

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ (ED 502)

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

									3	8
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

VARIATIONS GENETIQUES ET SYNDROME DE BRUGADA

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Science de la vie et de la santé

Spécialité : Génétique et physiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Vincent PORTERO

Le 19 novembre 2013, devant le jury ci-dessous

Président : Mme. Laurence COLLEAUX, Directeur de recherche, Paris

Rapporteurs : Mme. Emmanuelle GENIN, Directeur de recherche, Brest
M. Sylvain RICHARD, Directeur de recherche, Montpellier

Examineurs : Mme. Bénédicte D'ARGENT, Directeur de recherche, Marseille
Mme. Laurence COLLEAUX, Directeur de recherche, Paris

Directeurs de thèse : M. Richard REDON, Directeur de Recherche, Nantes
M. Flavien CHARPENTIER, Directeur de Recherche, Nantes

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier monsieur LE MAREC, Directeur de l'institut du thorax de m'avoir accueilli au sein de son unité, et de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je tiens à vous remercier surtout pour les discussions passionnantes m'ayant permis de faire le lien entre mes découvertes et la clinique, et pour votre capacité à transmettre votre passion pour la recherche médicale.

Merci à Emmanuelle GENIN et Sylvain RICHARD pour me faire l'honneur d'évaluer mon manuscrit et de participer à mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier Bénédicte D'ARGENT et Laurence COLLEAUX pour me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier mes deux excellents directeurs de thèse, Flavien CHARPENTIER et Richard REDON avec qui j'ai vécu une très belle aventure scientifique durant ces 3 années. Je pense avoir eu énormément de chance.

Merci Flavien d'avoir cru en moi dès le départ (depuis le M2), pour avoir toujours été disponible lorsque je venais te voir pour confronter mes hypothèses. Pour ton respect de la créativité scientifique et ta manière pédagogique d'orienter mes lectures.

Merci Richard, pour ton soutien, tes encouragements, ta confiance, pour la qualité de tes conseils qui ont à chaque fois débloqué des situations complexes. Pour m'avoir permis d'être moi-même et de m'avoir accepté tel que j'étais. Tu m'as inculqué le goût de la belle science.

Merci à Jean-Jacques SCHOTT, pour nos discussions et tes conseils qui se sont avérés d'une grande aide.

Merci à Solène LESCOUARNEC, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. J'ai travaillé à distance avec toi pendant mes deux premières années de thèse sur l'analyse des 13 exomes Brugada alors que le séquençage haut débit venait tout juste d'apparaître. Ton calme et ton organisation m'ont fait progresser dans ma manière de structurer mon travail. J'estime avoir eu beaucoup de chance de collaborer avec toi sur ce projet et je suis heureux que tu sois revenue à Nantes pour ma dernière année, quoi qu'en pense Pierre. Je te souhaite le meilleur pour tes concours, je pense que tu le mérites vraiment.

A Jean-Baptiste GOURRAUD, mon co-thésard médecin avec qui j'ai travaillé main dans la main sur les familles de Repolarisation précoce et de Brugada. Cela aura été un grand plaisir de collaborer avec toi et j'espère que nous aurons l'occasion de travailler ensemble dans le futur. Je crois que tu auras été un des plus grands supporters de mon travail et je t'en remercie. On reste en contact et tu viens quand tu veux à Amsterdam.

Merci à Pierre LINDEMBAUM qui a très souvent vécu par ma faute la situation ci-dessous.



C'est toi qui as permis la création de logiciels d'analyse d'exome dont tous les tésards de génétique profitent aujourd'hui. Merci pour ta disponibilité et désolé de ne pas avoir plus accroché à la bio-info malgré toutes tes tentatives.

Merci à Christian DINA et à Floriane SIMONET (la stagiaire de Pierre) pour leur aide précieuse dans l'analyse IBD des familles. Désolé d'avoir été si insistant parfois... Les blagues de généticien de Christian m'ont permis d'évaluer quotidiennement mes compétences en génétiques.

Merci à Stéphanie BONNAUD d'avoir été la première personne à qui je confrontais mes hypothèses farfelues. Merci pour ton soutien moral, ton aide technique, ton écoute, tes conseils et ton coup de pouce dans la correction de mon manuscrit.

Au professeur PROBST et au professeur MABO pour votre implication sur le plan clinique des travaux auxquels j'ai participé.

Merci à Stéphanie CHATEL pour tes conseils tout au long de ma thèse et le travail de fond réalisé dans ton activité de coordination recherche-clinique.

Merci à Estelle BARON et Hadja ELDJOUZI avec qui j'ai partagé tant de bons moments lorsque nous logions dans le même bureau et dont j'ai largement profité des vos compétences techniques et théoriques. Merci pour tous vos délicieux gâteaux. Vous allez me manquer.

Merci Pr. LECOINTE pour votre humour, votre sympathie, vos conseils et votre bonne humeur sinusoidale☺. Vous êtes probablement le commandeur de primers le plus rapide de l'ouest et cela m'a facilité la tâche à bien des moments.

