucun système de capture n’étant parfait, certaines séquences capturées par erreur peuvent être alignées sur des régions non ciblées du génome. Il convient de les retirer de l’analyse. Ce fichier BED, fourni par la société Agilent (fabricant du kit HaloPlex), est traité grâce aux trois nœuds situés au-dessus du workflow principal, le ‘File Reader’ permettant de le lire et les deux nœuds ‘Java’ suivants permettant de le mettre en forme avant utilisation.

Les nœuds suivants ont été décrits lors de la description du workflow utilisé pour les analyses familiales. Le nœud ‘Variants délétères’ permet de ne conserver que les variants prédits délétères par VEP et/ou SnpEff. Le nœud suivant, ‘Fusion’, permet de fusionner les fichiers VCF générés par Samtools et GATK et d’obtenir un fichier unique comportant tous les variants identifiés chez au moins un patient par l’un des deux algorithmes au moins. Il permet également de mettre en forme le fichier obtenu afin qu’il soit plus facile à utiliser par la suite. Les nœuds ‘EVS – 1000G’ et ‘ExAC 63k exomes’ permettent ensuite de filtrer les variants pour ne conserver que ceux qui sont retrouvés dans moins de 1 % de la population européenne séquencée par EVS, 1000G et ExAC. Les deux nœuds suivants, ‘Scores de qualités’ et ‘Tri des variants’ permettent de trier les variants restants en mettant en haut de la liste les variants de meilleure qualité pour lesquels les génotypes sont donc plus sûrs et le nœud ‘Nom des gènes’ annote les variants restants en ajoutant notamment des informations sur les gènes dans lesquels ils interviennent.

➤ *Workflow Knime pour les analyses des trios suivant l’hypothèse de novo*

Ce workflow a été utilisé pour la recherche de variants *de novo* par une approche trio. Pour mettre en application cette hypothèse, les exomes de 15 trios (père, mère et enfant atteint de BAVc) ont été séquencés au laboratoire.

Pour l’analyse des données, deux pools ont été constitués : le premier comprend les 15 patients atteints de BAV congénital et le second contient leurs 30 parents *a priori* sains. L’objectif consiste à identifier des variants rares (<1 % dans la population générale) ou novels présents dans le premier pool et absent du second.

Tout comme pour les workflows Knime précédemment décrits, la première étape consiste à lire les fichiers VCF de GATK et de Samtools des 30 parents (partie supérieure du workflow) ainsi

que des 15 enfants (partie inférieure) (Figure 55). Le nœud ‘Variants délétères’ permet ensuite de ne conserver que les variants prédits délétères par VEP et/ou SnpEff. Le nœud suivant, ‘Fusion’, permet de fusionner les fichiers VCF générés par Samtools et GATK, pour les parents d’une part dans la partie supérieure du workflow et pour les enfants d’autre part dans la partie inférieure du workflow. Il permet ainsi d’obtenir deux fichiers uniques : le premier comportant tous les variants identifiés (par l’un des deux algorithmes au moins) chez au moins l’un des parents, et l’autre comportant tous les variants identifiés (par l’un des deux algorithmes au moins) chez au moins l’un des enfants. Ce nœud permet également de mettre en forme les deux fichiers obtenus afin qu’ils soient plus faciles à utiliser par la suite.

Le nœud ‘Fusion2’ permet, en fusionnant ces deux fichiers, de combiner les données issues des VCF des parents avec celles issues des VCF des enfants. Comme le nœud ‘Fusion’, les données sont ensuite mises en formes pour être plus faciles à utiliser par la suite. Les variants retrouvés chez les parents sont éliminés et seuls les variants retrouvés par les 2 algorithmes GATK et Samtools chez les enfants sont conservés.

Les 4 nœuds qui suivent permettent d’interroger des bases données pour réaliser des filtres sur la fréquence des variants :

- Le premier, ‘EVS – 1000G’, permet d’interroger les bases d’Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP) - 4300 individus d’origine européenne, version ESP6500SI-V2, téléchargée de <http://evs.gs.washington.edu/EVS>) et du projet 1000 Genomes (1000 Genomes phase 1 - 379 individus d’origine européenne, version intégrée v3, téléchargée de <ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/vol1/ftp/release/20110521>). Comme indiqué en annexe, au paragraphe D.I.5 – Analyses bioinformatiques primaire et secondaire page 169, ces bases sont interrogées en amont, lors de l’analyse bioinformatique secondaire, pendant la génération des VCF. Les fréquences EVS et 1000G des variants dans la population européenne sont alors ajoutées dans le champ ‘info’ du fichier VCF. Ce nœud permet donc de filtrer les variants pour ne conserver que ceux qui sont retrouvés dans moins de 1 % de la population européenne séquencée par EVS et par 1000G ;

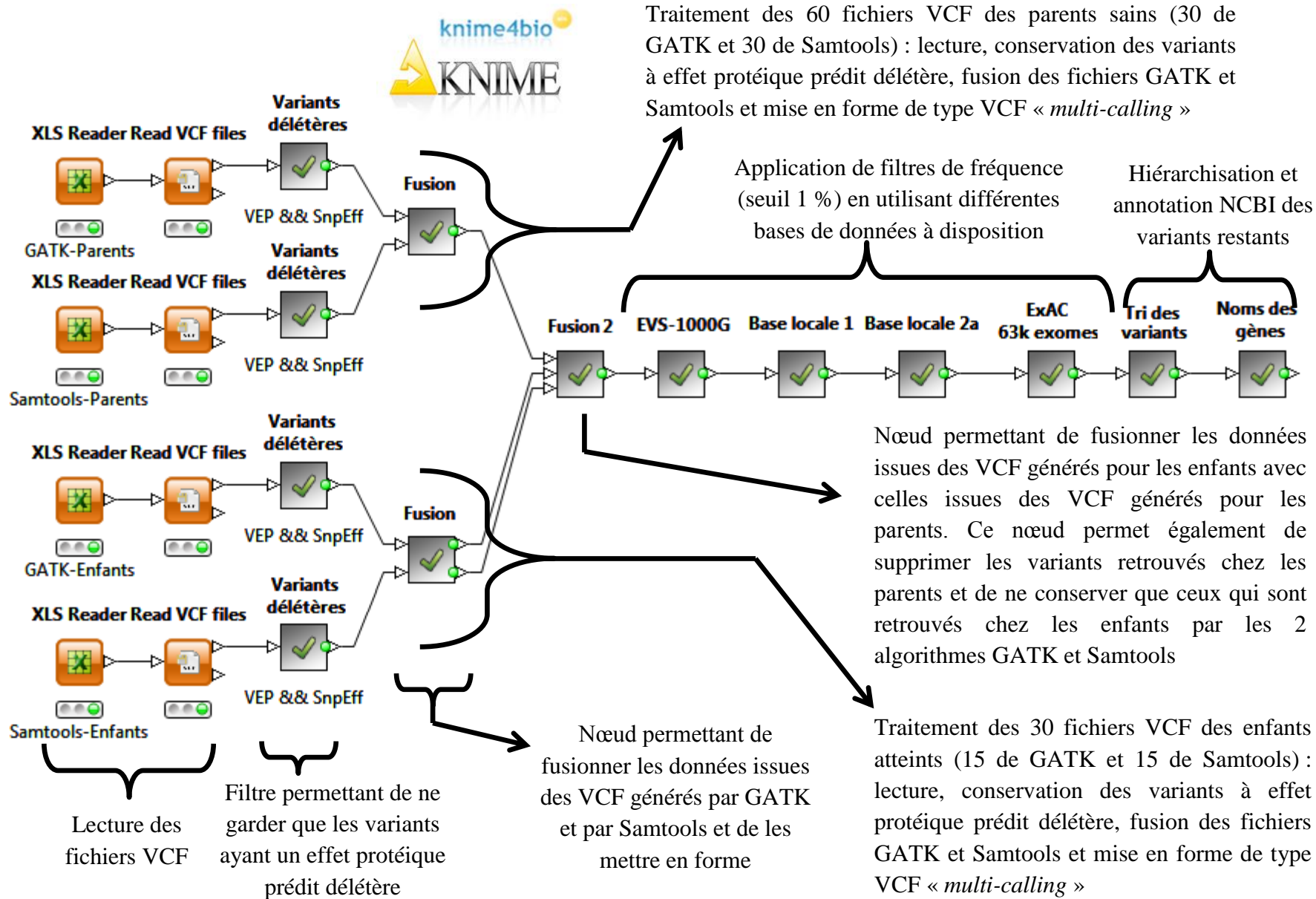


Figure 55 – Workflow Knime pour la recherche de variants *de novo* basée sur une approche pool_{patients}/pool_{parents}

- Le deuxième, ‘Base locale 1’, correspond à une métabase de données regroupant 69 génomes de la firme Complete Genomics (Complete Genomics, Mountain View, CA, USA) incluant une famille de 17 membres et 2 trios, 499 génomes non apparentés du projet hollandais GoNL (Genome of the Netherlands) et 387 exomes du projet britannique UK10K incluant des apparentés. Les seuils de fréquences choisis pour ces filtres sont de 5 % pour les bases de Complete Genomics et de UK10K parce qu’elles contiennent des apparentés et de 1 % pour GoNL ;
- Le troisième, ‘Base locale 2a’, à l’instar du nœud ‘Base locale 2b’ utilisé dans workflow décrit pour les analyses familiales (voir annexe D.I.6 – Workflow Knime pour les analyses familiales page 173), est une base locale dont l’unique objectif est d’éliminer les faux-positifs d’expérience dus à la technologie utilisée. Les 45 exomes étudiés du projet BAVc ayant été séquencés à Nantes par notre équipe, il a été choisi de sélectionner cette base comportant 160 patients séquencés sur le même HiSeq au laboratoire dont 27 BAVc (9 des 15 trios), 8 patients atteints du syndrome de repolarisation précoce, 7 atteints de rétrécissement aortique calcifié, 7 atteints d’anévrismes intracrâniens, 4 atteints du syndrome de Brugada, 4 atteints de myocarde non-compacté, 4 atteints de prolapsus valvulaire mitral ainsi que 2 atteints du syndrome du QT long. Un seuil de 20 % a été utilisé compte tenu des apparentements existants ;
- Le quatrième, ‘ExAC 63k exomes’, correspond à une métabase mise en ligne par le Broad Institute (Cambridge, MA, USA) en octobre 2014. Elle correspond aux données issues du séquençage de 60 706 individus non apparentés issus de plusieurs projets parmi lesquels 1000G et EVS. Au total, les données de plus de 33 300 individus européens non finlandais ont été utilisées. Un seuil de 1 % dans la population européenne non finlandaise (NFE) a également été choisi pour cette base (version 1 téléchargée de ftp://ftp.broadinstitute.org/pub/ExAC_release).

➤ *Workflow Knime pour les analyses des trios suivant l’hypothèse d’hétérozygotie composite*

Ce workflow a été utilisé pour la recherche de variants suivant l’hypothèse d’hétérozygotie composite par une approche trio. Pour mettre en application cette hypothèse, les exomes de 15 trios (père, mère et enfant atteint de BAVc) ont été séquencés au laboratoire. Chaque trio a été analysé individuellement.

Tout comme pour les workflows Knime précédemment décrits, la première étape consiste à lire les fichiers VCF de GATK et de Samtools des 3 patients composant le trio étudié (Figure 56). Le nœud ‘Mise en forme’ permet alors de mettre en forme les fichiers afin de pouvoir utiliser plus facilement le nœud ‘Variants délétères’ qui permet ensuite de ne conserver que les variants prédits délétères par VEP et/ou SnpEff. Le nœud suivant, ‘Fusion’, permet de fusionner les fichiers VCF générés par Samtools et GATK pour les trois patients étudiés et d’obtenir un fichier unique comportant tous les variants identifiés chez au moins l’un de ces patients, par l’un des deux algorithmes au moins. Il permet aussi de mettre en forme le fichier obtenu afin qu’il soit plus facile à utiliser par la suite.

A partir de là, la partie supérieure du workflow correspond à la mise en place de l’hypothèse d’hétérozygotie composite au sens strict alors que la partie inférieure correspond à la mise en place de l’hypothèse de récessivité.

Le nœud ‘Enfant hétérozygote’ permet de ne conserver que les variants identifiés chez l’enfant à l’état hétérozygote et le nœud ‘Enfant identique à un parent’ permet de ne conserver que les variants partagés à l’état hétérozygote par l’enfant atteint et seulement l’un de ses deux parents sains. Cela permet d’éliminer les variants hétérozygotes partagés par les trois patients.

Le nœud ‘EVS – 1000G’ permet ensuite de filtrer les variants pour ne conserver que ceux qui sont retrouvés dans moins de 10 % de la population européenne séquencée par EVS et par 1000G. En effet, pour cette hypothèse, nous avons cherché à identifier des variants prédits délétères par VEP et/ou SnpEff, mais, contrairement aux autres projets, des variants moins rares ont été pris en compte. En effet, la prévalence de cette pathologie étant d’environ 1/20000, on peut estimer la fréquence moyenne f_{moy}^2 de l’apparition de la combinaison délétère de deux variants à cette valeur : $f_{\text{moy}}^2 = \frac{1}{20000}$, d’où la fréquence moyenne de chacun des variants f_{moy} :

$f_{\text{moy}} = \sqrt{\frac{1}{20000}} \approx 0,7 \%$. Nous avons alors subjectivement autorisé des combinaisons de variants dont la fréquence peut atteindre jusqu’à 10 % de la population générale, afin d’avoir un peu de marge.

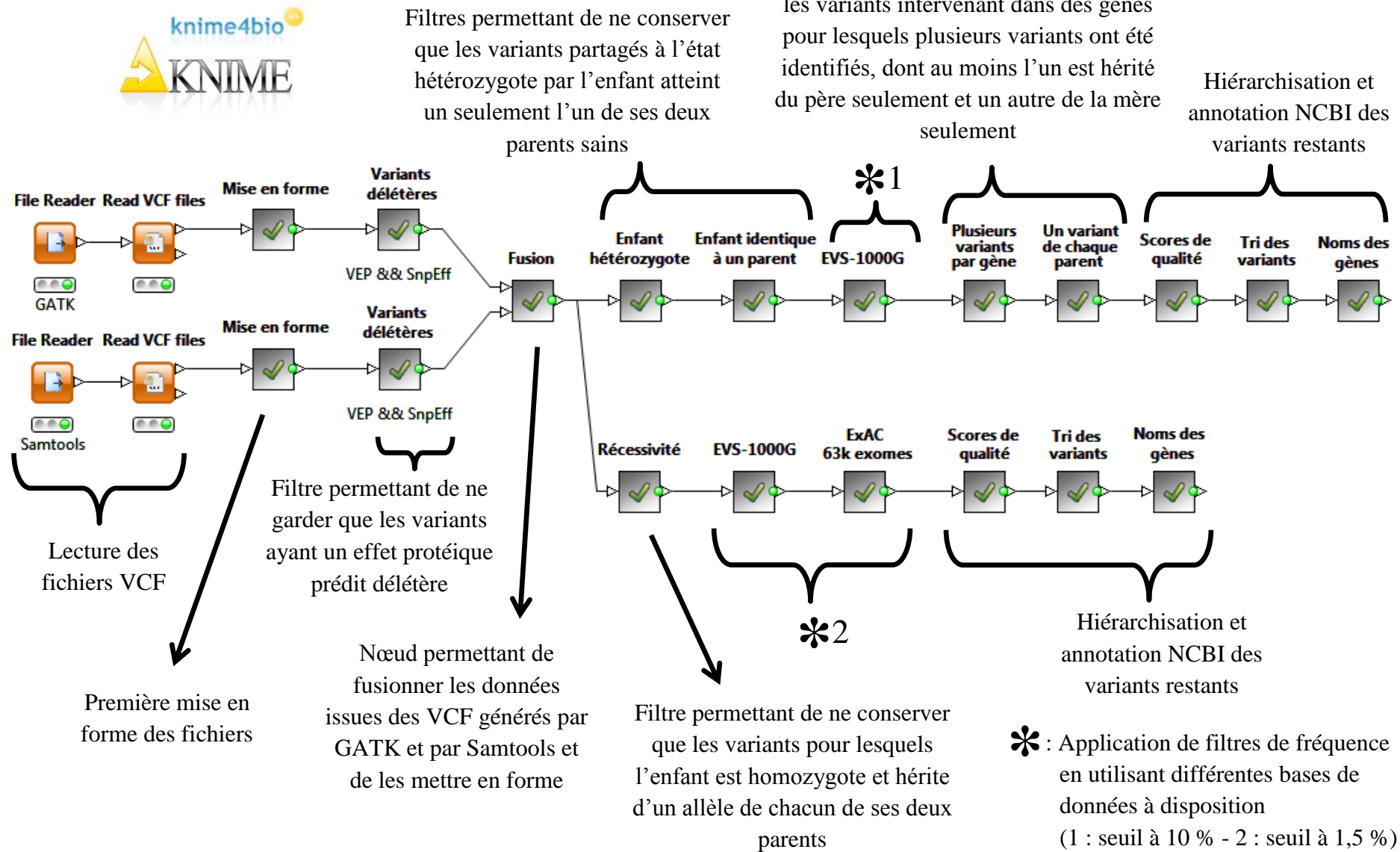


Figure 56 – Workflow Knime pour la recherche de variants suivant l'hypothèse d'hétérozygotie composite

Les nœuds ‘Plusieurs variants par gène’ et ‘Un variant de chaque parent’ permettent ensuite de comptabiliser le nombre de variants par gène chez l’enfant pour pouvoir ne conserver que les variants intervenant dans des gènes pour lesquels plusieurs variants ont été identifiés, dont au moins l’un est hérité du père seulement et un autre de la mère seulement.

Les nœuds suivants ont déjà été décrits : ‘Scores de qualités’ et ‘Tri des variants’ permettent de trier les variants restants en mettant en haut de la liste les variants de meilleure qualité pour lesquels les génotypes sont plus sûrs, et le nœud ‘Nom des gènes’ annote les variants restants en ajoutant notamment des informations sur les gènes dans lesquels ils interviennent.

La partie inférieure du workflow concerne donc l’hypothèse de récessivité. Après le nœud ‘Fusion’, le nœud ‘Récessivité’ permet de ne conserver que les variants pour lesquels l’enfant est homozygote et hérite d’un allèle de chacun de ses deux parents. Tous les nœuds suivants ont déjà été décrits, ‘EVS – 1000G’ et ‘ExAC 63k exomes’ permettant de filtrer les variants en utilisant les bases EVS, 1000G et ExAC pour ne conserver que ceux qui sont retrouvés dans moins de 1,5 % des populations européennes non finlandaises séquencées dans ces bases. Nous avons choisi ce seuil afin d’avoir un peu de marge, la fréquence théorique de l’allèle devant être de 0,7 % afin de correspondre à la prévalence des TdC. Les nœuds ‘Scores de qualités’, ‘Tri des variants’ et ‘Nom des gènes’ permettent quant à eux d’annoter et de trier les variants restants en mettant en haut de la liste les variants de meilleure qualité pour lesquels les génotypes sont donc plus sûrs.

I.7. Visualisation des alignements

Les variants passant tous les filtres sélectionnés ont été analysés individuellement. L'alignement des reads couvrant ces variants a systématiquement été vérifié grâce à l'outil de visualisation IGV (« *Integrative Genome Viewer* »). Cette étape permet de faire une présélection des variants de manière à écarter les faux-positifs évidents avant l'éventuelle validation capillaire (Figure 57).

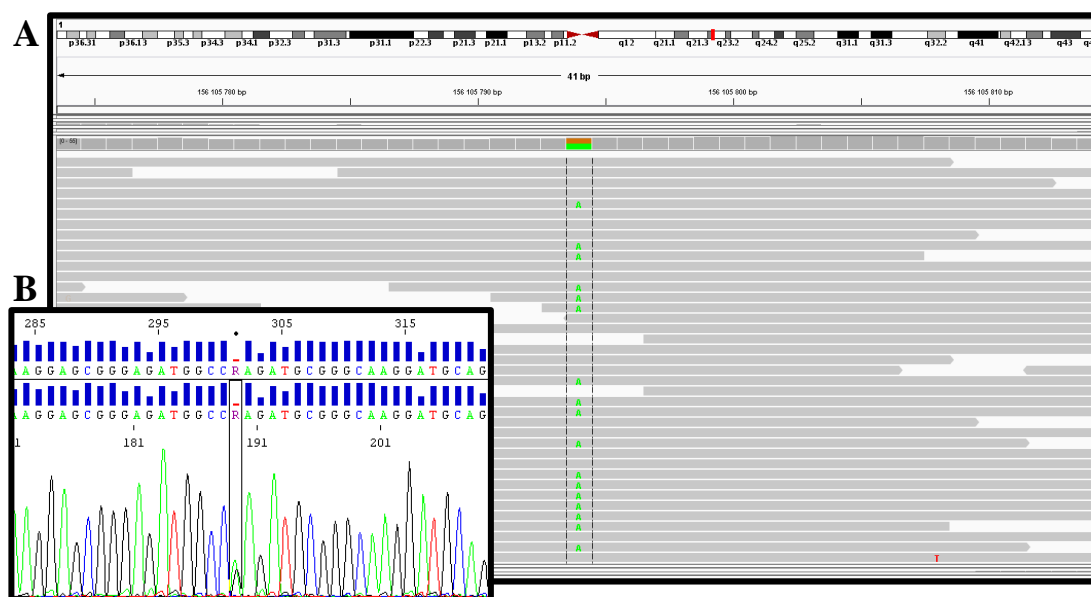


Figure 57 – Visualisation du variant *LMNA*-p.E347K

Ce variant a été détecté suite à l'analyse de la famille A réalisée dans le cadre du projet 1. A – Visualisation d'un variant G>A dans l'outil IGV. B – Électrophoregramme confirmant la présence du variant après séquençage capillaire.

I.8. Tests statistiques d'enrichissement

Une étude similaire a été réalisée sur une cohorte de patients atteints du syndrome de Brugada. Elle a fait l'objet d'un article disponible en annexe à la page 200 (article 3).

S. Le Scouarnec, M. Karakachoff, J.-B. Gourraud, P. Lindenbaum, S. Bonnaud, V. Portero, L. Duboscq-Bidot, **X. Daumy**, F. Simonet, R. Teusan, E. Baron, J. Violleau, E. Persyn, L. Bellanger, J. Barc, S. Chatel, R. Martins, P. Mabo, F. Sacher, M. Haïssaguerre, F. Kyndt, S. Schmitt, S. Bézieau, H. Le Marec, C. Dina, J.-J. Schott, V. Probst, R. Redon. « **Testing the burden of rare variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for Brugada syndrome** », *Hum Mol Genet.* 2015 Feb 3. pii: ddv036. [Epub ahead of print], PMID: 25650408.

Ce test d'enrichissement (*'Burden test'*) a été réalisé pour comparer la proportion de patients et de témoins porteurs d'au moins un variant rare avec conséquence fonctionnelle potentielle dans chacun des 163 gènes inclus dans le kit HaloPlex. Il visait à identifier des gènes enrichis en variants rares chez les 95 patients BAVd étudiés comparativement à 167 patients contrôles internes atteints de rétrécissement aortique calcifié (RAC) (comparaison 1). Ces patients, âgés de plus de 65 ans, viennent, comme les patients BAVd, de la région ouest de la France et ne présentent aucun trouble du rythme ni de la conduction cardiaque.

Afin de tester les résultats obtenus, une seconde population témoin indépendante comprenant 881 patients contrôles de la base britannique UK10K a été utilisée (comparaison 2). Ces contrôles ont été sélectionnés à partir de six populations de patients atteints de troubles neurodéveloppementaux dont les exomes ont été séquencés dans le cadre du projet UK10K (<http://www.uk10k.org/>) : MUIR (165 patients, EGAD00001000236), IOP_COLLIER (144 patients, EGAD00001000235), ABERDEEN (282 patients, EGAD00001000227), ASD_GALLAGHER (62 patients, EGAD00001000230), EDINBURGH (209 patients, EGAD00001000233) et GURLING (19 patients, EGAD00001000237). Pour les analyses comparant les patients BAV avec ces contrôles de la base UK10K, seuls les variants situés dans les zones couvertes par les deux kits de capture utilisés (HaloPlex pour les cas, SureSelect pour les patients UK10K) ont été sélectionnés.

Afin de discriminer les variants à utiliser dans le test statistique des probables faux-positifs, trois filtres ont été mis en place :

- tout d'abord, nous avons effectué le test exact de Fisher pour chaque variant, en comparant le nombre d'allèles mutés dans les deux populations (cas et contrôles). Ceci a permis de réaliser un premier filtre excluant les variants dont la p-valeur est inférieure à 0,01. Un tel variant est soit un faux-positif dû à un biais expérimental lors du séquençage ou autre, ou un vrai variant qu'il convient d'analyser à part par validation capillaire directe ;
- nous avons également exclu les variants absents des populations européennes du projet 1000 Genomes et/ou du projet Exome Variant Server mais qui présentaient une MAF supérieure à 5 % chez les cas et/ou les contrôles ;
- enfin, notre étude s'intéressant aux variants rares, nous avons éliminé les variants communs qui présentaient une MAF supérieure à 1 % dans les populations européennes du projet 1000 Genomes et/ou du projet Exome Variant Server.

Les variants restants ont tous été inclus dans le test CAST (*'cohort allelic sums test'*), un test statistique basé sur le test exact de Fisher (Morgenthaler et Thilly 2007), qui a été appliqué pour chacun des 163 gènes de notre kit HaloPlex. Tout gène ayant une p-valeur inférieure à 0,05 a été considéré comme potentiellement associé à la pathologie.

I.9. Génotypage haut-débit

➤ Génotypage

Les SNP ont été génotypés sur les puces *Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1* optimisées pour les études de populations selon les protocoles standards du fournisseur Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Ces puces permettent de tester 567,097 SNP. Les intensités de fluorescence ont été quantifiées à l'aide du GeneTitan d'Affymetrix (http://www.affymetrix.com/catalog/131531/AFFY/GeneTitan+Instrument#1_1) et le génotypage a été réalisé à l'aide du logiciel 'Affymetrix Power Tools' en suivant les recommandations du fabricant (http://www.affymetrix.com/estore/partners_programs/programs/developer/tools/powertools.affx).

Les individus avec un pourcentage de génotypage réussi⁹ inférieur à 97 % ont été éliminés de l'analyse ainsi que ceux présentant un taux d'hétérozygotie anormalement différent de la valeur attendue. Les SNP présentant une fréquence de l'allèle mineur (MAF) inférieure à 10 %¹⁰ ont été exclus tout comme ceux ayant un taux de génotypage inférieur à 95 %¹¹ ou étant en déséquilibre de Hardy-Weinberg¹² ($P < 10^{-5}$). Des SNP supplémentaires ont été exclus s'ils présentaient des fréquences alléliques significativement différentes d'une plaque à l'autre, que ce soit pour notre population de patients ou nos contrôles.

⁹ Le *'call-rate'* en anglais est un score quantifiant, pour un patient, le taux de SNP effectivement génotypés. Ce score est utilisé lors d'une étude d'association comme un score de qualité permettant d'éliminer les individus pour lesquels trop peu de SNP ont pu être génotypés à cause de problèmes expérimentaux ou informatiques.

¹⁰ Cette fréquence est calculée sur l'ensemble des cas et contrôles analysés.

¹¹ Le taux de génotypage d'un SNP est le taux de patients génotypés pour ce SNP. De même que le *'call-rate'*, ce score est utilisé lors d'une étude d'association comme un score de qualité permettant d'éliminer les SNP pour lesquels trop peu d'individus ont pu être génotypés à cause de problèmes expérimentaux ou informatiques.

¹² Un SNP en déséquilibre de Hardy-Weinberg présente des fréquences génotypiques différentes des fréquences théoriques attendues. Cela peut être dû à un effet Wahlund traduisant la subdivision de la population étudiée en plusieurs populations qui n'échangent pas ou peu de gamètes, à un excès de liaisons consanguines, à une sélection génétique, à un phénomène de migration anormal, à la dérive génétique aléatoire...

➤ *Analyses démographiques*

L'apparementement entre individus a été évalué par la technique de positionnement multidimensionnel implémentée dans PLINK.

Pour ce faire, une sélection de SNP indépendants (pas en déséquilibre de liaison) a été réalisée avec un seuil de $r^2 < 0,2$ sur une fenêtre donnée (50 SNP consécutifs). Cette sélection s'est faite en deux temps de manière à prendre en compte les SNP en déséquilibre de liaison s'étendant sur des distances relativement longues. Ceci est particulièrement important pour la puce utilisée dans la mesure où cette dernière est enrichie en SNP dans la région des gènes HLA (antigène de leucocytes humains) sur le chromosome 6.

Trois matrices d'identité par état ont ensuite été créées. La méthode d'échelonnement multidimensionnel a été utilisée sur chacune d'elles et a permis l'obtention de 10 composantes principales résumant l'information génétique des individus. Ceci a permis, à chaque étape, d'écarter de l'analyse des individus en positionnement aberrant ('*outliers*') afin d'obtenir un groupe (cas et contrôles) génétiquement homogène. Les trois matrices utilisées incluent:

- les cas, les contrôles et tous les individus séquencés dans le projet 1000 Genomes ;
- les cas, les contrôles et tous les individus de 1000 Genomes génétiquement proches des cas et des contrôles (cela correspond majoritairement aux Européens 1000 Genomes non Finlandais) ;
- les cas et les contrôles restants seulement.

Les exclusions d'individus ont été réalisées sur les trois premières composantes (les plus informatives) grâce à la méthode des plus proches voisins (pour initialiser les individus en positionnement aberrant) et à la méthode de clustering implémentées dans les bibliothèques R¹³ PrabClus et M-CLUST respectivement.

¹³ R est un programme libre informatique permettant le traitement et l'analyse statistique de données.

➤ *Etude d'association génome entier (GWAS)*

Pour réaliser l'étude d'association génome entier, chaque SNP a été testé par régression logistique en faisant l'hypothèse d'un modèle génétique additif. Le test statistique est corrigé par l'ajout en covariable des deux premières composantes principales afin de prendre en compte la relative hétérogénéité génétique des séries de cas et de témoins analysées.

Les résultats sont visualisés à l'aide de deux graphes permettant de visualiser l'éventuelle présence de SNP statistiquement associés à la pathologie : le 'QQ-plot' et le 'Manhattan plot'. Sur le premier, plus les SNP s'écartent de la diagonale représentant l'hypothèse de non-association, plus ils sont statistiquement associés à la pathologie. Sur le second, plus un pic de SNP est haut, plus ceux-ci sont statistiquement associés à la pathologie.

II. Liste des gènes inclus dans le premier design du système de capture HaloPlex (BAVd)

Le Tableau 34 liste l'ensemble des gènes inclus dans le système de capture HaloPlex ainsi que le motif du choix.

Gène	Motif de la sélection	Gène	Motif de la sélection
<i>SCN5A</i>	TdC / SQTL / BrS / CMD / FVI	<i>KCNQ1</i>	SQTL
<i>CACNB2</i>	BrS	<i>SCN4B</i>	SQTL
<i>FGF12</i>	BrS	<i>ATP2A2</i>	candidat SQTL
<i>GPD1L</i>	BrS	<i>SLC8A1</i>	candidat SQTL
<i>HCN4</i>	BrS	<i>SRL</i>	candidat SQTL
<i>KCNE3</i>	BrS	<i>NOS1AP</i>	candidat SQTL
<i>RANGRF</i>	BrS	<i>CAV3</i>	SQTL / CMH
<i>SCN1B</i>	BrS	<i>CACNA2D1</i>	SQTC
<i>SCN3B</i>	BrS	<i>DPP6</i>	FVI
<i>KCNJ8</i>	BrS / SRP	<i>KCNA5</i>	FA
<i>KCND3</i>	BrS / FVI	<i>NPPA</i>	FA
<i>KCNE1L</i>	BrS / FVI	<i>CACNA1D</i>	DS
<i>SCN10A</i>	BrS / TdC	<i>CASQ2</i>	TVPC
<i>EMD</i>	TdC	<i>TRDN</i>	TVPC
<i>GJA1</i>	TdC	<i>DSC2</i>	DAVD
<i>GJA5</i>	TdC	<i>DSP</i>	DAVD
<i>GJC1</i>	TdC	<i>JUP</i>	DAVD
<i>NKX2-5</i>	TdC	<i>PKP2</i>	DAVD
<i>TRPM4</i>	TdC	<i>TGFB3</i>	DAVD
<i>LMNA</i>	TdC / CMD	<i>TMEM43</i>	DAVD
<i>BMP2</i>	candidat TdC	<i>DSG2</i>	DAVD / CMD
<i>BMPR1A</i>	candidat TdC	<i>RYR2</i>	DAVD / TVPC
<i>GATA4</i>	candidat TdC	<i>ABCC9</i>	CMD
<i>MSX2</i>	candidat TdC	<i>CALR3</i>	CMD
<i>PRKAG2</i>	candidat TdC / CMH	<i>DES</i>	CMD
<i>SNTA1</i>	candidat TdC / SQTL	<i>DTNA</i>	CMD
<i>Tbx5</i>	candidat TdC	<i>EYA4</i>	CMD
<i>TNNI3K</i>	candidat TdC fonction	<i>NEXN</i>	CMD
<i>AKAP9</i>	SQTL	<i>PSEN1</i>	CMD
<i>ANK2</i>	SQTL	<i>PSEN2</i>	CMD
<i>CACNA1C</i>	SQTL	<i>RBM20</i>	CMD
<i>KCNE1</i>	SQTL	<i>SGCD</i>	CMD
<i>KCNE2</i>	SQTL	<i>TAZ</i>	CMD
<i>KCNH2</i>	SQTL	<i>ACTC1</i>	CMH / CMD
<i>KCNJ2</i>	SQTL	<i>ACTN2</i>	CMH / CMD
<i>KCNJ5</i>	SQTL	<i>CSRP3</i>	CMH / CMD

Gène	Motif de la sélection
<i>JPH2</i>	CMH / CMD
<i>LDB3</i>	CMH / CMD
<i>MYBPC3</i>	CMH / CMD
<i>MYH6</i>	CMH / CMD
<i>MYH7</i>	CMH / CMD
<i>MYL2</i>	CMH / CMD
<i>MYOZ2</i>	CMH / CMD
<i>PLN</i>	CMH / CMD
<i>TCAP</i>	CMH / CMD
<i>TNNC1</i>	CMH / CMD
<i>TNNI3</i>	CMH / CMD
<i>TNNT2</i>	CMH / CMD
<i>TPM1</i>	CMH / CMD
<i>TTN</i>	CMH / CMD
<i>VCL</i>	CMH / CMD
<i>LAMP2</i>	CMH
<i>MYL3</i>	CMH
<i>MYLK2</i>	CMH
<i>ANKRD1</i>	autre cardiomyopathie
<i>BAG3</i>	autre cardiomyopathie
<i>CTF1</i>	autre cardiomyopathie
<i>FXN</i>	autre cardiomyopathie
<i>GLA</i>	autre cardiomyopathie
<i>MYPN</i>	autre cardiomyopathie
<i>IRX3</i>	candidat fonctionnel
<i>KCNA4</i>	candidat fonctionnel
<i>KCNAB1</i>	candidat fonctionnel
<i>KCNE4</i>	candidat fonctionnel
<i>KCNIP2</i>	candidat fonctionnel
<i>KCNJ11</i>	candidat fonctionnel
<i>KCNJ12</i>	candidat fonctionnel
<i>KCNJ4</i>	candidat fonctionnel
<i>SCN2B</i>	candidat fonctionnel
<i>IRX5</i>	candidat fonctionnel
<i>ACTA1</i>	candidat Nantes
<i>CAMK2D</i>	candidat Nantes
<i>CLASP1</i>	candidat Nantes
<i>MAPRE1</i>	candidat Nantes
<i>MAPRE2</i>	candidat Nantes
<i>MAPRE3</i>	candidat Nantes
<i>PACSIN3</i>	candidat Nantes
<i>PTPLA</i>	candidat Nantes
<i>SPTBN5</i>	candidat Nantes
<i>TRPM1</i>	candidat Nantes

Gène	Motif de la sélection
<i>KCNAB3</i>	candidat Nantes
<i>LMCD1</i>	candidat Nantes
<i>CLASP2</i>	candidat Nantes
<i>KCNAB2</i>	candidat Nantes
<i>HEY2</i>	Régions GWAS BrS
<i>NCOA7</i>	Régions GWAS BrS
<i>AKAP5</i>	Candidat réunion AMS
<i>ASPH</i>	Candidat réunion AMS
<i>BVES</i>	Candidat réunion AMS
<i>DLG1</i>	Candidat réunion AMS
<i>FKBP1B</i>	Candidat réunion AMS
<i>GJD3</i>	Candidat réunion AMS
<i>HAND2</i>	Candidat réunion AMS
<i>HDAC1</i>	Candidat réunion AMS
<i>HDAC2</i>	Candidat réunion AMS
<i>HEY1</i>	Candidat réunion AMS
<i>ID2</i>	Candidat réunion AMS
<i>IRX1</i>	Candidat réunion AMS
<i>MEF2C</i>	Candidat réunion AMS
<i>NEDD4L</i>	Candidat réunion AMS
<i>NOTCH1</i>	Candidat réunion AMS
<i>PITX2</i>	Candidat réunion AMS
<i>POPDC2</i>	Candidat réunion AMS
<i>SHOX2</i>	Candidat réunion AMS
<i>SMAD4</i>	Candidat réunion AMS
<i>SYNPO2L</i>	Candidat réunion AMS
<i>TBX1</i>	Candidat réunion AMS
<i>TBX2</i>	Candidat réunion AMS
<i>TBX3</i>	Candidat réunion AMS
<i>TBX18</i>	Candidat réunion AMS
<i>TBX20</i>	Candidat réunion AMS
<i>TJP1</i>	Candidat réunion AMS
Gène Ams 1	candidat Amsterdam
Gène Ams 2	candidat Amsterdam
Gène Ams 3	candidat Amsterdam
Gène Ams 4	candidat Amsterdam
Gène Ams 5	candidat Amsterdam
Gène Ams 6	candidat Amsterdam
Gène Ams 7	candidat Amsterdam
Gène Ams 8	candidat Amsterdam
Gène Ams 9	candidat Amsterdam
Gène Ams 10	candidat Amsterdam
Gène Ams 11	candidat Amsterdam
Gène Ams 12	candidat Amsterdam

Gène	Motif de la sélection
Gène Ams 13	candidat Amsterdam
Gène Ams 14	candidat Amsterdam

Gène	Motif de la sélection
Gène Ams 15	candidat Amsterdam

Tableau 34 – Liste des 163 gènes inclus dans le premier design du kit HaloPlex

TdC : Troubles de la Conduction ; BrS : Syndrome de Brugada ; SRP : Syndrome de Repolarisation Précoce ; FVI : Fibrillation Ventriculaire Idiopathique ; SQTl : Syndrome du QT long ; SQTC : Syndrome du QT court ; CMD : Cardiomyopathie Dilatée ; CMH : Cardiomyopathie Hypertrophique ; DAVD : Dysplasie Arythmogène du Ventricule Droit ; FA : Fibrillation Atriale ; DS : Dysfonction Sinusale ; TVPC : Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholergique

III. Données cliniques des 95 patients constituant la plaque BAVd 1

Patient	Sexe	Année de naissance	Age lors du dernier examen clinique	Symptômes	FC	PR	QRS	QTc	Morphologie QRS (ECG)	Conduction	PM (Age)
CD10096	F	1934	77	Non	37		160	335	BBD	BAV3	77
CD09323	M	1931	72	Non	61	284	138	430	BBD + HBAG	BAV2 type 2	72
CD08855	M	1937	73	NP	81	206	86	393	Normal	BAV1	72
11H0451	M	1979	32	NP	69	160	170	473	BBD + HBAG	Normal	32
CD10537	M	1940	66	Oui	89	186	146	473	BBD + HBAG	Normal	
CD08468	M	1932	78	Non	47		140	444	BBD	BAV2 type 2	78
CD08555	M	1945	63	Oui	83	202	160	492	BBD + HBAG	BAV1	63
CD10494	M	1931	76	Oui	80	200	158	448	BBG	BAV1	76
CD10508	M	1937	74	Oui	85	240	148	467	BBD + HBAG	BAV1	74
CD06714	M	1923	74	Non	27		200	510	BBD + HBAG	BAV2 type 2	86
CD08954	F	1927	71	Oui	35		100	275	Normal	BAV3	71
CD10281	F	1948	62	Non	92	188	158	490	BBD + HBAG	Normal	62
CD10949	M	1936	56	Non	34		120	376	BBD	BAV1 + BAV2 type 2	56
CD07012	M	1947	59	Oui	61	184	146	506	BBD	BAV2 type 2	59
CD10945	M	1922	75	Oui	41		176	347	BBG	BAV2 type 2	75
CD08942	M	1935	71	Oui	36		100	387	Normal	BAV3	75
CD08333	M	1937	64	Oui	54	164	168	459	BBD + HBAG	Normal	64
CD06851	M	1930	74	Non	41		86	456	Normal	BAV3	74
CD07717	M	1939	71	Non	43		86	425	Normal	BAV3	71
CD08595	M	1932	74	Oui	55	200	100	383	BBD	BAV1	74
CD08922	M	1932	78	Non	41		100	370	Normal	BAV2 type 2	78
CD07477	M	1938	72	Non	63		148	439	BBD + HBAG	BAV3	72
CD11369	M	1940	68	Oui	56	432	154	460	BBD + HBAG	BAV1	
CD10870	M	1937	70	Oui	25					BAV3	70
CD09095	F	1934	73	Non	47		74	386	Normal	BAV3	73
CD08704	M	1932	76	Non	71	280	132	513	BBD + HBAG	BAV2 type 2	76
CD09925	F	1941	69	Oui	63	182	140	486	BBGC	BAV2 type 2	69
CD09927	M	1932	79	Non	70	182	90	421	BBD + HBAG	BAV2 type 2	79
CD10547	M	1947	59	Oui	27		160	397	BBG	BAV3	59
CD10703	F	1943	65	Oui	65	220	176	537	BBD + HBAG	BAV1	65
CD07595	M	1929	77	Oui	80	224	136	443	BBD + HBAG	BAV1	77
CD08466	F	1929	69	Non	20		100	400	BBDi	BAV3	69
CD06805	M	1931	74	Non	52		96	432	Normal	BAV3	74
CD08396	M	1940	58	Oui	66	200	156	449	BBD + HBAG	BAV1	58
CD06836	M	1931	72	Non	57		100	396	Normal	BAV3	72
CD09599	F	1946	61	Oui	41		90	465	Normal	BAV3	61
CD06862	M	1937	73	Oui	68		140	407	BBG	BAV3	73
CD06703	M	1936	62	Oui	53	228	156	440	BBD + HBPG	BAV1	70
CD06861	M	1935	75	Non	60	500	146	448	BBD + HBAG	BAV1	75
CD06802	M	1926	75	Non	49		140	354	BBD	BAV3	75
CD11115	M	1947	64	Oui	25		120	465	BBD + HBAG	BAV3	64

CD10009	M	1945	66	Oui	90	210	142	495	BBG	BAV1	66
CD08085	F	1929	74	Oui	36		136	539	BBD	BAV3	74
CD08309	M	1922	79	Oui	40	376	156	461	BBD + HBAG	BAV1	79
CD08467	M	1931	79	Oui	33		102	343	Normal	BAV2 type 2	79
CD07471	M	1926	72	Non	43		104	410	Normal	BAV3	82
CD10082	F	1941	70	Oui	55	162	96	448	Normal	BAV2 type 2	70
CD09287	M	1940	71	Oui	80	224	136	469	BBD	BAV1	71
CD10303	F	1947	57	Non	49		92	443	Normal	BAV3	57
CD10982	F	1947	64	Non	42		110	452	BBD	BAV2 type 2	64
CD06822	M	1931	79	Non	34		132	393	BBD + HBAG	BAV3	79
CD10499	M	1929	78	Oui	51		164	406	BBG	BAV3	78
CD08708	M	1936	72	Non	38		146	423	BBD	BAV3	72
CD09978	M	1939	68	Non	46		80	391	Normal	BAV3	68
CD10761	M	1940	71	Oui	42		142	462	BBD + HBAG	BAV3	
CD09047	M	1938	62	Non	46		154	487	BBG	BAV3	62
CD07618	F	1933	57	Non	42	224	128	525	BBD + HBAG	BAV1	57
CD11388	M	1948	64	Oui	32		150	365	BBD + HBAG	BAV3	64
CD09406	F	1950	61	Oui	10		80	163	Normal	BAV3	61
CD10575	M	1944	62	Oui	31		138	424	BBD	BAV3	
CD06661	F	1921	77	Non	53		120	455	BBD	BAV2 type 1	85
CD11199	M	1944	67	Oui	90	232	136	500	BBD + HBAG	BAV1	
CD08058	F	1937	65	Oui	49		100	419	BBDi	BAV3	65
CD09294	M	1935	70	Non	42		138	442	BBD + HBAG	BAV3	70
CD06746	M	1931	78	Oui	41		164	436	BBD + HBPG	BAV3	78
CD09041	M	1943	67	Non	32		158	377	BBD	BAV3	67
CD10525	M	1936	74	Oui	72	178	150	491	BBD + HBAG	Normal	74
CD07536	M	1934	71	Oui	77	204	146	446	BBD + HBAG	BAV1	71
CD06660	F	1943	62	Non	64	276	140	469	BBG	BAV1 + BAV2 type 2	62
CD07604	F	1925	80	Oui	25		120	349	NP	BAV3	80
CD10961	M	1947	64	Non	42	274	140	415	BBD	BAV2 type 2	64
CD06960	M	1953	57	Oui	80	186	148	483	BBD + HBAG	Normal	57
CD11372	M	1953	58	Non	35		144	466	BBD	BAV3	
CD06686	F	1924	70	Oui	44		156	521	BBG	BAV3	81
CD06723	F	1927	76	Oui	31		90	469	BBDi	BAV3	79
CD08061	F	1931	76	Non	59	224	154	432	BBG	BAV1	76
CD06724	M	1927	73	Oui	63	204	144	426	BBD + HBAG	BAV1	73
CD08506	M	1929	72	Oui	67	220	152	452	BBD + HBAG	BAV2 type 2	72
CD09094	M	1932	79	Non	52		94	400	BBDi	BAV2 type 2	79
CD07473	M	1926	79	Oui	81	200	160	442	BBD + HBAG	BAV1	79
CD09567	F	1928	74	Oui	82	252	128	477	BBD	BAV1	74
CD03690	F	1938	67	Oui	35		136	417	BBG	BAV3	67
CD06681	M	1935	60	Oui	50	276	192	486	BBD + HBPG	BAV1	71
CD08382	M	1927	74	Non	35		118	461	DAG	BAV2 type 2	74
CD10272	F	1938	60	Oui	42		80	368	Normal	BAV3	65
CD07551	M	1929	79	NP	51	292	120	435	BBG	BAV2 type 2	79
CD08576	F	1935	75	Oui	68	184	138	468	BBD + HBAG	BAV1	75
CD06623	M	1930	75	Oui	88	200	204	560	BBG	BAV1	75

CD09096	M	1935	66	Oui	80	282	96	490	HBAG	BAV2 type 2	66
CD06789	F	1941	64	Non	40		100	488	Normal	BAV2 type 1	64
CD10623	F	1948	58	Oui	35		80	306	Normal	BAV3	58
CD06852	M	1928	74	Non	39		90	419	Normal	BAV3	74
CD07505	M	1931	67	Non	34		160	485	BBG	BAV3	67
CD07714	M	1929	74	Non	45		138	449	BBG	BAV3	74
CD11065	M	1950	29	Non	35		140	336	BBD + HBAG	BAV de haut grade (2/1, 3/1)	29
Total			69 ± 9	52 (54,7 %)	52 ± 19	233 ± 69	132 ± 30	435 ± 60			70 ± 9

Tableau 35 – Données cliniques des 95 patients sélectionnés pour constituer la plaque BAVd 1

FC = Fréquence Cardiaque ; PM = Pacemaker ; BBD = Bloc de Branche Droit ; BBG = Bloc de Branche Gauche ; HBAG = HémiBloc Antérieur Gauche ; HBPG = HémiBloc Postérieur Gauche ; DAG = Déviation de l'axe QRS gauche ; BAV1 = BAV de degré 1 ; BAV2 = BAV de degré 2 ; BAV3 = Bloc complet.

IV. Données de couverture des 95 patients BAV isolés séquencés à l'aide du kit HaloPlex

Patient	Couverture moyenne	% bases 1X	% bases 10X	% bases 20X	Nombre total de reads	% reads mappés	% de reads dans les régions cibles
CD10096	101,54	0,99	0,96	0,92	1160884	82,41	79,53
CD09323	109,45	0,99	0,96	0,92	1166984	89,90	78,37
CD08855	114,56	0,98	0,92	0,86	1092060	98,82	79,35
11H0451	130,11	0,98	0,89	0,82	1237406	97,13	80,92
CD10537	131,39	0,99	0,97	0,94	1514578	82,33	78,85
CD08468	144,48	0,99	0,97	0,95	1512618	90,92	78,90
CD08555	147,39	0,99	0,97	0,95	1585044	87,87	79,43
CD10494	150,74	0,98	0,91	0,84	1424238	98,83	80,22
CD10508	160,9	0,98	0,91	0,85	1498006	98,80	80,74
CD06714	162,16	0,99	0,97	0,95	1775206	85,95	79,57
CD08954	166,44	0,99	0,93	0,85	1550952	92,28	84,45
CD10281	173,84	0,98	0,93	0,88	1659730	96,58	81,32
CD10949	177,99	0,99	0,95	0,89	1890180	88,18	78,34
CD07012	184,63	0,99	0,98	0,96	1942924	89,97	79,26
CD10945	194,06	0,98	0,94	0,89	1813676	98,13	81,02
CD08942	216,45	0,98	0,93	0,89	2049958	97,12	81,40
CD08333	230,99	0,98	0,94	0,9	2246218	98,29	78,41
CD06851	235,8	0,99	0,98	0,96	2595770	85,29	79,78
CD07717	239,89	0,99	0,94	0,9	2220652	98,61	81,41
CD08595	245,88	0,99	0,98	0,97	2818154	83,22	78,66
CD08922	269,69	0,99	0,96	0,93	2508206	98,77	81,30
CD07477	270,19	0,99	0,97	0,94	2652018	98,17	78,21
CD11369	278,35	0,99	0,95	0,93	2620314	98,37	80,35
CD10870	299,94	0,98	0,94	0,89	2708472	98,36	82,79
CD09095	302,52	0,99	0,95	0,91	2820132	98,44	80,73
CD08704	302,6	0,99	0,96	0,94	2870752	98,26	80,06
CD09925	306,66	0,98	0,92	0,87	2889286	98,30	80,01
CD09927	315,91	0,99	0,94	0,88	2998650	98,32	79,38
CD10547	325,26	0,99	0,95	0,92	3023874	98,86	80,85
CD10703	338,31	0,99	0,98	0,97	3577006	90,58	77,24
CD07595	362	0,99	0,97	0,95	3379376	98,75	81,00
CD08466	376,5	0,99	0,98	0,96	3538514	96,07	80,93
CD06805	394,07	0,99	0,96	0,92	3687510	98,72	80,72
CD08396	404,65	0,99	0,97	0,95	3820542	98,65	80,06
CD06836	405,28	0,99	0,96	0,94	3807866	98,68	80,21
CD09599	432,69	0,99	0,96	0,94	4014952	98,76	81,28
CD06862	440,01	0,99	0,97	0,95	4156362	98,59	80,06
CD06703	450,72	0,98	0,91	0,87	4133126	98,54	80,09
CD06861	451,59	0,99	0,97	0,94	4244192	98,19	80,83
CD06802	452,11	0,98	0,95	0,91	4420260	98,02	78,34

CD11115	483,06	0,98	0,94	0,9	4590470	98,04	79,87
CD10009	486,92	0,99	0,98	0,96	4363714	95,94	84,27
CD08085	488,64	0,98	0,92	0,88	4712712	97,88	79,47
CD08309	490,36	0,99	0,98	0,96	4746176	95,47	80,22
CD08467	494,64	0,99	0,95	0,92	4343982	98,58	83,13
CD07471	538,88	0,99	0,97	0,96	5261110	98,23	78,35
CD10082	555,15	0,98	0,93	0,9	5148710	97,90	79,23
CD09287	568,85	0,99	0,96	0,93	5937232	97,25	74,36
CD10303	577,26	0,98	0,95	0,92	5439794	98,13	79,94
CD10982	600,04	0,99	0,97	0,95	5625806	98,76	80,39
CD06822	612,13	0,99	0,95	0,92	5773384	97,99	80,31
CD10499	617,06	0,99	0,98	0,96	5819078	98,64	80,26
CD08708	626,22	0,99	0,98	0,97	6135554	91,47	81,38
CD09978	664,84	0,98	0,96	0,93	6426662	98,19	79,11
CD10761	669,35	0,99	0,97	0,95	7302772	99,02	70,22
CD09047	682,26	0,99	0,96	0,93	6219332	99,04	81,94
CD07618	683,85	0,99	0,96	0,94	6584256	98,10	79,06
CD11388	698,19	0,98	0,94	0,92	6658606	98,05	79,47
CD09406	703,68	0,99	0,96	0,94	6645750	98,35	80,13
CD10575	708,32	0,99	0,97	0,95	6571808	98,72	81,26
CD06661	763,73	0,97	0,91	0,88	6979172	98,41	80,34
CD11199	769,5	0,98	0,94	0,92	7299942	98,00	79,52
CD08058	807,26	0,98	0,94	0,91	7274414	98,35	81,57
CD09294	814,53	0,98	0,95	0,92	7791828	98,21	79,58
CD06746	846,1	0,99	0,96	0,94	8025868	98,12	80,15
CD09041	855,56	0,99	0,97	0,95	8077460	98,42	79,99
CD10525	863,55	0,99	0,98	0,97	8188514	98,69	79,91
CD07536	878,97	0,99	0,98	0,97	8196834	98,75	80,92
CD06660	896,19	0,98	0,95	0,93	8315254	98,19	81,59
CD07604	961,86	0,97	0,93	0,91	9146790	97,99	80,02
CD10961	992,46	0,99	0,98	0,97	9345320	98,69	80,29
CD06960	1002,02	0,99	0,98	0,97	9522788	97,84	79,93
CD11372	1023,17	0,99	0,98	0,97	9553428	98,71	80,70
CD06686	1043,29	0,99	0,97	0,96	9599540	98,34	82,29
CD06723	1053,88	0,99	0,98	0,97	9900066	98,44	80,53
CD08061	1062,31	0,99	0,98	0,97	9809294	98,68	81,54
CD06724	1174,14	0,99	0,98	0,98	11017244	98,88	80,69
CD08506	1261,58	0,99	0,98	0,96	11663180	98,79	81,07
CD09094	1267,55	0,99	0,97	0,96	12807118	97,42	76,40
CD07473	1286,6	0,99	0,98	0,98	12528386	94,98	81,10
CD09567	1352,86	0,98	0,95	0,93	12600692	98,03	80,87
CD03690	1354,92	0,99	0,98	0,97	13171784	98,58	77,94
CD06681	1560,39	0,99	0,97	0,95	14766268	98,12	80,18
CD08382	2117,72	0,99	0,99	0,98	19574868	98,83	79,16
CD10272	150,47	0,98	0,94	0,9	1579608	95,89	80,40
CD07551	185,55	0,99	0,96	0,93	1778358	96,81	80,16
CD08576	168,32	0,99	0,97	0,95	1298258	92,02	84,77

CD06623	168,22	0,99	0,97	0,95	1273518	92,83	85,65
CD09096	244,69	0,99	0,98	0,96	1869648	92,14	85,34
CD06789	219,17	0,99	0,98	0,96	1702900	91,43	84,76
CD10623	281,49	0,99	0,98	0,97	2140938	93,54	84,90
CD06852	341,07	0,99	0,99	0,98	2610564	92,64	84,81
CD07505	253,61	0,99	0,98	0,97	2082804	85,93	85,11
CD07714	416,28	0,99	0,99	0,98	3207008	91,8	85,09
CD11065	249,3	0,99	0,98	0,97	1978592	88,81	85,39
Moyenne	539,3	0,99	0,96	0,93	5090651	96,1	80,5

Tableau 36 – Données de couverture des 95 patients BAV isolés séquencés à l'aide du kit HaloPlex

'% bases 1/10/20X' représente le pourcentage de bases couvertes au moins 1/10/20 fois.

V. Articles publiés

V.1. Article 2 : Revue sur les troubles de la conduction cardiaque

X. Daumy, F. Kyndt, V. Probst, R. Redon, J.-J. Schott. 2014. « **Aspect génétique des troubles de la conduction cardiaque** »

Archives des Maladies du Cœur et des Vaisseaux – Pratique

01/2014;2014(224):28–32.doi:10.1016/S1261-94X(14)70587-5

V.2. **Article 3 : Tests d'enrichissement sur une cohorte de patients atteints du syndrome de Brugada**

S. Le Scouarnec, M. Karakachoff, J.-B. Gourraud, P. Lindenbaum, S. Bonnaud, V. Portero, L. Duboscq-Bidot, **X. Daumy**, F. Simonet, R. Teusan, E. Baron, J. Violleau, E. Persyn, L. Bellanger, J. Barc, S. Chatel, R. Martins, P. Mabo, F. Sacher, M. Haïssaguerre, F. Kyndt, S. Schmitt, S. Bézieau, H. Le Marec, C. Dina, J.-J. Schott, V. Probst, R. Redon. « ***Testing the burden of rare variation in arrhythmia-susceptibility genes provides new insights into molecular diagnosis for Brugada syndrome*** », *Hum Mol Genet.* 2015 Feb 3. pii: ddv036. [Epub ahead of print], PMID: 25650408.

E. BIBLIOGRAPHIE

- the 1000 Genomes Project. 2011. « Variation in Genome-Wide Mutation Rates within and between Human Families ». *Nature Genetics* 43 (7): 712-14. doi:10.1038/ng.862.
- Abriel, Hugues. 2007. « Roles and Regulation of the Cardiac Sodium Channel Nav1.5: Recent Insights from Experimental Studies ». *Cardiovascular Research* 76 (3): 381-89. doi:10.1016/j.cardiores.2007.07.019.
- . 2010. « Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Special Issue: Ion Channels, 48 (1): 2-11. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.08.025.
- Abriel, Hugues, Ninda Syam, Valentin Sottas, Mohamed Yassine Amarouch, et Jean-Sébastien Rougier. 2012. « TRPM4 channels in the cardiovascular system: Physiology, pathophysiology, and pharmacology ». *Biochemical Pharmacology* 84 (7): 873-81. doi:10.1016/j.bcp.2012.06.021.
- Adsit, Graham S., Ravi Vaidyanathan, Carla M. Galler, John W. Kyle, et Jonathan C. Makielski. 2013. « Channelopathies from Mutations in the Cardiac Sodium Channel Protein Complex ». *Journal of molecular and cellular cardiology* 61 (août): 34-43. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.03.017.
- Adzhubei, Ivan A., Steffen Schmidt, Leonid Peshkin, Vasily E. Ramensky, Anna Gerasimova, Peer Bork, Alexey S. Kondrashov, et Shamil R. Sunyaev. 2010. « A Method and Server for Predicting Damaging Missense Mutations ». *Nature Methods* 7 (4): 248-49. doi:10.1038/nmeth0410-248.
- Akai, Jun, Naomasa Makita, Harumizu Sakurada, Nobumasa Shirai, Kazuo Ueda, Akira Kitabatake, Kiyoshi Nakazawa, Akinori Kimura, et Masayasu Hiraoka. 2000. « A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome ». *FEBS Letters* 479 (1-2): 29-34. doi:10.1016/S0014-5793(00)01875-5.
- Ambrosi, Aurélie, Sven-Erik Sonesson, et Marie Wahren-Herlenius. 2014. « Molecular mechanisms of congenital heart block ». *Experimental Cell Research, Rare Diseases – Molecular Insights*, 2014, 325 (1): 2-9. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.003.
- Arad, Michael, D. Woodrow Benson, Antonio R. Perez-Atayde, William J. McKenna, Elizabeth A. Sparks, Ronald J. Kanter, Kate McGarry, J.G. Seidman, et Christine E. Seidman. 2002. « Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (3): 357-62. doi:10.1172/JCI14571.
- Arbustini, Eloisa, Andrea Pilotto, Alessandra Repetto, Maurizia Grasso, Andrea Negri, Marta Diegoli, Carlo Campana, et al. 2002. « Autosomal Dominant Dilated Cardiomyopathy with Atrioventricular Block: A Lamin A/C Defect-Related Disease ». *Journal of the American College of Cardiology* 39 (6): 981-90.
- Arnolds, David E., Fang Liu, John P. Fahrenbach, Gene H. Kim, Kurt J. Schillinger, Scott Smemo, Elizabeth M. McNally, Marcelo A. Nobrega, Vickas V. Patel, et Ivan P. Moskowitz. 2012. « TBX5 Drives Scn5a Expression to Regulate Cardiac Conduction System Function ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2509-18. doi:10.1172/JCI62617.
- Baban, Anwar, Letizia Pitto, Silvia Pulignani, Monica Cresci, Laura Mariani, Carolina Gambacciani, Maria Cristina Digilio, Giacomo Pongiglione, et Sonia Albanese. 2014. « Holt–Oram Syndrome with Intermediate Atrioventricular Canal Defect, and Aortic

- Coarctation: Functional Characterization of a de Novo TBX5 Mutation ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 164 (6): 1419-24. doi:10.1002/ajmg.a.36459.
- Baban, Anwar, Alex Vincent Postma, Monica Marini, Gianluca Trocchio, Antonella Santilli, Monica Pelegrini, Pietro Sirleto, et al. 2014. « Identification of TBX5 Mutations in a Series of 94 Patients with Tetralogy of Fallot ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 164 (12): 3100-3107. doi:10.1002/ajmg.a.36783.
- Bailey, Jeffrey A., Amy M. Yavor, Hillary F. Massa, Barbara J. Trask, et Evan E. Eichler. 2001. « Segmental Duplications: Organization and Impact Within the Current Human Genome Project Assembly ». *Genome Research* 11 (6): 1005-17. doi:10.1101/gr.187101.
- Baker, Monya. 2010. « Next-Generation Sequencing: Adjusting to Data Overload ». *Nature Methods* 7 (7): 495-99. doi:10.1038/nmeth0710-495.
- Balmer, C., M. Fasnacht, M. Rahn, L. Molinari, et U. Bauersfeld. 2002. « Long-Term Follow up of Children with Congenital Complete Atrioventricular Block and the Impact of Pacemaker Therapy ». *EP Europace* 4 (4): 345-49. doi:10.1053/eupc.2002.0266.
- Balsler, Jeffrey R. 1999. « Structure and Function of the Cardiac Sodium Channels ». *Cardiovascular Research* 42 (2): 327-28. doi:10.1016/S0008-6363(99)00031-0.
- Barra, Sérgio Nuno Craveiro, Rui Providência, Luís Paiva, José Nascimento, et António Leitão Marques. 2012. « A Review on Advanced Atrioventricular Block in Young or Middle-Aged Adults ». *Pacing and Clinical Electrophysiology* 35 (11): 1395-1405. doi:10.1111/j.1540-8159.2012.03489.x.
- Barr, L., M. M. Dewey, et W. Berger. 1965. « Propagation of Action Potentials and the Structure of the Nexus in Cardiac Muscle ». *The Journal of General Physiology* 48 (5): 797-823. doi:10.1085/jgp.48.5.797.
- Baruteau, Alban-Elouen, Albin Behaghel, Swanny Fouchard, Philippe Mabo, Jean-Jacques Schott, Christian Dina, Stéphanie Chatel, et al. 2012. « Parental Electrocardiographic Screening Identifies a High Degree of Inheritance for Congenital and Childhood Nonimmune Isolated Atrioventricular Block ». *Circulation* 126 (12): 1469-77. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.069161.
- Baruteau, Alban-Elouen, Swanny Fouchard, Albin Behaghel, Philippe Mabo, Elisabeth Villain, Jean-Benoit Thambo, François Marçon, et al. 2012. « Characteristics and Long-Term Outcome of Non-Immune Isolated Atrioventricular Block Diagnosed in Utero or Early Childhood: A Multicentre Study ». *European Heart Journal* 33 (5): 622-29. doi:10.1093/eurheartj/ehr347.
- Baruteau, Alban-Elouen, Vincent Probst, et Hugues Abriel. 2015. « Inherited Progressive Cardiac Conduction Disorders ». *Current Opinion in Cardiology* 30 (1): 33-39. doi:10.1097/HCO.0000000000000134.
- Basson, Craig T., David R. Bachinsky, Robert C. Lin, Tatjana Levi, Jacob A. Elkins, Johann Soultz, David Grayzel, et al. 1997. « Mutations in Human Cause Limb and Cardiac Malformation in Holt-Oram Syndrome ». *Nature Genetics* 15 (1): 30-35. doi:10.1038/ng0197-30.
- Bébarová, Markéta, Tom O'Hara, Jan L. M. C. Geelen, Roselie J. Jongbloed, Carl Timmermans, Yvonne H. Arens, Luz-Maria Rodriguez, Yoram Rudy, et Paul G. A. Volders. 2008. « Subepicardial phase 0 block and discontinuous transmural conduction underlie right precordial ST-segment elevation by a SCN5A loss-of-function mutation ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 295 (1): H48-58. doi:10.1152/ajpheart.91495.2007.
- Bécane, H. M., G. Bonne, S. Varnous, A. Muchir, V. Ortega, E. H. Hammouda, J. A. Urtizberea, et al. 2000. « High Incidence of Sudden Death with Conduction System and Myocardial

- Disease due to Lamins A and C Gene Mutation ». *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* 23 (11 Pt 1): 1661-66.
- Benedetti, S., I. Menditto, M. Degano, C. Rodolico, L. Merlini, A. D'Amico, L. Palmucci, et al. 2007. « Phenotypic Clustering of Lamin A/C Mutations in Neuromuscular Patients ». *Neurology* 69 (12): 1285-92. doi:10.1212/01.wnl.0000261254.87181.80.
- Ben-Harush, Kfir, Naama Wiesel, Daphna Frenkiel-Krispin, Dorothee Moeller, Eyal Soreq, Ueli Aebi, Harald Herrmann, Yosef Gruenbaum, et Ohad Medalia. 2009. « The Supramolecular Organization of the C. elegans Nuclear Lamin Filament ». *Journal of Molecular Biology* 386 (5): 1392-1402. doi:10.1016/j.jmb.2008.12.024.
- Benito, Begoña, Ramon Brugada, Rosa Maria Perich, Eric Lizotte, Juan Cinca, Lluís Mont, Antonio Berruezo, et al. 2008. « A mutation in the sodium channel is responsible for the association of long QT syndrome and familial atrial fibrillation ». *Heart Rhythm* 5 (10): 1434-40. doi:10.1016/j.hrthm.2008.07.013.
- Benson, D. Woodrow. 2004. « Genetics of Atrioventricular Conduction Disease in Humans ». *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 280A (2): 934-39. doi:10.1002/ar.a.20099.
- Benson, D. Woodrow, G. Michael Silberbach, Ann Kavanaugh-McHugh, Carol Cottrill, Yizhong Zhang, Steve Riggs, Octavia Smalls, et al. 1999. « Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways ». *Journal of Clinical Investigation* 104 (11): 1567-73.
- Benson, D. Woodrow, Dao W. Wang, Macaira Dymont, Timothy K. Knilans, Frank A. Fish, Margaret J. Strieper, Thomas H. Rhodes, et Alfred L. George. 2003. « Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A) ». *Journal of Clinical Investigation* 112 (7): 1019-28. doi:10.1172/JCI200318062.
- Berlo, Jop H. van, Willem G. de Voogt, Anneke J. van der Kooi, J. Peter van Tintelen, Gisèle Bonne, Rabah Ben Yaou, Denis Duboc, et al. 2005. « Meta-Analysis of Clinical Characteristics of 299 Carriers of LMNA Gene Mutations: Do Lamin A/C Mutations Portend a High Risk of Sudden Death? ». *Journal of Molecular Medicine* 83 (1): 79-83. doi:10.1007/s00109-004-0589-1.
- Bertrand, Anne T., Khadija Chikhaoui, Rabah Ben Yaou, et Gisèle Bonne. 2011a. « [Laminopathies: one gene, several diseases] ». *Biologie Aujourd'hui* 205 (3): 147-62. doi:10.1051/jbio/2011017.
- . 2011b. « Clinical and Genetic Heterogeneity in Laminopathies ». *Biochemical Society Transactions* 39 (6): 1687-92. doi:10.1042/BST20110670.
- Bezzina, Connie R., Julien Barc, Yuka Mizusawa, Carol Ann Remme, Jean-Baptiste Gourraud, Floriane Simonet, Arie O. Verkerk, et al. 2013. « Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death ». *Nature genetics* 45 (9): 1044-49. doi:10.1038/ng.2712.
- Bezzina, Connie R., Martin B. Rook, W. Antoinette Groenewegen, Lucas J. Herfst, Allard C. van der Wal, Jan Lam, Habo J. Jongsma, Arthur A. M. Wilde, et Marcel M. A. M. Mannens. 2003. « Compound Heterozygosity for Mutations (W156X and R225W) in SCN5A Associated With Severe Cardiac Conduction Disturbances and Degenerative Changes in the Conduction System ». *Circulation Research* 92 (2): 159-68. doi:10.1161/01.RES.0000052672.97759.36.
- Bezzina, Connie R., Wataru Shimizu, Ping Yang, Tamara T. Koopmann, Michael W. T. Tanck, Yoshihiro Miyamoto, Shiro Kamakura, Dan M. Roden, et Arthur A. M. Wilde. 2006. « Common Sodium Channel Promoter Haplotype in Asian Subjects Underlies Variability in Cardiac Conduction ». *Circulation* 113 (3): 338-44. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.580811.

- Bezzina, Connie, Marieke W. Veldkamp, Maarten P. van den Berg, Alex V. Postma, Martin B. Rook, Jan-Willem Viersma, Irene M. van Langen, et al. 1999. « A Single Na⁺ Channel Mutation Causing Both Long-QT and Brugada Syndromes ». *Circulation Research* 85 (12): 1206-13. doi:10.1161/01.RES.85.12.1206.
- Bhuiyan, Zahurul A., Maarten P. van den Berg, J. Peter van Tintelen, Margreet T. E. Bink-Boelkens, Ans C. P. Wiesfeld, Marielle Alders, Alex V. Postma, Irene van Langen, Marcel M. A. M. Mannens, et Arthur A. M. Wilde. 2007. « Expanding Spectrum of Human RYR2-Related Disease New Electrocardiographic, Structural, and Genetic Features ». *Circulation* 116 (14): 1569-76. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.711606.
- Bione, Silvia, Elena Maestrini, Stefano Rivella, Mita Mancini, Stefano Regis, Giovanni Romeo, et Daniela Toniolo. 1994. « Identification of a Novel X-Linked Gene Responsible for Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 8 (4): 323-27. doi:10.1038/ng1294-323.
- Blair, Edward, Charles Redwood, Houman Ashrafian, Marisa Oliveira, John Broxholme, Bronwyn Kerr, Anthony Salmon, Ingegerd Östman-Smith, et Hugh Watkins. 2001. « Mutations in the γ 2 Subunit of AMP-Activated Protein Kinase Cause Familial Hypertrophic Cardiomyopathy: Evidence for the Central Role of Energy Compromise in Disease Pathogenesis ». *Human Molecular Genetics* 10 (11): 1215-20. doi:10.1093/hmg/10.11.1215.
- Bogarapu, Soujanya, Steven B. Bleyl, Amy Calhoun, David Viskochil, Elizabeth V. Saarel, Melanie D. Everitt, et Deborah U. Frank. 2014. « Phenotype of a Patient with Contiguous Deletion of TBX5 and TBX3: Expanding the Disease Spectrum ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 164 (5): 1304-9. doi:10.1002/ajmg.a.36447.
- Boldt, Leif-Hendrik, Maximilian G. Posch, Andreas Perrot, Michael Polotzki, Sascha Rolf, Abdul S. Parwani, Martin Huemer, Alexander Wutzler, Cemil Özcelik, et Wilhelm Haverkamp. 2010. « Mutational analysis of the PITX2 and NKX2-5 genes in patients with idiopathic atrial fibrillation ». *International Journal of Cardiology* 145 (2): 316-17. doi:10.1016/j.ijcard.2009.11.023.
- Bollati, Michela, Alberto Barbiroli, Valentina Favalli, Eloisa Arbustini, Philippe Charron, et Martino Bolognesi. 2012. « Structures of the lamin A/C R335W and E347K mutants: Implications for dilated cardiomyopathies ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418 (2): 217-21. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.136.
- Bonne, Gisèle, Marina Raffaele Di Barletta, Shaida Varnous, Henri-Marc Bécane, El-Hadi Hammouda, Luciano Merlini, Francesco Muntoni, et al. 1999. « Mutations in the Gene Encoding Lamin A/C Cause Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 21 (3): 285-88. doi:10.1038/6799.
- Bonne, G., E. Mercuri, A. Muchir, A. Urtizberea, H. M. Bécane, D. Recan, L. Merlini, et al. 2000. « Clinical and Molecular Genetic Spectrum of Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy due to Mutations of the Lamin A/C Gene ». *Annals of Neurology* 48 (2): 170-80. doi:10.1002/1531-8249(200008)48:2<170::AID-ANA6>3.0.CO;2-J.
- Boogerd, Kees-Jan, L. Y. Elaine Wong, Vincent M. Christoffels, Meinke Klarenbeek, Jan M. Ruijter, Antoon F. M. Moorman, et Phil Barnett. 2008. « Msx1 and Msx2 Are Functional Interacting Partners of T-Box Factors in the Regulation of Connexin43 ». *Cardiovascular Research* 78 (3): 485-93. doi:10.1093/cvr/cvn049.
- Boyett, M. R., S. M. Harrison, N. C. Janvier, S. O. McMorn, J. M. Owen, et Z. Shui. 1996. « A List of Vertebrate Cardiac Ionic Currents Nomenclature, Properties, Function and Cloned Equivalents ». *Cardiovascular Research* 32 (3): 455-81. doi:10.1016/S0008-6363(95)00228-6.

- Bozkaya, Yasemin T., Hikmet H. Aydin, Handan A. Celik, Meral Kayikcioglu, Serdar Payzin, Hakan Kultursay, Mehmet Aydin, Murat Yesil, Levent H. Can, et Can Hasdemir. 2008. « Increased Myocardial Collagen Turnover in Patients with Progressive Cardiac Conduction Disease ». *Pacing and Clinical Electrophysiology* 31 (10): 1284-90. doi:10.1111/j.1540-8159.2008.01179.x.
- Branton, Daniel, David W. Deamer, Andre Marziali, Hagan Bayley, Steven A. Benner, Thomas Butler, Massimiliano Di Ventra, et al. 2008. « The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing ». *Nature Biotechnology* 26 (10): 1146-53. doi:10.1038/nbt.1495.
- Bredenoord, Annelien L., Hester Y. Kroes, Edwin Cuppen, Michael Parker, et Johannes J. M. van Delden. 2011. « Disclosure of individual genetic data to research participants: the debate reconsidered ». *Trends in Genetics* 27 (2): 41-47. doi:10.1016/j.tig.2010.11.004.
- Brink, A. J., et M. Torrington. 1977. « Progressive Familial Heart Block--Two Types ». *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 52 (2): 53-59.
- Brink, Paul A., Alet Ferreira, Johanna C. Moolman, Hettie W. Weymar, Pieter-Luttig van der Merwe, et Valerie A. Corfield. 1995. « Gene for Progressive Familial Heart Block Type I Maps to Chromosome 19q13 ». *Circulation* 91 (6): 1633-40. doi:10.1161/01.CIR.91.6.1633.
- Brodsky, Gary L., Francesco Muntoni, Snjezana Miodic, Gianfranco Sinagra, Caroline Sewry, et Luisa Mestroni. 2000. « Lamin A/C Gene Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy With Variable Skeletal Muscle Involvement ». *Circulation* 101 (5): 473-76. doi:10.1161/01.CIR.101.5.473.
- Broers, J. L. V., F. C. S. Ramaekers, G. Bonne, R. Ben Yaou, et C. J. Hutchison. 2006. « Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Ageing ». *Physiological Reviews* 86 (3): 967-1008. doi:10.1152/physrev.00047.2005.
- Brucato, A, A Jonzon, D Friedman, L D Allan, G Vignati, M Gasparini, J I Stein, S Montella, M Michaelsson, et J Buyon. 2003. « Proposal for a New Definition of Congenital Complete Atrioventricular Block ». *Lupus* 12 (6): 427-35.
- Camm, A. J., et R. S. Bexton. 1984. « Congenital Complete Heart Block ». *European Heart Journal* 5 (suppl A): 115-17. doi:10.1093/eurheartj/5.suppl_A.115.
- Cartegni, Luca, Marina Raffaele di Barletta, Rita Barresi, Stefano Squarzone, Patrizia Sabatelli, Nadir Maraldi, Marina Mora, et al. 1997. « Heart-Specific Localization of Emerin: New Insights Into Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 6 (13): 2257-64. doi:10.1093/hmg/6.13.2257.
- Casini, Simona, Hanno L. Tan, Zahurul A. Bhuiyan, Connie R. Bezzina, Phil Barnett, Elisabetta Cerbai, Alessandro Mugelli, Arthur A. M. Wilde, et Marieke W. Veldkamp. 2007. « Characterization of a Novel SCN5A Mutation Associated with Brugada Syndrome Reveals Involvement of DIIS4-S5 Linker in Slow Inactivation ». *Cardiovascular Research* 76 (3): 418-29. doi:10.1016/j.cardiores.2007.08.005.
- Chambers, John C., Jing Zhao, Cesare M. N. Terracciano, Connie R. Bezzina, Weihua Zhang, Riyaz Kaba, Manoraj Navaratnarajah, et al. 2010. « Genetic Variation in SCN10A Influences Cardiac Conduction ». *Nature Genetics* 42 (2): 149-52. doi:10.1038/ng.516.
- Chang, Chien-Chih, Said Acharfi, Mei-Hwan Wu, Fu-Tien Chiang, Jou-Kou Wang, Tseng-Chen Sung, et Mohamed Chahine. 2004. « A Novel SCN5A Mutation Manifests as a Malignant Form of Long QT Syndrome with Perinatal Onset of Tachycardia/bradycardia ». *Cardiovascular Research* 64 (2): 268-78. doi:10.1016/j.cardiores.2004.07.007.
- Chang, Shuai, Shuo Huang, Jin He, Feng Liang, Peiming Zhang, Shengqing Li, Xiang Chen, Otto Sankey, et Stuart Lindsay. 2010. « Electronic Signatures of all Four DNA

- Nucleosides in a Tunneling Gap ». *Nano Letters* 10 (3): 1070-75. doi:10.1021/nl1001185.
- Charron, Philippe, Marc Genest, Pascale Richard, Michel Komajda, et Gilbert Pochmalicki. 2007. « A Familial Form of Conduction Defect Related to a Mutation in the PRKAG2 Gene ». *EP Europace* 9 (8): 597-600. doi:10.1093/europace/eum071.
- Check Hayden, Erika. 2014a. « Is the \$1,000 genome for real? ». *Nature*, janvier. doi:10.1038/nature.2014.14530.
- . 2014b. « Data from pocket-sized genome sequencer unveiled ». *Nature*, février. doi:10.1038/nature.2014.14724.
- . 2014c. « Technology: The \$1,000 genome ». *Nature* 507 (7492): 294-95. doi:10.1038/507294a.
- Cheng, Henrique, Andreas Beck, Pierre Launay, Stefan A. Gross, Alexander J. Stokes, Jean-Pierre Kinet, Andrea Fleig, et Reinhold Penner. 2007. « TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic β -cells ». *Cell Calcium* 41 (1): 51-61. doi:10.1016/j.ceca.2006.04.032.
- Chen, Qiuyun, Glenn E. Kirsch, Danmei Zhang, Ramon Brugada, Josep Brugada, Pedro Brugada, Domenico Potenza, et al. 1998. « Genetic Basis and Molecular Mechanism for Idiopathic Ventricular Fibrillation ». *Nature* 392 (6673): 293-96. doi:10.1038/32675.
- Chen, Tiehua, Masashi Inoue, et Michael F Sheets. 2005. « Reduced voltage dependence of inactivation in the SCN5A sodium channel mutation delF1617 ». *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2666-76. doi:10.1152/ajpheart.00521.2004.
- Chiaromonte, F., V. B. Yap, et W. Miller. 2002. « Scoring Pairwise Genomic Sequence Alignments ». *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, 115-26.
- Christoffels, Vincent M., et Antoon F. M. Moorman. 2009. « Development of the Cardiac Conduction System Why Are Some Regions of the Heart More Arrhythmogenic Than Others? ». *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2 (2): 195-207. doi:10.1161/CIRCEP.108.829341.
- Chronister, Connie S. 2009. « Congenital Complete Atrioventricular Block in a Young Man: A Case Study ». *Critical Care Nurse* 29 (5): 45-56. doi:10.4037/ccn2009297.
- Combrink, J. M., W. H. Davis, et H. W. Snyman. 1962. « Familial bundle branch block ». *American Heart Journal* 64 (3): 397-400. doi:10.1016/0002-8703(62)90156-4.
- Consortium, International Human Genome Sequencing. 2004. « Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome ». *Nature* 431 (7011): 931-45. doi:10.1038/nature03001.
- Consortium, The ENCODE Project. 2012. « An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome ». *Nature* 489 (7414): 57-74. doi:10.1038/nature11247.
- Cordeiro, Jonathan M., Hector Barajas-Martinez, Kui Hong, Elena Burashnikov, Ryan Pfeiffer, Anne-Marie Orsino, Yue Sheng Wu, et al. 2006. « Compound Heterozygous Mutations P336L and I1660V in the Human Cardiac Sodium Channel Associated With the Brugada Syndrome ». *Circulation* 114 (19): 2026-33. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627489.
- Danecek, Petr, Adam Auton, Goncalo Abecasis, Cornelis A. Albers, Eric Banks, Mark A. DePristo, Robert E. Handsaker, et al. 2011. « The variant call format and VCFtools ». *Bioinformatics* 27 (15): 2156-58. doi:10.1093/bioinformatics/btr330.
- Darbar, Dawood. 2008. « Cardiac Sodium Channel Variants: Action Players with Many Faces ». *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society* 5 (10): 1441-43. doi:10.1016/j.hrthm.2008.08.008.

- Davey, S. 2014. « Next Generation Sequencing: Considering the Ethics ». *International Journal of Immunogenetics* 41 (6): 457-62. doi:10.1111/iji.12155.
- Davis, Lloyd M., Mark E. Rodefeld, Karen Green, Eric C. Beyer, et Jeffrey E. Saffitz. 1995. « Gap Junction Protein Phenotypes of the Human Heart and Conduction System ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 6 (10): 813-22. doi:10.1111/j.1540-8167.1995.tb00357.x.
- Davydov, Eugene V., David L. Goode, Marina Sirota, Gregory M. Cooper, Arend Sidow, et Serafim Batzoglou. 2010. « Identifying a High Fraction of the Human Genome to be under Selective Constraint Using GERP++ ». *PLoS Comput Biol* 6 (12): e1001025. doi:10.1371/journal.pcbi.1001025.
- Delorme, Bruno, Edgar Dahl, Thérèse Jarry-Guichard, Jean-Paul Briand, Klaus Willecke, Daniel Gros, et Magali Théveniau-Ruissy. 1997. « Expression Pattern of Connexin Gene Products at the Early Developmental Stages of the Mouse Cardiovascular System ». *Circulation Research* 81 (3): 423-37. doi:10.1161/01.RES.81.3.423.
- De Meeus, A., E. Stephan, S. Debrus, M.-K. Jean, J. Loiselet, J. Weissenbach, J. Demaille, et P. Bouvagnet. 1995. « An Isolated Cardiac Conduction Disease Maps to Chromosome 19q ». *Circulation Research* 77 (4): 735-40. doi:10.1161/01.RES.77.4.735.
- Den Hoed, Marcel, Mark Eijgelsheim, Tõnu Esko, Bianca J J M Brundel, David S Peal, David M Evans, Ilja M Nolte, et al. 2013. « Identification of heart rate-associated loci and their effects on cardiac conduction and rhythm disorders ». *Nature genetics* 45 (6): 621-31. doi:10.1038/ng.2610.
- Ector, H., A. F. Rickards, L. Kappenberger, P. Vardas, A. Oto, M. Santini, R. Sutton, on behalf of the Working Group on Cardiac Pacing, et a working group of the European Society of Cardiology. 2000. « The Registry of the European Working Group on Cardiac Pacing (EWGCP) ». *Europace* 2 (3): 251-55. doi:10.1053/eupc.2000.0109.
- Eichler, Evan E., Jonathan Flint, Greg Gibson, Augustine Kong, Suzanne M. Leal, Jason H. Moore, et Joseph H. Nadeau. 2010. « Missing Heritability and Strategies for Finding the Underlying Causes of Complex Disease ». *Nature Reviews Genetics* 11 (6): 446-50. doi:10.1038/nrg2809.
- Elizari, Marcelo V., Rafael S. Acunzo, et Marcela Ferreira. 2007. « Hemiblocks Revisited ». *Circulation* 115 (9): 1154-63. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.637389.
- Ellinor, Patrick T., Edwin G. Nam, Marisa A. Shea, David J. Milan, Jeremy N. Ruskin, et Calum A. MacRae. 2008. « Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation ». *Heart Rhythm* 5 (1): 99-105. doi:10.1016/j.hrthm.2007.09.015.
- Eriksson, Maria, W. Ted Brown, Leslie B. Gordon, Michael W. Glynn, Joel Singer, Laura Scott, Michael R. Erdos, et al. 2003. « Recurrent de Novo Point Mutations in Lamin A Cause Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome ». *Nature* 423 (6937): 293-98. doi:10.1038/nature01629.
- Eriksson, Peter, Per-Olof Hansson, Henry Eriksson, et Mikael Dellborg. 1998. « Bundle-Branch Block in a General Male Population The Study of Men Born 1913 ». *Circulation* 98 (22): 2494-2500. doi:10.1161/01.CIR.98.22.2494.
- Fatkin, Diane, Calum MacRae, Takeshi Sasaki, Matthew R. Wolff, Maurizio Porcu, Michael Frenneaux, John Atherton, et al. 1999. « Missense Mutations in the Rod Domain of the Lamin A/C Gene as Causes of Dilated Cardiomyopathy and Conduction-System Disease ». *New England Journal of Medicine* 341 (23): 1715-24. doi:10.1056/NEJM199912023412302.
- Francis, Amirtharaj, Balaraju Sunitha, Kandavalli Vinodh, Kiran Polavarapu, Shiva Krishna Katkam, Sailesh Modi, M. M. Srinivas Bharath, Narayanappa Gayathri, Atchayaram Nalini, et Kumarasamy Thangaraj. 2014. « Novel TCAP Mutation c.32C>A Causing

- Limb Girdle Muscular Dystrophy 2G ». *PLoS ONE* 9 (7). doi:10.1371/journal.pone.0102763.
- Frank, Marina, Angela Wirth, René P. Andrié, Maria M. Kreuzberg, Radoslaw Dobrowolski, Gerald Seifert, Stefan Offermanns, Georg Nickenig, Klaus Willecke, et Jan W. Schröckel. 2012. « Connexin45 Provides Optimal Atrioventricular Nodal Conduction in the Adult Mouse Heart ». *Circulation Research* 111 (12): 1528-38. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.270561.
- Gaborit, Nathalie, Sabrina Le Bouter, Viktoria Szuts, Andras Varro, Denis Escande, Stanley Nattel, et Sophie Demolombe. 2007. « Regional and Tissue Specific Transcript Signatures of Ion Channel Genes in the Non-Diseased Human Heart ». *The Journal of Physiology* 582 (2): 675-93. doi:10.1113/jphysiol.2006.126714.
- Garg, Abhimanyu, Rebecca A Speckman, et Anne M Bowcock. 2002. « Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene ». *The American Journal of Medicine* 112 (7): 549-55. doi:10.1016/S0002-9343(02)01070-7.
- Gavillet, Bruno, Jean-Sébastien Rougier, Andrea A. Domenighetti, Romina Behar, Christophe Boixel, Patrick Ruchat, Hans-Anton Lehr, Thierry Pedrazzini, et Hugues Abriel. 2006. « Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by a Multiprotein Complex Composed of Syntrophins and Dystrophin ». *Circulation Research* 99 (4): 407-14. doi:10.1161/01.RES.0000237466.13252.5e.
- Gazes, Peter C., Rodney M. Culler, Elsie Taber, et Thaddeus E. Kelly. 1965. « Congenital Familial Cardiac Conduction Defects ». *Circulation* 32 (1): 32-34. doi:10.1161/01.CIR.32.1.32.
- Ge, Junbo, Aijun Sun, Vesa Pajajänen, Shijun Wang, Chunxi Su, Zhiyin Yang, Ying Li, et al. 2008. « Molecular and Clinical Characterization of a Novel SCN5A Mutation Associated With Atrioventricular Block and Dilated Cardiomyopathy ». *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1 (2): 83-92. doi:10.1161/CIRCEP.107.750752.
- Gilbert-Barness, Enid, et Lewis A. Barness. 2006. « Festschrift for Dr. John M. Opitz: Pathogenesis of Cardiac Conduction Disorders in Children Genetic and Histopathologic Aspects ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 140A (19): 1993-2006. doi:10.1002/ajmg.a.31440.
- Godin, J. F., G. Nicolas, J. B. Bouhour, et J. Horeau. 1973. « Familial form of atrio-ventricular conduction disorders. Apropos of a case of syncopal atrioventricular block in a 21-month-old child. Pacemaker implantation ». *Annales De Cardiologie Et D'angéiologie* 22 (4): 331-37.
- Goizet, C, Y Ben, L Demay, P Richard, S Bouillot, M Rouanet, E Hermosilla, et al. 2004. « A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia ». *Journal of Medical Genetics* 41 (3): e29. doi:10.1136/jmg.2003.013383.
- Gollob, Michael H., Martin S. Green, Anthony S.-L. Tang, Tanya Gollob, Akihiko Karibe, Al-Sayegh Hassan, Ferhaan Ahmad, et al. 2001. « Identification of a Gene Responsible for Familial Wolff-Parkinson-White Syndrome ». *New England Journal of Medicine* 344 (24): 1823-31. doi:10.1056/NEJM200106143442403.
- Gollob, Michael H., John J. Seger, Tanya N. Gollob, Terry Tapscott, Oscar Gonzales, Linda Bachinski, et Robert Roberts. 2001. « Novel PRKAG2 Mutation Responsible for the Genetic Syndrome of Ventricular Preexcitation and Conduction System Disease With Childhood Onset and Absence of Cardiac Hypertrophy ». *Circulation* 104 (25): 3030-33. doi:10.1161/hc5001.102111.
- Gonzales, Albert L., Zarine I. Garcia, Gregory C. Amberg, et Scott Earley. 2010. « Pharmacological Inhibition of TRPM4 Hyperpolarizes Vascular Smooth Muscle ».

- American Journal of Physiology - Cell Physiology* 299 (5): C1195-1202. doi:10.1152/ajpcell.00269.2010.
- Gourraud, Jean Baptiste, Florence Kyndt, Swanny Fouchard, Eric Rendu, Philippe Jaafar, Claude Gully, Karim Gacem, et al. 2012. « Identification of a Strong Genetic Background for Progressive Cardiac Conduction Defect by Epidemiological Approach ». *Heart* 98 (17): 1305-10. doi:10.1136/heartjnl-2012-301872.
- Govindan, Malini, David Ward, et Elijah Behr. 2010. « A Rare Connection: Fasciculoventricular Pathway in PRKAG2 Disease ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 21 (3): 329-32. doi:10.1111/j.1540-8167.2009.01578.x.
- Grada, Ayman, et Kate Weinbrecht. 2013. « Next-Generation Sequencing: Methodology and Application ». *Journal of Investigative Dermatology* 133 (8): e11. doi:10.1038/jid.2013.248.
- Grant, Augustus O., Michael P. Carboni, Valentina Neplioueva, C. Frank Starmer, Mirella Memmi, Carlo Napolitano, et Silvia Priori. 2002. « Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation ». *The Journal of Clinical Investigation* 110 (8): 1201-9. doi:10.1172/JCI15570.
- Greenspahn, BRUCE R., PABLO DENES, WILLIAM DANIEL, et KENNETH M. ROSEN. 1976. « Chronic Bifascicular Block: Evaluation of Familial Factors ». *Annals of Internal Medicine* 84 (5): 521-25. doi:10.7326/0003-4819-84-5-521.
- Gudbjartsson, Daniel F., David O. Arnar, Anna Helgadóttir, Solveig Gretarsdóttir, Hilma Holm, Asgeir Sigurdsson, Adalbjorg Jonasdóttir, et al. 2007. « Variants Conferring Risk of Atrial Fibrillation on Chromosome 4q25 ». *Nature* 448 (7151): 353-57. doi:10.1038/nature06007.
- Guntheroth, Warren, Lani Chun, Kristen K. Patton, Mark M. Matsushita, Richard L. Page, et Wendy H. Raskind. 2012. « Wenckebach Periodicity at Rest That Normalizes With Tachycardia in a Family With a NKX2.5 Mutation ». *The American Journal of Cardiology* 110 (11): 1646-50. doi:10.1016/j.amjcard.2012.07.033.
- Hagendorff, Andreas, Burghard Schumacher, Susanne Kirchhoff, Berndt Lüderitz, et Klaus Willecke. 1999. « Conduction Disturbances and Increased Atrial Vulnerability in Connexin40-Deficient Mice Analyzed by Transesophageal Stimulation ». *Circulation* 99 (11): 1508-15. doi:10.1161/01.CIR.99.11.1508.
- Haque, Farhana, David J. Lloyd, Dawn T. Smallwood, Carolyn L. Dent, Catherine M. Shanahan, Andrew M. Fry, Richard C. Trembath, et Sue Shackleton. 2006. « SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (10): 3738-51. doi:10.1128/MCB.26.10.3738-3751.2006.
- Harris, Brett S., Robert G. Gourdie, et Terrence X. O'Brien. 2005. « Atrioventricular Conduction System and Transcription Factors Nkx2.5 and Msx2 ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 16 (1): 86-87. doi:10.1046/j.1540-8167.2005.04667.x.
- Hayashi, Takeharu, Takuro Arimura, Manatsu Itoh-Satoh, Kazuo Ueda, Shigeru Hohda, Natsuko Inagaki, Megumi Takahashi, et al. 2004. « Tcap Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy and Dilated Cardiomyopathy ». *Journal of the American College of Cardiology* 44 (11): 2192-2201. doi:10.1016/j.jacc.2004.08.058.
- Hedley, Paula L., Poul Jørgensen, Sarah Schlamowitz, Romilda Wangari, Johanna Moolman-Smook, Paul A. Brink, Jørgen K. Kanters, Valerie A. Corfield, et Michael Christiansen. 2009. « The Genetic Basis of Long QT and Short QT Syndromes: A Mutation Update ». *Human Mutation* 30 (11): 1486-1511. doi:10.1002/humu.21106.
- Herfst, Lucas J., Franck Potet, Connie R. Bezzina, W. Antoinette Groenewegen, Hervé Le Marec, Theo M. Hoorntje, Sophie Demolombe, et al. 2003. « Na⁺ Channel Mutation

- Leading to Loss of Function and Non-Progressive Cardiac Conduction Defects ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35 (5): 549-57.
- Hesse, Michael, Colleen S. Kondo, Robert B. Clark, Lin Su, Frances L. Allen, Colleen T. M. Geary-Joo, Stanley Kunnathu, et al. 2007. « Dilated Cardiomyopathy Is Associated with Reduced Expression of the Cardiac Sodium Channel *Scn5a* ». *Cardiovascular Research* 75 (3): 498-509. doi:10.1016/j.cardiores.2007.04.009.
- Hibino, Hiroshi, Atsushi Inanobe, Kazuharu Furutani, Shingo Murakami, Ian Findlay, et Yoshihisa Kurachi. 2010. « Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles ». *Physiological Reviews* 90 (1): 291-366. doi:10.1152/physrev.00021.2009.
- Holm, Hilma, Daniel F. Gudbjartsson, David O. Arnar, Gudmar Thorleifsson, Gudmundur Thorgeirsson, Hrafnhildur Stefansdottir, Sigurjon A. Gudjonsson, et al. 2010. « Several Common Variants Modulate Heart Rate, PR Interval and QRS Duration ». *Nature Genetics* 42 (2): 117-22. doi:10.1038/ng.511.
- Holst, Anders G., Bo Liang, Thomas Jespersen, Henning Bundgaard, Stig Haunso, Jesper Hastrup Svendsen, et Jacob Tfelt-Hansen. 2010. « Sick Sinus Syndrome, Progressive Cardiac Conduction Disease, Atrial Flutter and Ventricular Tachycardia Caused by a Novel SCN5A Mutation ». *Cardiology* 115 (4): 311-16. doi:10.1159/000312747.
- Hothi, Sandeep S., Farhana Ara, et Jonathan Timperley. 2014. « p.Y1449C SCN5A Mutation Associated with Overlap Disorder Comprising Conduction Disease, Brugada Syndrome, and Atrial Flutter ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, n/a - n/a. doi:10.1111/jce.12470.
- Huang, Hai, Juan Zhao, Fatima-Zahra Barrane, Jean Champagne, et Mohamed Chahine. 2006. « Nav1.5/R1193Q polymorphism is associated with both long QT and Brugada syndromes ». *The Canadian Journal of Cardiology* 22 (4): 309-13.
- Hu, Dan, Hector Barajas-Martínez, Argelia Medeiros-Domingo, Lia Crotti, Christian Veltmann, Rainer Schimpf, Janire Urrutia, et al. 2012. « A Novel Rare Variant in SCN1Bb Linked to Brugada Syndrome and SIDS by Combined Modulation of Nav1.5 and Kv4.3 Channel Currents ». *Heart Rhythm* 9 (5): 760-69. doi:10.1016/j.hrthm.2011.12.006.
- Hudson, Reginald E. B. 1970. « The cardiomyopathies: Order from chaos ». *The American Journal of Cardiology* 25 (1): 70-77. doi:10.1016/0002-9149(70)90817-9.
- Hu, Rou-Mu, Bi-Hua Tan, Kate M. Orland, Carmen R. Valdivia, Amber Peterson, Jieli Pu, et Jonathan C. Makielski. 2013. « Digenic Inheritance Novel Mutations in SCN5a and SNTA1 Increase Late I(Na) Contributing to LQT Syndrome ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 304 (7): H994-1001. doi:10.1152/ajpheart.00705.2012.
- Hwang, H, J Chen, Y Lin, R Shieh, M Lee, S Hung, J Wu, Y Chen, D Niu, et B Hwang. 2005. « R1193Q of SCN5A, a Brugada and long QT mutation, is a common polymorphism in Han Chinese ». *Journal of Medical Genetics* 42 (2): e7. doi:10.1136/jmg.2004.027995.
- Isom, Lori L., et William A. Catterall. 1996. « Na⁺ Channel Subunits and Ig Domains ». *Nature* 383 (6598): 307-8. doi:10.1038/383307b0.
- Itoh, Hideki, Masami Shimizu, Shigeo Takata, Hiroshi Mabuchi, et Keiji Imoto. 2005. « A Novel Missense Mutation in the SCN5A Gene Associated with Brugada Syndrome Bidirectionally Affecting Blocking Actions of Antiarrhythmic Drugs ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 16 (5): 486-93. doi:10.1111/j.1540-8167.2005.40711.x.
- Jacob, F., et J. Monod. 1961. « Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins ». *Journal of Molecular Biology* 3 (juin): 318-56.
- Jaeggi, Edgar T., Robert M. Hamilton, Earl D. Silverman, Samuel A. Zamora, et Lisa K. Hornberger. 2002. « Outcome of Children with Fetal, Neonatal or Childhood Diagnosis

- of Isolated Congenital Atrioventricular Block. A Single Institution's Experience of 30 Years ». *Journal of the American College of Cardiology* 39 (1): 130-37.
- Jaeggi, E. T., L. K. Hornberger, J. F. Smallhorn, et J.-C. Fouron. 2005. « Prenatal Diagnosis of Complete Atrioventricular Block Associated with Structural Heart Disease: Combined Experience of Two Tertiary Care Centers and Review of the Literature ». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 26 (1): 16-21. doi:10.1002/uog.1919.
- Juang, Jyh-Ming, Shoen K. Stephen Huang, Chia-Ti Tsai, Fu-Tien Chiang, Jiunn-Lee Lin, Ling-Ping Lai, Chun-Chieh Wang, et al. 2003. « Characteristics of Chinese Patients with Symptomatic Brugada Syndrome in Taiwan ». *Cardiology* 99 (4): 182-89. doi:10.1159/000071247.
- Kääb, Stefan, et Eric Schulze-Bahr. 2005. « Susceptibility Genes and Modifiers for Cardiac Arrhythmias ». *Cardiovascular Research* 67 (3): 397-413. doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.005.
- Kanter, Ronald J., Ryan Pfeiffer, Dan Hu, Héctor Barajas-Martinez, Michael P. Carboni, et Charles Antzelevitch. 2012. « Brugada-Like Syndrome in Infancy Presenting With Rapid Ventricular Tachycardia and Intraventricular Conduction Delay ». *Circulation* 125 (1): 14-22. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.054007.
- Kanters, Jørgen K., Lei Yuan, Paula L. Hedley, Birgitte Stoevring, Christian Jons, Poul Erik Bloch Thomsen, Morten Grønnet, Michael Christiansen, et Thomas Jespersen. 2014. « Flecainide Provocation Reveals Concealed Brugada Syndrome in a Long QT Syndrome Family With a Novel L1786Q Mutation in SCN5A ». *Circulation Journal* 78 (5): 1136-43. doi:10.1253/circj.CJ-13-1167.
- Kapplinger, Jamie D., David J. Tester, Marielle Alders, Begoña Benito, Myriam Berthet, Josep Brugada, Pedro Brugada, et al. 2010. « An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing ». *Heart Rhythm* 7 (1): 33-46. doi:10.1016/j.hrthm.2009.09.069.
- Kazen-Gillespie, Kristin A., David S. Ragsdale, Michael R. D'Andrea, Laura N. Mattei, Kathryn E. Rogers, et Lori L. Isom. 2000. « Cloning, Localization, and Functional Expression of Sodium Channel β 1A Subunits ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (2): 1079-88. doi:10.1074/jbc.275.2.1079.
- Kehl, Hans-Gerd, Wilhelm Haverkamp, Georg Rellensmann, T. Mesud Yelbuz, Thomas Krasemann, Johannes Vogt, et Eric Schulze-Bahr. 2004. « Life-Threatening Neonatal Arrhythmia Successful Treatment and Confirmation of Clinically Suspected Extreme Long QT-Syndrome-3 ». *Circulation* 109 (18): e205-6. doi:10.1161/01.CIR.0000128874.43908.CA.
- Kertesz, N. J., A. L. Fenrich, et R. A. Friedman. 1997. « Congenital Complete Atrioventricular Block ». *Texas Heart Institute Journal / from the Texas Heart Institute of St. Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* 24 (4): 301-7.
- Kim, Jeffrey J., Richard A. Friedman, Benjamin W. Eidem, Bryan C. Cannon, Gaurav Arora, E. O'Brian Smith, Arnold L. Fenrich, et Naomi J. Kertesz. 2007. « Ventricular Function and Long-Term Pacing in Children with Congenital Complete Atrioventricular Block ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 18 (4): 373-77. doi:10.1111/j.1540-8167.2006.00741.x.
- Kirchhoff, Susanne, Eric Nelles, Andreas Hagedorff, Olaf Krüger, Otto Traub, et Klaus Willecke. 1998. « Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice ». *Current Biology* 8 (5): 299-302. doi:10.1016/S0960-9822(98)70114-9.
- Kirschner, Janbernd, Thomas Brune, Manfred Wehnert, Jonas Denecke, Christina Wasner, Anja Feuer, Thorsten Marquardt, et al. 2005. « p.S143F Mutation in Lamin A/C: A New

- Phenotype Combining Myopathy and Progeria ». *Annals of Neurology* 57 (1): 148-51. doi:10.1002/ana.20359.
- Kreuzberg, Maria M., Goran Söhl, Jung-Sun Kim, Vytas K. Verselis, Klaus Willecke, et Feliksas F. Bukauskas. 2005. « Functional Properties of Mouse Connexin30.2 Expressed in the Conduction System of the Heart ». *Circulation Research* 96 (11): 1169-77. doi:10.1161/01.RES.0000169271.33675.05.
- Krüger, Jana, Christiane Kunert-Keil, Frederike Bisping, et Heinrich Brinkmeier. 2008. « Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle ». *Neuromuscular Disorders* 18 (6): 501-13. doi:10.1016/j.nmd.2008.04.003.
- Kruger, O., A. Plum, J. S. Kim, E. Winterhager, S. Maxeiner, G. Hallas, S. Kirchhoff, O. Traub, W. H. Lamers, et K. Willecke. 2000. « Defective Vascular Development in Connexin 45-Deficient Mice ». *Development* 127 (19): 4179-93.
- Kruse, Martin, et Olaf Pongs. 2014. « TRPM4 channels in the cardiovascular system ». *Current Opinion in Pharmacology* 15 (avril): 68-73. doi:10.1016/j.coph.2013.12.003.
- Kruse, Martin, Eric Schulze-Bahr, Valerie Corfield, Alf Beckmann, Birgit Stallmeyer, Güven Kurtbay, Iris Ohmert, Ellen Schulze-Bahr, Paul Brink, et Olaf Pongs. 2009. « Impaired Endocytosis of the Ion Channel TRPM4 Is Associated with Human Progressive Familial Heart Block Type I ». *Journal of Clinical Investigation* 119 (9): 2737-44. doi:10.1172/JCI38292.
- Kumai, M., K. Nishii, K. Nakamura, N. Takeda, M. Suzuki, et Y. Shibata. 2000. « Loss of connexin45 Causes a Cushion Defect in Early Cardiogenesis ». *Development* 127 (16): 3501-12.
- Kumar, Prateek, Steven Henikoff, et Pauline C Ng. 2009. « Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm ». *Nature Protocols* 4 (8): 1073-81. doi:10.1038/nprot.2009.86.
- Kurosaki, Ken-Ichi, Aya Miyazaki, Ken Watanabe, et Shigeyuki Echigo. 2008. « Long-Term Outcome of Isolated Congenital Complete Atrioventricular Block Pacing since Neonatal Period: Experience at a Single Japanese Institution ». *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 72 (1): 81-87.
- Kwon, Hye Won, Sang Yoon Lee, Bo Sang Kwon, Gi Beom Kim, Eun Jung Bae, Woong Han Kim, Chung Il Noh, Sung Im Cho, et Sung Sup Park. 2012. « Long QT Syndrome and Dilated Cardiomyopathy with SCN5A p.R1193Q Polymorphism: Cardioverter-Defibrillator Implantation at 27 Months ». *Pacing and Clinical Electrophysiology* 35 (8): e243-46. doi:10.1111/j.1540-8159.2012.03409.x.
- Kyndt, Florence, Vincent Probst, Franck Potet, Sophie Demolombe, Jean-Christophe Chevallier, Isabelle Baro, Jean-Paul Moisan, et al. 2001. « Novel SCN5A Mutation Leading Either to Isolated Cardiac Conduction Defect or Brugada Syndrome in a Large French Family ». *Circulation* 104 (25): 3081-86. doi:10.1161/hc5001.100834.
- Laforêt, Pascal, Pascale Richard, Mina Ait Said, Norma Beatriz Romero, Emmanuelle Lacene, Jean-Paul Leroy, Christiane Baussan, et al. 2006. « A new mutation in PRKAG2 gene causing hypertrophic cardiomyopathy with conduction system disease and muscular glycogenosis ». *Neuromuscular Disorders* 16 (3): 178-82. doi:10.1016/j.nmd.2005.12.004.
- Lai, Chun-Chi, Yung-Hsin Yeh, Wen-Ping Hsieh, Chi-Tai Kuo, Wen-Ching Wang, Chia-Han Chu, Chiu-Lien Hung, et al. 2013. « Whole-Exome Sequencing to Identify a Novel LMNA Gene Mutation Associated with Inherited Cardiac Conduction Disease ». *PLoS ONE* 8 (12). doi:10.1371/journal.pone.0083322.
- Laitinen, Päivi J., Kevin M. Brown, Kirsi Piippo, Heikki Swan, Joe M. Devaney, Bhoomi Brahmhatt, Elizabeth A. Donarum, et al. 2001. « Mutations of the Cardiac Ryanodine

- Receptor (RyR2) Gene in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia ». *Circulation* 103 (4): 485-90. doi:10.1161/01.CIR.103.4.485.
- Lander, Eric S., Lauren M. Linton, Bruce Birren, Chad Nusbaum, Michael C. Zody, Jennifer Baldwin, Keri Devon, et al. 2001. « Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome ». *Nature* 409 (6822): 860-921. doi:10.1038/35057062.
- Landstrom, Andrew P., Noah Weisleder, Karin B. Batalden, J. Martijn Bos, David J. Tester, Steve R. Ommen, Xander H.T. Wehrens, et al. 2007. « Mutations in JPH2-Encoded Junctophilin-2 Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy in Humans ». *Journal of molecular and cellular cardiology* 42 (6): 1026-35. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.04.006.
- Launay, Pierre, Henrike Cheng, Subhashini Srivatsan, Reinhold Penner, Andrea Fleig, et Jean-Pierre Kinet. 2004. « TRPM4 Regulates Calcium Oscillations After T Cell Activation ». *Science* 306 (5700): 1374-77. doi:10.1126/science.1098845.
- Launay, Pierre, Andrea Fleig, Anne Laure Perraud, Andrew M. Scharenberg, Reinhold Penner, et Jean Pierre Kinet. 2002. « TRPM4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization ». *Cell* 109 (3): 397-407.
- Lenègre, Jean. 1964. « Etiology and pathology of bilateral bundle branch block in relation to complete heart block ». *Progress in Cardiovascular Diseases* 6 (5): 409-44. doi:10.1016/S0033-0620(64)80001-3.
- Lenègre, Jean, et Paul Moreau. 1963. « Chronic auriculo-ventricular block. anatomical, clinical and histological study ». *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 56 (août): 867-88.
- Lev, Maurice. 1964. « The pathology of complete atrioventricular block ». *Progress in Cardiovascular Diseases* 6 (4): 317-26. doi:10.1016/S0033-0620(64)80005-0.
- Lev, Maurice, et Saroja Bharati. 1975. « Atrioventricular and intraventricular conduction disease ». *Archives of Internal Medicine* 135 (3): 405-10. doi:10.1001/archinte.1975.00330030055006.
- Lev, Maurice, Egbert H. Fell, Rene Arcilla, et Milton H. Weinberg. 1964. « Surgical injury to the conduction system in ventricular septal defect ». *The American Journal of Cardiology*, American College of Cardiology Annual Meeting, 14 (4): 464-76. doi:10.1016/0002-9149(64)90030-X.
- Lev, Maurice, Suman G. Kinare, et Alfred Pick. 1970. « The Pathogenesis of Atrioventricular Block in Coronary Disease ». *Circulation* 42 (3): 409-25. doi:10.1161/01.CIR.42.3.409.
- Li, Heng, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, Richard Durbin, et 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. « The Sequence Alignment/Map format and SAMtools ». *Bioinformatics* 25 (16): 2078-79. doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
- Lindenbaum, Pierre, Solena Le Scouarnec, Vincent Portero, et Richard Redon. 2011. « Knime4Bio: A Set of Custom Nodes for the Interpretation of next-Generation Sequencing Data with KNIME ». *Bioinformatics* 27 (22): 3200-3201. doi:10.1093/bioinformatics/btr554.
- Li, Qiuju, Hai Huang, Gele Liu, Khanh Lam, Julie Rutberg, Martin S. Green, David H. Birnie, Robert Lemery, Mohamed Chahine, et Michael H. Gollob. 2009. « Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 380 (1): 132-37. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.052.
- Liu, Hui, Stéphanie Chatel, Christophe Simard, Ninda Syam, Laurent Salle, Vincent Probst, Julie Morel, et al. 2013. « Molecular Genetics and Functional Anomalies in a Series of 248 Brugada Cases with 11 Mutations in the TRPM4 Channel ». *PLoS ONE* 8 (1). doi:10.1371/journal.pone.0054131.

- Liu, Hui, Loubna El Zein, Martin Kruse, Romain Guinamard, Alf Beckmann, André Bozio, Güven Kurtbay, et al. 2010. « Gain-of-Function Mutations in TRPM4 Cause Autosomal Dominant Isolated Cardiac Conduction Disease ». *Circulation: Cardiovascular Genetics* 3 (4): 374-85. doi:10.1161/CIRCGENETICS.109.930867.
- Liu, Man, Kai-Chien Yang, et Samuel C. Dudley Jr. 2014. « Cardiac Sodium Channel Mutations: Why so Many Phenotypes? ». *Nature Reviews Cardiology* 11 (10): 607-15. doi:10.1038/nrcardio.2014.85.
- Lodder, Elisabeth M., Brendon P. Scicluna, Annalisa Milano, Albert Y. Sun, Hao Tang, Carol Ann Remme, Perry D. Moerland, et al. 2012. « Dissection of a Quantitative Trait Locus for PR Interval Duration Identifies Tnni3k as a Novel Modulator of Cardiac Conduction ». *PLoS Genetics* 8 (12). doi:10.1371/journal.pgen.1003113.
- Lu, Dan, Hong Lian, Xiaojuan Zhang, Haitao Shao, Lan Huang, Chuan Qin, et Lianfeng Zhang. 2010. « LMNA E82K Mutation Activates FAS and Mitochondrial Pathways of Apoptosis in Heart Tissue Specific Transgenic Mice ». *PLoS ONE* 5 (12). doi:10.1371/journal.pone.0015167.
- Luo, Yue-Bei, Frank L. Mastaglia, et Steve D. Wilton. 2014. « Normal and Aberrant Splicing of LMNA ». *Journal of Medical Genetics* 51 (4): 215-23. doi:10.1136/jmedgenet-2013-102119.
- Lupoglazoff, J. M., T. Cheav, G. Baroudi, M. Berthet, I. Denjoy, B. Cauchemez, F. Extramiana, M. Chahine, et P. Guicheney. 2001. « Homozygous SCN5A Mutation in Long-QT Syndrome With Functional Two-to-One Atrioventricular Block ». *Circulation Research* 89 (2): e16-21. doi:10.1161/hh1401.095087.
- Lynch HT, S. Mohiuddin, J. Moran, A. Kaplan, M. Sketch, A. Zencka, et V. Runco. 1975. « Hereditary Progressive Atrioventricular Conduction Defect ». *The American Journal of Cardiology* 36 (3): 297-301.
- Lynch HT, Mohiuddin S, Sketch MH, Krush AJ, Carter S, et Runco V. 1973. « Hereditary progressive atrioventricular conduction defect: A new syndrome? ». *JAMA* 225 (12): 1465-70. doi:10.1001/jama.1973.03220400011003.
- Makita, Naomasa. 2009. « Phenotypic Overlap of Cardiac Sodium Channelopathies ». *Circulation Journal* 73 (5): 810-17. doi:10.1253/circj.CJ-09-0014.
- Makita, Naomasa, Elijah Behr, Wataru Shimizu, Minoru Horie, Akihiko Sunami, Lia Crotti, Eric Schulze-Bahr, et al. 2008. « The E1784K Mutation in SCN5A Is Associated with Mixed Clinical Phenotype of Type 3 Long QT Syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (6): 2219-29. doi:10.1172/JCI34057.
- Makita, Naomasa, Koji Sasaki, W. Antoinette Groenewegen, Takashi Yokota, Hisashi Yokoshiki, Tomoaki Murakami, et Hiroyuki Tsutsui. 2005. « Congenital atrial standstill associated with coinheritance of a novel SCN5A mutation and connexin 40 polymorphisms ». *Heart Rhythm* 2 (10): 1128-34. doi:10.1016/j.hrthm.2005.06.032.
- Makita, Naomasa, Akiko Seki, Naokata Sumitomo, Halina Chkourko, Shigetomo Fukuhara, Hiroshi Watanabe, Wataru Shimizu, et al. 2012. « A Connexin40 Mutation Associated With a Malignant Variant of Progressive Familial Heart Block Type I ». *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 5 (1): 163-72. doi:10.1161/CIRCEP.111.967604.
- Makiyama, Takeru, Masaharu Akao, Satoshi Shizuta, Takahiro Doi, Kei Nishiyama, Yuko Oka, Seiko Ohno, et al. 2008. « A Novel SCN5A Gain-of-Function Mutation M1875T Associated With Familial Atrial Fibrillation ». *Journal of the American College of Cardiology* 52 (16): 1326-34. doi:10.1016/j.jacc.2008.07.013.
- Makiyama, Takeru, Masaharu Akao, Keiko Tsuji, Takahiro Doi, Seiko Ohno, Kotoe Takenaka, Atsushi Kobori, et al. 2005. « High Risk for Bradyarrhythmic Complications in Patients With Brugada Syndrome Caused by SCN5A Gene Mutations ». *Journal of the American College of Cardiology* 46 (11): 2100-2106. doi:10.1016/j.jacc.2005.08.043.

- Maltsev, Victor A., John W. Kyle, et Albertas Undrovinas. 2009. « Late Na⁺ current produced by human cardiac Na⁺ channel isoform Nav1.5 is modulated by its β 1 subunit ». *The journal of physiological sciences : JPS* 59 (3): 217-25. doi:10.1007/s12576-009-0029-7.
- Manolio, Teri A, Francis S Collins, Nancy J Cox, David B Goldstein, Lucia A Hindorff, David J Hunter, Mark I McCarthy, et al. 2009. « Finding the Missing Heritability of Complex Diseases ». *Nature* 461 (7265): 747-53. doi:10.1038/nature08494.
- Manrao, Elizabeth A., Ian M. Derrington, Andrew H. Laszlo, Kyle W. Langford, Matthew K. Hopper, Nathaniel Gillgren, Mikhail Pavlenok, Michael Niederweis, et Jens H. Gundlach. 2012. « Reading DNA at Single-Nucleotide Resolution with a Mutant MspA Nanopore and phi29 DNA Polymerase ». *Nature Biotechnology* 30 (4): 349-53. doi:10.1038/nbt.2171.
- Marcantoni, A., P. Baldelli, J. M. Hernandez-Guijo, V. Comunanza, V. Carabelli, et E. Carbone. 2007. « L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells: Role in pace-making and secretion ». *Cell Calcium, Calcium Channels and Transporters*, 42 (4-5): 397-408. doi:10.1016/j.ceca.2007.04.015.
- Mardis, Elaine R. 2011. « A Decade's Perspective on DNA Sequencing Technology ». *Nature* 470 (7333): 198-203. doi:10.1038/nature09796.
- Margulies, Marcel, Michael Egholm, William E. Altman, Said Attiya, Joel S. Bader, Lisa A. Bembien, Jan Berka, et al. 2005. « Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors ». *Nature* 437 (7057): 376-80. doi:10.1038/nature03959.
- Mathar, Ilka, Griet Jacobs, Miklos Kecskes, Aurelie Menigoz, Koenraad Philippaert, et Rudi Vennekens. 2014. « TRPM4 ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 461-87. doi:10.1007/978-3-642-54215-2_18.
- Mathar, Ilka, Rudi Vennekens, Marcel Meissner, Frieder Kees, Gerry Van der Mieren, Juan E. Camacho Londoño, Sebastian Uhl, et al. 2010. « Increased catecholamine secretion contributes to hypertension in TRPM4-deficient mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (9): 3267-79. doi:10.1172/JCI41348.
- Matsushita, Yoshihisa, Toru Furukawa, Hiroshi Kasanuki, Makoto Nishibatake, Yachiyo Kurihara, Atsushi Ikeda, Naoyuki Kamatani, Hiroshi Takeshima, et Rumiko Matsuoka. 2007. « Mutation of Junctophilin Type 2 Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy ». *Journal of Human Genetics* 52 (6): 543-48. doi:10.1007/s10038-007-0149-y.
- McDermott, Deborah A., Jamie C. Fong, et Craig T. Basson. 1993. « Holt-Oram Syndrome ». In *GeneReviews*(®), édité par Roberta A. Pagon, Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Thomas D. Bird, Cynthia R. Dolan, Chin-To Fong, Richard JH Smith, et Karen Stephens. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1111/>.
- McElhinney, Doff B., Elizabeth Geiger, Joshua Blinder, D. Woodrow Benson, et Elizabeth Goldmuntz. 2003. « NKX2.5 Mutations in Patients with Congenital Heart Disease ». *Journal of the American College of Cardiology* 42 (9): 1650-55.
- McKenna, Aaron, Matthew Hanna, Eric Banks, Andrey Sivachenko, Kristian Cibulskis, Andrew Kernysky, Kiran Garimella, et al. 2010. « The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce Framework for Analyzing next-Generation DNA Sequencing Data ». *Genome Research* 20 (9): 1297-1303. doi:10.1101/gr.107524.110.
- McKoy, Godfrina, Nikos Protonotarios, Andrew Crosby, Adalena Tsatsopoulou, Aris Anastasakis, Aman Coonar, Mark Norman, Christina Baboonian, Steve Jeffery, et William J McKenna. 2000. « Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) ». *The Lancet* 355 (9221): 2119-24. doi:10.1016/S0140-6736(00)02379-5.

- McNair, William P., Lisa Ku, Matthew R. G. Taylor, Pam R. Fain, Dmi Dao, Eugene Wolfel, et Luisa Mestroni. 2004. « SCN5A Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy, Conduction Disorder, and Arrhythmia ». *Circulation* 110 (15): 2163-67. doi:10.1161/01.CIR.0000144458.58660.BB.
- Mercuri E, Poppe M, Quinlivan R, et et al. 2004. « Extreme variability of phenotype in patients with an identical missense mutation in the lamin a/c gene: From congenital onset with severe phenotype to milder classic emery-dreifuss variant ». *Archives of Neurology* 61 (5): 690-94. doi:10.1001/archneur.61.5.690.
- Meregalli, Paola G., Hanno L. Tan, Vincent Probst, Tamara T. Koopmann, Michael W. Tanck, Zahurul A. Bhuiyan, Frederic Sacher, et al. 2009. « Type of SCN5A mutation determines clinical severity and degree of conduction slowing in loss-of-function sodium channelopathies ». *Heart Rhythm* 6 (3): 341-48. doi:10.1016/j.hrthm.2008.11.009.
- Metzker, Michael L. 2010. « Sequencing Technologies — the next Generation ». *Nature Reviews Genetics* 11 (1): 31-46. doi:10.1038/nrg2626.
- Michaelsson, M, et M A Engle. 1972. « Congenital Complete Heart Block: An International Study of the Natural History ». *Cardiovascular Clinics* 4 (3): 85-101.
- Michaelsson, M., T. Riesenfeld, et A. Jonzon. 1997. « Natural History of Congenital Complete Atrioventricular Block ». *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* 20 (8 Pt 2): 2098-2101.
- Miller, Wayne L., David O. Hodge, et Stephen C. Hammill. 2008. « Association of Uncomplicated Electrocardiographic Conduction Blocks With Subsequent Cardiac Morbidity in a Community-Based Population (Olmsted County, Minnesota) ». *The American Journal of Cardiology* 101 (1): 102-6. doi:10.1016/j.amjcard.2007.07.056.
- Mironov, S. L. 2008. « Metabotropic Glutamate Receptors Activate Dendritic Calcium Waves and TRPM Channels Which Drive Rhythmic Respiratory Patterns in Mice ». *The Journal of Physiology* 586 (9): 2277-91. doi:10.1113/jphysiol.2007.149021.
- Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, et et al. 2009. « MUtations for gaucher disease confer high susceptibility to parkinson disease ». *Archives of Neurology* 66 (5): 571-76. doi:10.1001/archneurol.2009.72.
- Mitsui, Jun, et Shoji Tsuji. 2014. « Genomic aspects of sporadic neurodegenerative diseases ». *Biochemical and Biophysical Research Communications, Genomic Aspects of Common Diseases*, 452 (2): 221-25. doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.098.
- Monfredi, Oliver, Halina Dobrzynski, Tapas Mondal, Mark R. Boyett, et Gwilym M. Morris. 2010. « The Anatomy and Physiology of the Sinoatrial Node—A Contemporary Review ». *Pacing and Clinical Electrophysiology* 33 (11): 1392-1406. doi:10.1111/j.1540-8159.2010.02838.x.
- Moreira, E. S., T. J. Wiltshire, G. Faulkner, A. Nilforoushan, M. Vainzof, O. T. Suzuki, G. Valle, et al. 2000. « Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2G Is Caused by Mutations in the Gene Encoding the Sarcomeric Protein Telethonin ». *Nature Genetics* 24 (2): 163-66. doi:10.1038/72822.
- Morgans, C M, K E Gray, et G H Robb. 1974. « A survey of familial heart block. » *British Heart Journal* 36 (7): 693-96.
- Morgenthaler, Stephan, et William G. Thilly. 2007. « A strategy to discover genes that carry multi-allelic or mono-allelic risk for common diseases: A cohort allelic sums test (CAST) ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 615 (1-2): 28-56. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.09.003.
- Moric, E., E. Herbert, M. Trusz-Gluza, A. Filipecki, U. Mazurek, et T. Wilczok. 2003. « The Implications of Genetic Mutations in the Sodium Channel Gene (SCN5A) ». *Europace* 5 (4): 325-34. doi:10.1016/S1099-5129(03)00085-0.

- Morquio, Luis. 1901. « Sur une maladie infantile et familiale caractérisée par des modifications permanentes du pouls, des attaques syncopales et épileptiformes et la mort subite. » *Archives de Médecine des Enfants* 4: 467-75.
- Moskowitz, Ivan P. G., Jae B. Kim, Meredith L. Moore, Cordula M. Wolf, Michael A. Peterson, Jay Shendure, Marcelo A. Nobrega, et al. 2007. « A Molecular Pathway Including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 Required for Cardiac Conduction System Development ». *Cell* 129 (7): 1365-76. doi:10.1016/j.cell.2007.04.036.
- Nagano, Atsushi, Ritsuko Koga, Megumu Ogawa, Yoshihiro Kurano, Junya Kawada, Ryoza Okada, Yukiko K. Hayashi, Toshifumi Tsukahara, et Kiichi Arahata. 1996. « Emerin Deficiency at the Nuclear Membrane in Patients with Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 12 (3): 254-59. doi:10.1038/ng0396-254.
- Nakajima, Seiko, Takeru Makiyama, Koji Hanazawa, Kazuaki Kaitani, Masashi Amano, Yukiko Hayama, Naoaki Onishi, et al. 2013. « A Novel SCN5A Mutation Demonstrating a Variety of Clinical Phenotypes in Familial Sick Sinus Syndrome ». *Internal Medicine* 52 (16): 1805-8. doi:10.2169/internalmedicine.52.0085.
- Nakashima, Yasuhiro, Diana A. Yanez, Marlin Touma, Haruko Nakano, Artur Jaroszewicz, Maria C. Jordan, Matteo Pellegrini, Kenneth P. Roos, et Atsushi Nakano. 2014. « Nkx2-5 Suppresses the Proliferation of Atrial Myocytes and Conduction System ». *Circulation Research* 114 (7): 1103-13. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303219.
- Nakaya, Haruaki. 2014. « SCN5A Mutations Associated With Overlap Phenotype of Long QT Syndrome Type 3 and Brugada Syndrome ». *Circulation Journal* 78 (5): 1061-62. doi:10.1253/circj.CJ-14-0319.
- Napolitano, Carlo, Ilaria Rivolta, et Silvia G. Priori. 2005. « Cardiac Sodium Channel Diseases ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41 (4): 439-44. doi:10.1515/CCLM.2003.066.
- Nerbonne, Jeanne M., Colin G. Nichols, Thomas L. Schwarz, et Denis Escande. 2001. « Genetic Manipulation of Cardiac K⁺ Channel Function in Mice What Have We Learned, and Where Do We Go From Here? ». *Circulation Research* 89 (11): 944-56. doi:10.1161/hh2301.100349.
- Neu, Axel, Michele Eiselt, Matthias Paul, Kathrin Sauter, Birgit Stallmeyer, Dirk Isbrandt, et Eric Schulze-Bahr. 2010. « A Homozygous SCN5A Mutation in a Severe, Recessive Type of Cardiac Conduction Disease ». *Human Mutation* 31 (8): E1609-21. doi:10.1002/humu.21302.
- Nguyen, Thuy Duong. 2008. « Genetic Heterogeneity and Molecular Genetic Diagnostics in Primary and Secondary Laminopathies ». Text.Thesis.Doctoral. *OPUS-IDN/500*. <http://ub-ed.ub.uni-greifswald.de/opus/volltexte/2008/500/>.
- Nilius, Bernd, Jean Prenen, Annelies Janssens, Grzegorz Owsianik, Chunbo Wang, Michael X. Zhu, et Thomas Voets. 2005. « The Selectivity Filter of the Cation Channel TRPM4 ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (24): 22899-906. doi:10.1074/jbc.M501686200.
- Nilius, Bernd, Jean Prenen, Jisen Tang, Chunbo Wang, Grzegorz Owsianik, Annelies Janssens, Thomas Voets, et Michael X. Zhu. 2005. « Regulation of the Ca²⁺ Sensitivity of the Nonselective Cation Channel TRPM4 ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6423-33. doi:10.1074/jbc.M411089200.
- Niu, Dau-Ming, Batau Hwang, Han-Wei Hwang, Nana H Wang, Jer-Yuarn Wu, Pi-Chang Lee, Jen-Chung Chien, et Ru-Chi Shieh. 2006. « A common SCN5A polymorphism attenuates a severe cardiac phenotype caused by a nonsense SCN5A mutation in a Chinese family with an inherited cardiac conduction defect ». *Journal of Medical Genetics* 43 (10): 817-21. doi:10.1136/jmg.2006.042192.

- Ohshiro, Takahito, Kazuki Matsubara, Makusu Tsutsui, Masayuki Furuhashi, Masateru Taniguchi, et Tomoji Kawai. 2012. « Single-Molecule Electrical Random Resequencing of DNA and RNA ». *Scientific Reports* 2 (juillet). doi:10.1038/srep00501.
- Olesen, Morten S., Anders G. Holst, Jesper Hastrup Svendsen, Stig Haunsø, et Jacob Tfelt-Hansen. 2012. « SCN1Bb R214Q found in 3 patients: 1 with Brugada syndrome and 2 with lone atrial fibrillation ». *Heart Rhythm* 9 (5): 770-73. doi:10.1016/j.hrthm.2011.12.005.
- Olesen, Morten S., Lei Yuan, Bo Liang, Anders G. Holst, Nikolaj Nielsen, Jonas B. Nielsen, Paula L. Hedley, et al. 2012. « High Prevalence of Long QT Syndrome–Associated SCN5A Variants in Patients With Early-Onset Lone Atrial Fibrillation ». *Circulation: Cardiovascular Genetics* 5 (4): 450-59. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.962597.
- Oliva, Antonio, Preben Bjerregaard, Kui Hong, Steven Evans, Kevin Vernooy, Jorge McCormack, Josep Brugada, Pedro Brugada, Vincenzo L. Pascali, et Ramon Brugada. 2008. « Clinical Heterogeneity in Sodium Channelopathies ». *Cardiology* 110 (2): 116-22. doi:10.1159/000110490.
- Olson, Timothy M., Virginia V. Michels, Jeffrey D. Ballew, Sandra P. Reyna, Margaret L. Karst, Kathleen J. Herron, Steven C. Horton, Richard J. Rodeheffer, et Jeffrey L. Anderson. 2005. « Sodium Channel Mutations and Susceptibility to Heart Failure and Atrial Fibrillation ». *JAMA : the journal of the American Medical Association* 293 (4): 447-54. doi:10.1001/jama.293.4.447.
- Osler, William. 1903. « On the so-called stokes-adams disease (slow pulse with syncopal attacks, &c.). » *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 4173, 162 (4173): 516-24. doi:10.1016/S0140-6736(00)66180-9.
- Ouyang, Ping, Elizabeth Saarel, Ying Bai, Chunyan Luo, Qiulun Lv, Yan Xu, Fan Wang, et al. 2011. « A de novo mutation in NKX2.5 associated with atrial septal defects, ventricular noncompaction, syncope and sudden death ». *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 412 (1-2): 170-75. doi:10.1016/j.cca.2010.09.035.
- Papadatos, G. Alex, Polly M. R. Wallerstein, Catherine E. G. Head, Rosemary Ratcliff, Peter A. Brady, Klaus Benndorf, Richard C. Saumarez, et al. 2002. « Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 6210-15. doi:10.1073/pnas.082121299.
- Perrot, Andreas, Hajo Schmidt-Traub, Bernard Hoffmann, Matthias Prager, Nana Bit-Avragim, Raisa I. Rudenko, Dinara A. Usupbaeva, et al. 2005. « Prevalence of Cardiac Beta-Myosin Heavy Chain Gene Mutations in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy ». *Journal of Molecular Medicine* 83 (6): 468-77. doi:10.1007/s00109-005-0635-7.
- Petrosino, Joseph F., Sarah Highlander, Ruth Ann Luna, Richard A. Gibbs, et James Versalovic. 2009. « Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification ». *Clinical Chemistry* 55 (5): 856-66. doi:10.1373/clinchem.2008.107565.
- Pfeufer, Arne, Serena Sanna, Dan E. Arking, Martina Müller, Vesela Gateva, Christian Fuchsberger, Georg B. Ehret, et al. 2009. « Common Variants at Ten Loci Modulate the QT Interval Duration in the QTSCD Study ». *Nature Genetics* 41 (4): 407-14. doi:10.1038/ng.362.
- Pfeufer, Arne, Charlotte van Noord, Kristin D Marciante, Dan E Arking, Martin G Larson, Albert Vernon Smith, Kirill V Tarasov, et al. 2010. « Genome-Wide Association Study of PR Interval ». *Nature Genetics* 42 (2): 153-59. doi:10.1038/ng.517.
- Pinsky, W. W., P. C. Gillette, A. Garson, et D. G. McNamara. 1982. « Diagnosis, Management, and Long-Term Results of Patients with Congenital Complete Atrioventricular Block ». *Pediatrics* 69 (6): 728-33.

- Pochmalicki, G, M Genest, P Richard, M Komajda, et P Charron. 2007. « Une forme familiale de troubles conductifs associés à une mutation du gène PRKAG2 ». *EM-Consulte*. <http://www.em-consulte.com/article/130295/alertePM>.
- Pollard, Katherine S., Melissa J. Hubisz, Kate R. Rosenbloom, et Adam Siepel. 2010. « Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies ». *Genome Research* 20 (1): 110-21. doi:10.1101/gr.097857.109.
- Postma, A, I Denjoy, J Kamblock, M Alders, J Lupoglazoff, G Vaksman, L Dubosq-Bidot, et al. 2005. « Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients ». *Journal of Medical Genetics* 42 (11): 863-70. doi:10.1136/jmg.2004.028993.
- Potet, Franck, Philippe Mabo, Guillaume Le Coq, Vincent Probst, Jean-Jacques Schott, Fabrice Airaud, Gilles Guihard, Jean-Claude Daubert, Denis Escande, et Hervé Le Marec. 2003. « Novel Brugada SCN5A Mutation Leading to ST Segment Elevation in the Inferior or the Right Precordial Leads ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 14 (2): 200-203. doi:10.1046/j.1540-8167.2003.02382.x.
- Priori, Silvia G., Carlo Napolitano, Peter J. Schwartz, Raffaella Bloise, Lia Crotti, et Elena Ronchetti. 2000. « The Elusive Link Between LQT3 and Brugada Syndrome The Role of Flecainide Challenge ». *Circulation* 102 (9): 945-47. doi:10.1161/01.CIR.102.9.945.
- Priori, Silvia G., Carlo Napolitano, Natascia Tiso, Mirella Memmi, Gabriele Vignati, Raffaella Bloise, Vincenzo Sorrentino, et Gian Antonio Danieli. 2001. « Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene (hRyR2) Underlie Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia ». *Circulation* 103 (2): 196-200. doi:10.1161/01.CIR.103.2.196.
- Probst, Vincent, Marie Allouis, Frederic Sacher, Sabine Pattier, Dominique Babuty, Philippe Mabo, Jacques Mansourati, et al. 2006. « Progressive Cardiac Conduction Defect Is the Prevailing Phenotype in Carriers of a Brugada Syndrome SCN5A Mutation ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 17 (3): 270-75. doi:10.1111/j.1540-8167.2006.00349.x.
- Probst, Vincent, Jean-Baptiste Gourraud, et Hervé Le Marec. 2012. « SCN1Bb, atrial fibrillation, and Brugada syndrome: Just another brick in the wall ... ». *Heart Rhythm* 9 (5): 774-75. doi:10.1016/j.hrthm.2011.12.021.
- Probst, Vincent, Florence Kyndt, Franck Potet, Jean-Noel Trochu, Guy Mialet, Sophie Demolombe, Jean-Jacques Schott, Isabelle Baró, Denis Escande, et Hervé Le Marec. 2003. « Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenègre disease ». *Journal of the American College of Cardiology* 41 (4): 643-52. doi:10.1016/S0735-1097(02)02864-4.
- Protonotarios, N, A Tsatsopoulou, P Patsourakos, D Alexopoulos, P Gezerlis, S Simitsis, et G Scampardonis. 1986. « Cardiac abnormalities in familial palmoplantar keratosis. » *British Heart Journal* 56 (4): 321-26.
- Qin, Ning, Michael R. D'Andrea, Mary-Lou Lubin, Navid Shafae, Ellen E. Codd, et Ana M. Correa. 2003. « Molecular Cloning and Functional Expression of the Human Sodium Channel β 1B Subunit, a Novel Splicing Variant of the β 1 Subunit ». *European Journal of Biochemistry* 270 (23): 4762-70. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03878.x.
- Redon, Richard, Shumpei Ishikawa, Karen R. Fitch, Lars Feuk, George H. Perry, T. Daniel Andrews, Heike Fiegler, et al. 2006. « Global Variation in Copy Number in the Human Genome ». *Nature* 444 (7118): 444-54. doi:10.1038/nature05329.
- Remme, Carol Ann. 2013. « Cardiac Sodium Channelopathy Associated with SCN5A Mutations: Electrophysiological, Molecular and Genetic Aspects ». *The Journal of Physiology* 591 (Pt 17): 4099-4116. doi:10.1113/jphysiol.2013.256461.

- Remme, Carol Ann, Arthur A. M. Wilde, et Connie R. Bezzina. 2008. « Cardiac Sodium Channel Overlap Syndromes: Different Faces of SCN5A Mutations ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 18 (3): 78-87. doi:10.1016/j.tcm.2008.01.002.
- Rijen, Harold V. M. van, Toon A. B. van Veen, Marjan J. A. van Kempen, Francien J. G. Wilms-Schopman, Mark Potse, Olaf Krueger, Klaus Willecke, Tobias Opthof, Habo J. Jongsma, et Jacques M. T. de Bakker. 2001. « Impaired Conduction in the Bundle Branches of Mouse Hearts Lacking the Gap Junction Protein Connexin40 ». *Circulation* 103 (11): 1591-98. doi:10.1161/01.CIR.103.11.1591.
- Risgaard, Bjarke, Henning Bundgaard, Reza Jabbari, Stig Haunsø, Bo Gregers Winkel, et Jacob Tfelt-Hansen. 2013. « Pacemaker implantation in a patient with brugada and sick sinus syndrome. » *World journal of cardiology* 5 (3): 65-67. doi:10.4330/wjc.v5.i3.65.
- Roncarati, Roberta, Chiara Viviani Anselmi, Peter Krawitz, Giovanna Lattanzi, Yskert von Kodolitsch, Andreas Perrot, Elisa di Pasquale, et al. 2013. « Doubly Heterozygous LMNA and TTN Mutations Revealed by Exome Sequencing in a Severe Form of Dilated Cardiomyopathy ». *European Journal of Human Genetics* 21 (10): 1105-11. doi:10.1038/ejhg.2013.16.
- Rossenbacker, Tom, Sheila J. Carroll, Huajun Liu, Cuno Kuipéri, Thomy J. L. de Ravel, Koen Devriendt, Peter Carmeliet, Robert S. Kass, et Hein Heidbüchel. 2004. « Novel pore mutation in SCN5A manifests as a spectrum of phenotypes ranging from atrial flutter, conduction disease, and Brugada syndrome to sudden cardiac death ». *Heart Rhythm* 1 (5): 610-15. doi:10.1016/j.hrthm.2004.07.001.
- Royer, Anne, Toon A. B. van Veen, Sabrina Le Bouter, Céline Marionneau, Violaine Griol-Charhbil, Anne-Laure Léoni, Marja Steenman, et al. 2005. « Mouse Model of SCN5A-Linked Hereditary Lenègre's Disease Age-Related Conduction Slowing and Myocardial Fibrosis ». *Circulation* 111 (14): 1738-46. doi:10.1161/01.CIR.0000160853.19867.61.
- Ruan, Yanfei, Nian Liu, et Silvia G. Priori. 2009. « Sodium Channel Mutations and Arrhythmias ». *Nature Reviews Cardiology* 6 (5): 337-48. doi:10.1038/nrcardio.2009.44.
- Rudenskaya, Ge, Av Polyakov, Sm Tverskaya, Ev Zaklyazminskaya, Al Chukhrova, Oe Groznova, et Ek Ginter. 2008. « Laminopathies in Russian Families ». *Clinical Genetics* 74 (2): 127-33. doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01045.x.
- Saffitz, Jeffrey E. 2005. « Structural Heart Disease, SCN5A Gene Mutations, and Brugada Syndrome A Complex Ménage À Trois ». *Circulation* 112 (24): 3672-74. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.587147.
- Saffitz, Jeffrey E., James G. Laing, et Kathryn A. Yamada. 2000. « Connexin Expression and Turnover Implications for Cardiac Excitability ». *Circulation Research* 86 (7): 723-28. doi:10.1161/01.RES.86.7.723.
- Saffitz, Jeffrey E., et Richard B. Schuessler. 2000. « Connexin-40, Bundle-Branch Block, and Propagation at the Purkinje-Myocyte Junction ». *Circulation Research* 87 (10): 835-36. doi:10.1161/01.RES.87.10.835.
- Saga, Akiko, Akihiko Karibe, Jun Otomo, Kaoru Iwabuchi, Toshiaki Takahashi, Hiroyuki Kanno, Junichi Kikuchi, Mitsumasa Keitoku, Tsuyoshi Shinozaki, et Hiroaki Shimokawa. 2009. « Lamin A/C Gene Mutations in Familial Cardiomyopathy with Advanced Atrioventricular Block and Arrhythmia ». *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 218 (4): 309-16. doi:10.1620/tjem.218.309.
- Sanger, F., S. Nicklen, et A. R. Coulson. 1977. « DNA sequencing with chain-terminating inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463-67.
- Sarachek, Norman S., et James J. Leonard. 1972. « Familial heart block and sinus bradycardia: Classification and natural history ». *The American Journal of Cardiology*, Symposium on

- Electrophysiologic Correlates of Clinical Arrhythmias, 29 (4): 451-58. doi:10.1016/0002-9149(72)90432-8.
- Sarkozy, A, E Conti, C Neri, R D'Agostino, M Digilio, G Esposito, A Toscano, B Marino, A Pizzuti, et B Dallapiccola. 2005. « Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors ». *Journal of Medical Genetics* 42 (2): e16. doi:10.1136/jmg.2004.026740.
- Satake, Wataru, Yuko Nakabayashi, Ikuko Mizuta, Yushi Hirota, Chiyomi Ito, Michiaki Kubo, Takahisa Kawaguchi, et al. 2009. « Genome-Wide Association Study Identifies Common Variants at Four Loci as Genetic Risk Factors for Parkinson's Disease ». *Nature Genetics* 41 (12): 1303-7. doi:10.1038/ng.485.
- Schaal, Stephen F., JOHN SEIDENSTICKER, RICHARD GOODMAN, et CHARLES F. WOOLEY. 1973. « Familial Right Bundle-Branch Block, Left Axis Deviation, Complete Heart Block, and Early Death A Heritable Disorder of Cardiac Conduction ». *Annals of Internal Medicine* 79 (1): 63-66. doi:10.7326/0003-4819-79-1-63.
- Schott, Jean-Jacques, Connie Alshinawi, Florence Kyndt, Vincent Probst, Theo M. Hoorntje, Miriam Hulsbeek, Arthur A. M. Wilde, Denis Escande, Marcel M. A. M. Mannens, et Hervé Le Marec. 1999. « Cardiac Conduction Defects Associate with Mutations in SCN5A ». *Nature Genetics* 23 (1): 20-21. doi:10.1038/12618.
- Schott, Jean-Jacques, D. Woodrow Benson, Craig T. Basson, William Pease, G. Michael Silberbach, Jeffrey P. Moak, Barry J. Maron, Christine E. Seidman, et J. G. Seidman. 1998. « Congenital Heart Disease Caused by Mutations in the Transcription Factor NKX2-5 ». *Science* 281 (5373): 108-11. doi:10.1126/science.281.5373.108.
- Schulze-Bahr, Eric, Lars Eckardt, Günter Breithardt, Karlheinz Seidl, Thomas Wichter, Christian Wolpert, Martin Borggrefe, et Wilhelm Haverkamp. 2003. « Sodium Channel Gene (SCN5A) Mutations in 44 Index Patients with Brugada Syndrome: Different Incidences in Familial and Sporadic Disease ». *Human Mutation* 21 (6): 651-52. doi:10.1002/humu.9144.
- Schwartz, Peter J., Silvia G. Priori, Robert Dumaine, Carlo Napolitano, Charles Antzelevitch, Marco Stramba-Badiale, Todd A. Richard, Maria Rosaria Berti, et Raffaella Bloise. 2000. « A Molecular Link between the Sudden Infant Death Syndrome and the Long-QT Syndrome ». *New England Journal of Medicine* 343 (4): 262-67. doi:10.1056/NEJM200007273430405.
- Scouarnec, Solena Le, Matilde Karakachoff, Jean-Baptiste Gourraud, Pierre Lindenbaum, Stéphanie Bonnaud, Vincent Portero, Laëtitia Duboscq-Bidot, et al. 2015. « Testing the Burden of Rare Variation in Arrhythmia-Susceptibility Genes Provides New Insights into Molecular Diagnosis for Brugada Syndrome ». *Human Molecular Genetics*, février, ddv036. doi:10.1093/hmg/ddv036.
- Shen, Cheng, Lei Xu, Zhiyin Yang, Yunzeng Zou, Kai Hu, Zheng Fan, Junbo Ge, et Aijun Sun. 2013. « A1180V of Cardiac Sodium Channel Gene (SCN5A): Is It a Risk Factor for Dilated Cardiomyopathy or Just a Common Variant in Han Chinese? ». *Disease markers* 35 (5): 531-35. doi:10.1155/2013/659528.
- Shim, Sung Han, Masamichi Ito, Thomas Maher, et Aubrey Milunsky. 2005. « Gene Sequencing in Neonates and Infants with the Long QT Syndrome ». *Genetic Testing* 9 (4): 281-84. doi:10.1089/gte.2005.9.281.
- Shin, Dong-Jik, Yangsoo Jang, Hyun-Young Park, Jong Eun Lee, Keumjin Yang, Eunmin Kim, Yoonjung Bae, et al. 2004. « Genetic Analysis of the Cardiac Sodium Channel Gene SCN5A in Koreans with Brugada Syndrome ». *Journal of Human Genetics* 49 (10): 573-78. doi:10.1007/s10038-004-0182-z.

- Shin, Dong-Jik, Eunmin Kim, Sang-Bum Park, Won-Cheoul Jang, Yoonsun Bae, Jihye Han, Yangsoo Jang, et al. 2007. « A novel mutation in the SCN5A gene is associated with Brugada syndrome ». *Life Sciences* 80 (8): 716-24. doi:10.1016/j.lfs.2006.10.025.
- Shirai, Nobumasa, Naomasa Makita, Koji Sasaki, Hisataka Yokoi, Ichiro Sakuma, Harumizu Sakurada, Jun Akai, Akinori Kimura, Masayasu Hiraoka, et Akira Kitabatake. 2002. « A Mutant Cardiac Sodium Channel with Multiple Biophysical Defects Associated with Overlapping Clinical Features of Brugada Syndrome and Cardiac Conduction Disease ». *Cardiovascular Research* 53 (2): 348-54. doi:10.1016/S0008-6363(01)00494-1.
- Shi, Ruiming, Yanmin Zhang, Chun Yang, Chen Huang, Xihui Zhou, Hua Qiang, Andrew A. Grace, Christopher L.-H. Huang, et Aiqun Ma. 2008. « The cardiac sodium channel mutation delQKP 1507–1509 is associated with the expanding phenotypic spectrum of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth sudden death ». *Europace* 10 (11): 1329-35. doi:10.1093/europace/eun202.
- Shy, Diana, Ludovic Gillet, et Hugues Abriel. 2013. « Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: The multiple pool model ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Cardiomyocyte Biology: Cardiac Pathways of Differentiation, Metabolism and Contraction*, 1833 (4): 886-94. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.10.026.
- Simon, Alexander M., Daniel A. Goodenough, et David L. Paul. 1998. « Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block ». *Current Biology* 8 (5): 295-98. doi:10.1016/S0960-9822(98)70113-7.
- Sirén, M. K., H. Julkunen, et R. Kaaja. 1998. « The Increasing Incidence of Isolated Congenital Heart Block in Finland ». *The Journal of Rheumatology* 25 (9): 1862-64.
- Six, Isabelle, Jean-Sylvain Hermida, Hai Huang, Laetitia Gouas, Véronique Fressart, Nawal Benammar, Bernard Hainque, Isabelle Denjoy, Mohamed Chahine, et Pascale Guicheney. 2008. « The Occurrence of Brugada Syndrome and Isolated Cardiac Conductive Disease in the Same Family Could Be due to a Single SCN5A Mutation or to the Accidental Association of Both Diseases ». *EP Europace* 10 (1): 79-85. doi:10.1093/europace/eum271.
- Slatkin, Montgomery. 2009. « Epigenetic Inheritance and the Missing Heritability Problem ». *Genetics* 182 (3): 845-50. doi:10.1534/genetics.109.102798.
- Smeenk, R. J. 1997. « Immunological Aspects of Congenital Atrioventricular Block ». *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* 20 (8 Pt 2): 2093-97.
- Smit, Arian FA. 1996. « The origin of interspersed repeats in the human genome ». *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (6): 743-48. doi:10.1016/S0959-437X(96)80030-X.
- Smits, Jeroen P. P., Tamara T. Koopmann, Ronald Wilders, Marieke W. Veldkamp, Tobias Opthof, Zahir A. Bhuiyan, Marcel M. A. M. Mannens, et al. 2005. « A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (6): 969-81. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.02.024.
- Söhl, Goran, et Klaus Willecke. 2004. « Gap Junctions and the Connexin Protein Family ». *Cardiovascular Research* 62 (2): 228-32. doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.013.
- Sotoodehnia, Nona, Aaron Isaacs, Paul I.W. de Bakker, Marcus Dörr, Christopher Newton-Cheh, Ilja M. Nolte, Pim van der Harst, et al. 2010. « Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction ». *Nature Genetics* 42 (12): 1068-76. doi:10.1038/ng.716.
- Splawski, Igor, Jiayang Shen, Katherine W Timothy, Michael H Lehmann, Silvia Priori, Jennifer L Robinson, Arthur J Moss, et al. 2000. « Spectrum of Mutations in Long-QT

- Syndrome Genes : KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2 ». *Circulation* 102 (10): 1178-85.
- Stallmeyer, Birgit, Matthias Koopmann, et Eric Schulze-Bahr. 2012. « Identification of Novel Mutations in LMNA Associated with Familial Forms of Dilated Cardiomyopathy ». *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 16 (6): 543-49. doi:10.1089/gtmb.2011.0214.
- Stallmeyer, Birgit, Sven Zumhagen, Isabelle Denjoy, Guillaume Duthoit, Jean-Louis Hébert, Xavier Ferrer, Svetlana Maugenre, et al. 2012. « Mutational Spectrum in the Ca²⁺-Activated Cation Channel Gene TRPM4 in Patients with Cardiac Conductance Disturbances ». *Human Mutation* 33 (1): 109-17. doi:10.1002/humu.21599.
- Steel, Karen P. 1998. « One Connexin, Two Diseases ». *Nature Genetics* 20 (4): 319-20. doi:10.1038/3781.
- Steenkamp, W. F. J. 1972. « Familial trifascicular block ». *American Heart Journal* 84 (6): 758-60. doi:10.1016/0002-8703(72)90067-1.
- Stein, Lincoln D. 2010. « The case for cloud computing in genome informatics ». *Genome Biology* 11 (5): 207. doi:10.1186/gb-2010-11-5-207.
- Stéphan, Edouard. 1978. « Hereditary bundle branch system defect: Survey of a family with four affected generations ». *American Heart Journal* 95 (1): 89-95. doi:10.1016/0002-8703(78)90401-5.
- . 1979. « Hereditary bundle branch system defect. A new genetic entity? ». *American Heart Journal* 97 (6): 708-18. doi:10.1016/0002-8703(79)90005-X.
- Stéphan, Edouard, Anne de Meeus, et Patrice Bouvagnet. 1997. « Hereditary bundle branch defect: Right bundle branch blocks of different causes have different morphologic characteristics ». *American Heart Journal* 133 (2): 249-56. doi:10.1016/S0002-8703(97)70215-1.
- Sun, A., L. Xu, S. Wang, K. Wang, W. Huang, Y. Wang, Y. Zou, et J. Ge. 2008. « SCN5A R1193Q Polymorphism Associated with Progressive Cardiac Conduction Defects and Long QT Syndrome in a Chinese Family ». *Journal of Medical Genetics* 45 (2): 127-28. doi:10.1136/jmg.2007.056333.
- Sun, Li-ping, Lin Wang, Hui Wang, Yin-hui Zhang, et Jie-lin Pu. 2010. « Connexin 43 Remodeling Induced by LMNA Gene Mutation Glu82Lys in Familial Dilated Cardiomyopathy with Atrial Ventricular Block ». *Chinese Medical Journal* 123 (8): 1058-62.
- Surawicz, Borys, Rory Childers, Barbara J. Deal, et Leonard S. Gettes. 2009. « AHA/ACCF/HRS Recommendations for the Standardization and Interpretation of the Electrocardiogram Part III: Intraventricular Conduction Disturbances: A Scientific Statement From the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society: Endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology ». *Circulation* 119 (10): e235-40. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191095.
- Surber, Ralf, Sabine Hensellek, Dirk Prochnau, Gerald S. Werner, Klaus Benndorf, Hans R. Figulla, et Thomas Zimmer. 2008. « Combination of Cardiac Conduction Disease and Long QT Syndrome Caused by Mutation T1620K in the Cardiac Sodium Channel ». *Cardiovascular Research* 77 (4): 740-48. doi:10.1093/cvr/cvm096.
- Sylvius, Nicolas, et Frédérique Tesson. 2006. « Lamin A/C and Cardiac Diseases ». *Current Opinion in Cardiology* 21 (3): 159-65. doi:10.1097/01.hco.0000221575.33501.58.
- Taboulet, P. 2014. « La conduction intracardiaque ». *Annales françaises de médecine d'urgence* 4 (5): 295-302. doi:10.1007/s13341-014-0424-4.

- Takehara, N., N. Makita, J. Kawabe, N. Sato, Y. Kawamura, A. Kitabatake, et K. Kikuchi. 2004. « A Cardiac Sodium Channel Mutation Identified in Brugada Syndrome Associated with Atrial Standstill ». *Journal of Internal Medicine* 255 (1): 137-42. doi:10.1046/j.0954-6820.2003.01247.x.
- Tan, Bi-Hua, Pedro Iturralde-Torres, Argelia Medeiros-Domingo, Santiago Nava, David J Tester, Carmen R. Valdivia, Teresa Tusié-Luna, Michael J. Ackerman, et Jonathan C. Makielski. 2007. « A novel C-terminal truncation SCN5A mutation from a patient with sick sinus syndrome, conduction disorder and ventricular tachycardia ». *Cardiovascular research* 76 (3): 409-17. doi:10.1016/j.cardiores.2007.08.006.
- Tan, Hanno L., Connie R. Bezzina, Jeroen P. P. Smits, Arie O. Verkerk, et Arthur A. M. Wilde. 2003. « Genetic Control of Sodium Channel Function ». *Cardiovascular Research* 57 (4): 961-73. doi:10.1016/S0008-6363(02)00714-9.
- Tan, Hanno L., Margreet T. E. Bink-Boelkens, Connie R. Bezzina, Prakash C. Viswanathan, Gertie C. M. Beaufort-Krol, Peter J. van Tintelen, Maarten P. van den Berg, Arthur A. M. Wilde, et Jeffrey R. Balsler. 2001. « A Sodium-Channel Mutation Causes Isolated Cardiac Conduction Disease ». *Nature* 409 (6823): 1043-47. doi:10.1038/35059090.
- Taylor, Pamela V., K. F. Taylor, Alison Norman, Sharon Griffiths, et J. S. Scott. 1988. « PREVALENCE OF MATERNAL Ro (SS-A) AND La (SS-B) AUTOANTIBODIES IN RELATION TO CONGENITAL HEART BLOCK ». *Rheumatology* 27 (2): 128-32. doi:10.1093/rheumatology/27.2.128.
- Temple, Ian P., Shin Inada, Halina Dobrzynski, et Mark R. Boyett. 2013. « Connexins and the atrioventricular node ». *Heart Rhythm* 10 (2): 297-304. doi:10.1016/j.hrthm.2012.10.020.
- Tester, David J., Laura J. Kopplin, Melissa L. Will, et Michael J. Ackerman. 2005. « Spectrum and prevalence of cardiac ryanodine receptor (RyR2) mutations in a cohort of unrelated patients referred explicitly for long QT syndrome genetic testing ». *Heart Rhythm* 2 (10): 1099-1105. doi:10.1016/j.hrthm.2005.07.012.
- Tiso, Natascia, Dietrich A. Stephan, Andrea Nava, Alessia Bagattin, Joseph M. Devaney, Fabio Stanchi, Gaelle Larderet, et al. 2001. « Identification of Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene in Families Affected with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 2 (ARVD2) ». *Human Molecular Genetics* 10 (3): 189-94. doi:10.1093/hmg/10.3.189.
- Tsagaris, T. J., R. A. Bustamante, et R. A. Friesendorff. 1967. « Familial heart disease ». *Chest* 52 (2): 153-58. doi:10.1378/chest.52.2.153.
- Tseng, Tsai-Tien, Allison M. McMahon, Victoria T. Johnson, Erwin Z. Mangubat, Robert J. Zahm, Mary E. Pacold, et Eric Jakobsson. 2007. « Sodium Channel Auxiliary Subunits ». *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 12 (3-4): 249-62. doi:10.1159/000099646.
- Tsuji, Shoji. 2010. « Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing ». *Human Molecular Genetics* 19 (R1): R65-70. doi:10.1093/hmg/ddq162.
- Tsutsui, Makusu, Kazuki Matsubara, Takahito Ohshiro, Masayuki Furuhashi, Masateru Taniguchi, et Tomoji Kawai. 2011. « Electrical Detection of Single Methylcytosines in a DNA Oligomer ». *Journal of the American Chemical Society* 133 (23): 9124-28. doi:10.1021/ja203839e.
- Ueda, Kazuo, Carmen Valdivia, Argelia Medeiros-Domingo, David J. Tester, Matteo Vatta, Gianrico Farrugia, Michael J. Ackerman, et Jonathan C. Makielski. 2008. « Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (27): 9355-60. doi:10.1073/pnas.0801294105.

- Valdivia, Carmen R., Michael J. Ackerman, David J. Tester, Tomoyuki Wada, Jorge McCormack, Bin Ye, et Jonathan C. Makielski. 2002. « A Novel SCN5A Arrhythmia Mutation, M1766L, with Expression Defect Rescued by Mexiletine ». *Cardiovascular Research* 55 (2): 279-89. doi:10.1016/S0008-6363(02)00445-5.
- Van den Berg, M. P., A. A. Wilde, null Viersma TJW, J. Brouwer, J. Haaksma, A. H. van der Hout, I. Stolte-Dijkstra, et al. 2001. « Possible Bradycardic Mode of Death and Successful Pacemaker Treatment in a Large Family with Features of Long QT Syndrome Type 3 and Brugada Syndrome ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 12 (6): 630-36.
- Van den Boogaard, Malou, Scott Smemo, Ozanna Burnicka-Turek, David E. Arnolds, Harmen J.G. van de Werken, Petra Klous, David McKean, et al. 2014. « A common genetic variant within SCN10A modulates cardiac SCN5A expression ». *The Journal of Clinical Investigation* 124 (4): 1844-52. doi:10.1172/JCI73140.
- Van den Boogaard, Malou, L. Y. Elaine Wong, Federico Tessadori, Martijn L. Bakker, Lisa K. Dreizehnter, Vincent Wakker, Connie R. Bezzina, et al. 2012. « Genetic Variation in T-Box Binding Element Functionally Affects SCN5A/SCN10A Enhancer ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2519-30. doi:10.1172/JCI62613.
- Van der Merwe, P. L., A. G. Rose, J. J. van der Walt, H. W. Weymar, J. C. Hunter, et H. F. Weich. 1991. « Progressive Familial Heart Block Type I. Clinical and Pathological Observations ». *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 80 (1): 34-38.
- Van Engelen, B. G. M., A. Muchir, C. J. Hutchison, A. J. van der Kooi, G. Bonne, et M. Lammens. 2005. « The Lethal Phenotype of a Homozygous Nonsense Mutation in the Lamin A/C Gene ». *Neurology* 64 (2): 374-76. doi:10.1212/01.WNL.0000149763.15180.00.
- Vardas, Panos E., Angelo Auricchio, Jean-Jacques Blanc, Jean-Claude Daubert, Helmut Drexler, Hugo Ector, Maurizio Gasparini, et al. 2007a. « Guidelines for Cardiac Pacing and Cardiac Resynchronization Therapy ». *European Heart Journal* 28 (18): 2256-95. doi:10.1093/eurheartj/ehm305.
- . 2007b. « Guidelines for Cardiac Pacing and Cardiac Resynchronization Therapy ». *Europace* 9 (10): 959-98. doi:10.1093/europace/eum189.
- Veen, Toon A. B. van, Harold V. M. van Rijen, et Tobias Opthof. 2001. « Cardiac Gap Junction Channels: Modulation of Expression and Channel Properties ». *Cardiovascular Research* 51 (2): 217-29. doi:10.1016/S0008-6363(01)00324-8.
- Veen, Toon A. B. van, Mera Stein, Anne Royer, Khai Le Quang, Flavien Charpentier, William H. Colledge, Christopher L.-H. Huang, et al. 2005. « Impaired Impulse Propagation in Scn5a-Knockout Mice Combined Contribution of Excitability, Connexin Expression, and Tissue Architecture in Relation to Aging ». *Circulation* 112 (13): 1927-35. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.539072.
- Veldkamp, Marieke W., Ronald Wilders, Antonius Baartscheer, Jan G. Zegers, Connie R. Bezzina, et Arthur A. M. Wilde. 2003. « Contribution of Sodium Channel Mutations to Bradycardia and Sinus Node Dysfunction in LQT3 Families ». *Circulation Research* 92 (9): 976-83. doi:10.1161/01.RES.0000069689.09869.A8.
- Veltman, Joris A., et Han G. Brunner. 2012. « De Novo Mutations in Human Genetic Disease ». *Nature Reviews Genetics* 13 (8): 565-75. doi:10.1038/nrg3241.
- Venter, J. Craig, Mark D. Adams, Eugene W. Myers, Peter W. Li, Richard J. Mural, Granger G. Sutton, Hamilton O. Smith, et al. 2001. « The Sequence of the Human Genome ». *Science* 291 (5507): 1304-51. doi:10.1126/science.1058040.
- Ventra, Massimiliano Di. 2013. « Fast DNA Sequencing by Electrical Means Inches Closer ». *Nanotechnology* 24 (34): 342501. doi:10.1088/0957-4484/24/34/342501.

- Verheule, S., C. A. van Batenburg, F. E. Coenjaerts, S. Kirchhoff, K. Willecke, et H. J. Jongsma. 1999. « Cardiac Conduction Abnormalities in Mice Lacking the Gap Junction Protein connexin40 ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 10 (10): 1380-89.
- Villain, Elisabeth, Nathalie Coatedoat-Chalumeau, Eloi Marijon, Younes Boudjemline, Jean-Charles Piette, et Damien Bonnet. 2006. « Presentation and Prognosis of Complete Atrioventricular Block in Childhood, According to Maternal Antibody Status ». *Journal of the American College of Cardiology* 48 (8): 1682-87. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.034.
- Villard, Eric, Laetitia Duboscq-Bidot, Philippe Charron, Abdelaziz Benaiche, Viviane Conraads, Nicolas Sylvius, et Michel Komajda. 2005. « Mutation Screening in Dilated Cardiomyopathy: Prominent Role of the Beta Myosin Heavy Chain Gene ». *European Heart Journal* 26 (8): 794-803. doi:10.1093/eurheartj/ehi193.
- Viswanathan, Prakash C., D. Woodrow Benson, et Jeffrey R. Balser. 2003. « A Common SCN5A Polymorphism Modulates the Biophysical Effects of an SCN5A Mutation ». *Journal of Clinical Investigation* 111 (3): 341-46. doi:10.1172/JCI200316879.
- Vorobiof, Gabriel, Daniel Kroening, Burr Hall, Ramon Brugada, et David Huang. 2008. « Brugada Syndrome with Marked Conduction Disease: Dual Implications of a SCN5A Mutation ». *Pacing and Clinical Electrophysiology* 31 (5): 630-34. doi:10.1111/j.1540-8159.2008.01056.x.
- Vozzi, Cristina, Emmanuel Dupont, Steven R. Coppen, Hung-I Yeh, et Nicholas J. Severs. 1999. « Chamber-related Differences in Connexin Expression in the Human Heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31 (5): 991-1003. doi:10.1006/jmcc.1999.0937.
- Vytopil, M., S. Benedetti, E. Ricci, G. Galluzzi, A. Dello Russo, L. Merlini, G. Boriani, et al. 2003. « Mutation Analysis of the Lamin A/C Gene (LMNA) among Patients with Different Cardiomyopathy Phenotypes ». *Journal of Medical Genetics* 40 (12): e132-e132. doi:10.1136/jmg.40.12.e132.
- Wang, Dao W., Reshma R. Desai, Lia Crotti, Marianne Arnestad, Roberto Insolia, Matteo Pedrazzini, Chiara Ferrandi, et al. 2007. « Cardiac Sodium Channel Dysfunction in Sudden Infant Death Syndrome ». *Circulation* 115 (3): 368-76. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646513.
- Wang, Dao W., Prakash C. Viswanathan, Jeffrey R. Balser, Alfred L. George, et D. Woodrow Benson. 2002. « Clinical, Genetic, and Biophysical Characterization of SCN5A Mutations Associated With Atrioventricular Conduction Block ». *Circulation* 105 (3): 341-46. doi:10.1161/hc0302.102592.
- Wang, Gao T., Biao Li, Regie P. Lyn Santos-Cortez, Bo Peng, et Suzanne M. Leal. 2014. « Power Analysis and Sample Size Estimation for Sequence-Based Association Studies ». *Bioinformatics* 30 (16): 2377-78. doi:10.1093/bioinformatics/btu296.
- Wang, Q, S Chen, Q Chen, X Wan, J Shen, G Hoeltge, A Timur, M Keating, et G Kirsch. 2004. « The common SCN5A mutation R1193Q causes LQTS-type electrophysiological alterations of the cardiac sodium channel ». *Journal of Medical Genetics* 41 (5): e66. doi:10.1136/jmg.2003.013300.
- Wang, Q., J. Shen, I. Splawski, D. Atkinson, Z. Li, J. L. Robinson, A. J. Moss, J. A. Towbin, et M. T. Keating. 1995. « SCN5A Mutations Associated with an Inherited Cardiac Arrhythmia, Long QT Syndrome ». *Cell* 80 (5): 805-11.
- Wang, Zhong, Mark Gerstein, et Michael Snyder. 2009. « RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics ». *Nature Reviews Genetics* 10 (1): 57-63. doi:10.1038/nrg2484.
- Watanabe, Hiroshi, Dawood Darbar, Daniel W. Kaiser, Kim Jiramongkolchai, Sameer Chopra, Brian S. Donahue, Prince J. Kannankeril, et Dan M. Roden. 2009. « Mutations in Sodium Channel β 1- and β 2-Subunits Associated With Atrial Fibrillation ». *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2 (3): 268-75. doi:10.1161/CIRCEP.108.779181.

- Watanabe, Hiroshi, Tamara T Koopmann, Solena Le Scouarnec, Tao Yang, Christiana R Ingram, Jean-Jacques Schott, Sophie Demolombe, et al. 2008. « Sodium Channel β 1 Subunit Mutations Associated with Brugada Syndrome and Cardiac Conduction Disease in Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (6): 2260-68. doi:10.1172/JCI33891.
- Wehrens, Xander H.T. 2007. « The molecular basis of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: What are the different hypotheses regarding mechanisms? ». *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society* 4 (6): 794-97. doi:10.1016/j.hrthm.2006.12.016.
- Wei, Jian, Dao W. Wang, Marco Alings, Frank Fish, Mark Wathen, Dan M. Roden, et Alfred L. George. 1999. « Congenital Long-QT Syndrome Caused by a Novel Mutation in a Conserved Acidic Domain of the Cardiac Na⁺ Channel ». *Circulation* 99 (24): 3165-71. doi:10.1161/01.CIR.99.24.3165.
- Wendkos, Martin H., et Robert S. Study. 1947. « Familial congenital complete A-V heart block ». *American Heart Journal* 34 (1): 138-42. doi:10.1016/0002-8703(47)90465-1.
- Whalley, D. W., D. J. Wendt, et A. O. Grant. 1995. « Basic Concepts in Cellular Cardiac Electrophysiology: Part I: Ion Channels, Membrane Currents, and the Action Potential ». *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* 18 (8): 1556-74.
- Wold, Barbara, et Richard M. Myers. 2008. « Sequence Census Methods for Functional Genomics ». *Nature Methods* 5 (1): 19-21. doi:10.1038/nmeth1157.
- Wolf, Cordula M, et Charles I Berul. 2006. « Inherited Conduction System Abnormalities—One Group of Diseases, Many Genes ». *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 17 (4): 446-55. doi:10.1111/j.1540-8167.2006.00427.x.
- Wolf, Cordula M, Libin Wang, Ronny Alcalai, Anne Pizard, Patrick G Burgon, Ferhaan Ahmad, Megan Sherwood, et al. 2008. « Lamin A/C Haploinsufficiency Causes Dilated Cardiomyopathy and Apoptosis-Triggered Cardiac Conduction System Disease ». *Journal of molecular and cellular cardiology* 44 (2): 293-303. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.11.008.
- Worman, Howard J., et Gisèle Bonne. 2007. « “Laminopathies:” a wide spectrum of human diseases ». *Experimental cell research* 313 (10): 2121-33. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.028.
- Zareba, Wojciech, Mehdi N Sattari, Spencer Rosero, Jean Philippe Couderc, et Arthur J Moss. 2001. « Altered atrial, atrioventricular, and ventricular conduction in patients with the long QT syndrome caused by the Δ KPQ SCN5A sodium channel gene mutation ». *The American Journal of Cardiology* 88 (11): 1311-14. doi:10.1016/S0002-9149(01)02097-5.
- Zhang, Bi-li, Rong-liang Xu, Jing Zhang, Xian-xian Zhao, Hong Wu, Li-ping Ma, Jian-qiang Hu, et al. 2013. « Identification and functional analysis of a novel PRKAG2 mutation responsible for Chinese PRKAG2 cardiac syndrome reveal an important role of non-CBS domains in regulating the AMPK pathway ». *Journal of Cardiology* 62 (4): 241-48. doi:10.1016/j.jjcc.2013.04.010.
- Zhang, Yanmin, Juanli Wang, Suer Chang, Nan Zhou, Haijian Xing, Lei Wang, Chen Huang, et al. 2014. « The SCN5A Mutation A1180V Is Associated With Electrocardiographic Features of LQT3 ». *Pediatric Cardiology* 35 (2): 295-300. doi:10.1007/s00246-013-0773-6.
- Zhang, Y., T. Wang, A. Ma, X. Zhou, J. Gui, H. Wan, R. Shi, et al. 2008. « Correlations between Clinical and Physiological Consequences of the Novel Mutation R878C in a Highly Conserved Pore Residue in the Cardiac Na⁺ Channel ». *Acta Physiologica (Oxford, England)* 194 (4): 311-23. doi:10.1111/j.1748-1716.2008.01883.x.

- Zhao, Min, Qingguo Wang, Quan Wang, Peilin Jia, et Zhongming Zhao. 2013. « Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives ». *BMC Bioinformatics* 14 (Suppl 11): S1. doi:10.1186/1471-2105-14-S11-S1.
- Zhao, Yong, Xian-Min Meng, Ying-Jie Wei, Xiu-Wen Zhao, Dong-Qing Liu, Hui-Qing Cao, Choong-Chin Liew, et Jin-Feng Ding. 2003. « Cloning and Characterization of a Novel Cardiac-Specific Kinase That Interacts Specifically with Cardiac Troponin I ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 81 (5): 297-304. doi:10.1007/s00109-003-0427-x.
- Zhou, Yi-Meng, Peng-Xiang Zheng, Yi-Qing Yang, Zhi-Ming Ge, et Wei-Qiang Kang. 2013. « A Novel PITX2c Loss-of-function Mutation Underlies Lone Atrial Fibrillation ». *International Journal of Molecular Medicine* 32 (4): 827-34. doi:10.3892/ijmm.2013.1463.
- Zimmer, Thomas, et Ralf Surber. 2008. « SCN5A channelopathies – An update on mutations and mechanisms ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Focussed Issue: Translational models for cardiac arrhythmogenesis, 98 (2–3): 120-36. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2008.10.005.

RESUMÉ – ABSTRACT

Application des nouvelles stratégies de criblage génétique aux troubles de la conduction cardiaque

Les troubles de la conduction cardiaque (TdCC) sont un groupe hétérogène de pathologies pouvant notamment être congénitales (blocs atrioventriculaires congénitaux (BAVc)) ou dégénératives (blocs atrioventriculaires dégénératifs (BAVd)). Des formes familiales ont été rapportées et plusieurs gènes ont déjà été décrits dans cette pathologie : *SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4* et *GJA5*. D'autres gènes, comme le gène *LMNA*, ont été identifiés dans des formes non isolées de TdCC.

L'avènement des technologies de nouvelle génération de séquençage (NGS) permet aujourd'hui d'envisager de nouvelles stratégies d'analyse. Basé sur ces nouvelles approches, mon projet de thèse a notamment permis :

1/ de séquencer les exomes de 4 ou 5 patients atteints dans 4 familles. Ceci a conduit à l'identification d'un variant dans le gène *LMNA* ségrégeant avec la pathologie au sein d'une famille de plus de 160 membres dont certains sont atteints de BAVd isolés ;

2/ de tester 163 gènes à implication cardiaque connue ou supposée sur une cohorte de 95 patients atteints de BAVd. L'identification d'un nouveau variant dans le gène *TRPM4* chez l'un d'eux a conduit au recrutement de la troisième plus grande famille de TdCC décrite pour ce gène ;

3/ de séquencer les exomes de 15 enfants atteints de BAVc et de leurs parents sains, soit 45 exomes. Plusieurs variants *de novo* potentiellement intéressants ont été identifiés dans des gènes tels que *GJA5* ou *RYR2*.

L'ensemble de ces travaux améliorent la connaissance des bases génétiques responsables des TdCC et permettent de dessiner les bases nouvelles de futures études dont le but sera d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de ces pathologies.

Mots-clé : Conduction cardiaque, Blocs atrioventriculaires, Technologies de séquençage de nouvelle génération, Séquençage d'exome, Séquençage ciblé haut-débit, Génétique, *TRPM4*, *LMNA*.

Application of next generation sequencing technologies to investigate the genetics of Cardiac Conduction Defects

Atrioventricular blocks (AVB) constitute a heterogeneous group of heart conduction disorders. They include degenerative conduction disturbances – called progressive cardiac conduction defects (PCCD) – as well as congenital AVB. Familial forms of heart conduction defects have already been reported with an autosomal dominant inheritance and several genes have been described in this pathology: *SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4* and *GJA5*. Other genes, such as *LMNA*, have been identified in AVB forms associated with other diseases.

The recent emergence of next-generation sequencing (NGS) technologies has allowed us to consider new strategies of analysis. Based on these new approaches my thesis project notably enabled us to:

1/ sequence the exomes of 4 or 5 affected patients in 4 families. This led to the identification of one variant in the *LMNA* gene that segregates with the pathology in a 160 members family, some of which presenting with PCCD;

2/ test 163 genes with known or suspected cardiac involvement on a 95 unrelated PCCD patients. The identification of a new *TRPM4* variant in one of them led to the recruitment of the third largest PCCD family that has been described for this gene;

3/ sequence the exome of 15 congenital AVB children and those of their parents (a total of 45 exomes have been sequenced for this project). Several potentially interesting *de novo* variants in genes such as *GJA5* or *RYR2* could have been highlighted.

These works improve our knowledge of the genetic basis responsible for AVB enable the design of the new basis for future studies which will aim at providing a better understanding of the pathophysiological mechanisms these pathologies.

Keywords: Cardiac conduction, atrioventricular blocks, Next-Generation Sequencing (NGS) Technologies, exome sequencing, Targeted high-throughput sequencing, Genetics, *TRPM4*, *LMNA*.