Merci aux personnes de la plateforme de génomique. Tout d'abord Françoise GROS, Tu m'as toujours soutenu, encouragé et tu as toujours été présente lorsque j'avais besoin d'aide. Merci à Aurore DESPRES pour ton aide technique et ta bonne humeur lors de mes deux premières années de thèse j'espère que tu es heureuse malgré la pluie de la Bretagne. Merci à Laetitia DUBOSCQ-BIDOT pour ton aide dans le criblage de variant du gène *CLASP2* dans la deuxième plaque Brugada et bravo pour ton travail de mise en place du NGS à la maison. Merci à Jade VILLEAU pour ton enthousiasme et ta bonne humeur perpétuelle. Merci à Raluca TEUSAN pour ton aide en bio-info sur le projet Haloplex et pour ta bonne humeur. Merci Eric CHARPENTIER pour ton gros travail sur les outils CGH et sur le contrôle qualité des puces Axiom. Merci Audrey.B et Edouard.H qui participent au maintien d'une très bonne ambiance dans l'aquarium des bio-info.

Merci à Thierry GIRAUDET, Marie-France et Martine LE CUNFF pour votre bonne humeur quotidienne. Ne t'inquiète pas Martine, j'ai prévu de t'envoyer mes blouses sales d'Amsterdam. Merci à Béatrice DELASALLE-GUYOMARCH pour son expertise statistique.

Merci aux attachées de recherche clinique et tout particulièrement à Christine FRUCHET pour sa réactivité dans le recrutement familial.

Gracias a ti Marta SANCHEZ-CASTRO, hemos empezado nuestras tesis al mismo tiempo pero te has reproducido mientras. Cuando veo el resultado me digo que has hecho MUY bien mientras todavía no hable Lia. Te deseo todo lo mejor por el fin de tu tesis y por tu vida familiar. Quedamos en contacto. Gracias también Matilde KARAKACHOFF, por tu alegría y tu entusiasmo. Ha sido un placer tomar el Mate contigo.

Merci à mes petits frères de thèse, Xavier DAUMY et Antoine RIMBERT que j'ai vu arriver à l'état d'œuf et que je vois aujourd'hui voler tous les jours dans les couloirs du laboratoire. Je trouve que nos interactions quotidiennes étaient très bénéfiques et lorsque vous avez pu me renvoyer la balle (pas la rouge), vous l'avez toujours fait. On reste en contact les mecs et j'espère être là le jour de votre thèse. Prenez soin de vous.

Merci à Céline MARIONNEAU et Sophie BUREL pour votre aide sur la partie « Biochimie » de ma thèse. Votre participation aux réunions *KCNAB2* a toujours été très constructive. Merci à Isabelle BARO, pour ton aide théorique et également dans l'analyse des données de patch sur le projet *KCNAB2*. J'ai apprécié travailler avec toi. Merci à Zeineb ES-SALAH LAMOUREUX pour ton enthousiasme sur le projet *KCNAB2*, pour ton aide dans la correction de l'article. C'était très appréciable de travailler avec toi.

Merci aux tésards du fonctionnel, Jérôme, Damien, Fabien, Benoît pour leurs critiques constructives et leurs explications dans l'utilisation de certains logiciels. J'ai appris beaucoup grâce à vous, je vous souhaite une belle fin de thèse et tout le meilleur pour la suite.

Merci à Aurore et Angélique pour leur aide dans la préparation des cellules pour le patch et la bioch (j'espère ne plus vous devoir un gâteau au moment de la soutenance).

Merci aux personnes ayant travaillé sur les souris du projet *CLASP2*, Stéphanie.L, les Agnès (C et H), ainsi qu'à tout le personnel de l'animalerie.

Merci à Patricia et Eva de la plateforme Cardiex, pour m'avoir permis d'utiliser leur étireuse de patch. J'ai rarement étiré de pipettes dans une ambiance aussi cordiale.

Merci aux responsables administratifs de l'institut qui font un travail de l'ombre absolument indispensable à notre activité, et qui plus est, toujours dans la bonne humeur. Je tiens donc à remercier Isabelle.R, Corinne Ophélie, Aurélie, Sylvie, Marie-Pierre, Anne, Raïssa et bien sûr Vimla.

Merci aux enseignants et directeurs de stage qui m'ont donné la passion de la recherche, merci à Chelo, Gilles.T, Céline.B, Agnès.A.

Merci à tous les autres que je n'ai pas cités qui participent à l'excellente ambiance dans le laboratoire, Françoise, Benjamin, Xavier, Virginie, David, Anne, Vincent.S, Gwenan, Giliane, Nathalie, Marco, Christophe, Christelle, Ludovic, Jean Mathieu, Damien.R, Lucille, Sandie, Dorian, Cynthia, Benoît C, Delphine B, Yassine A, Fauzi, Julie, Sandy, Julien B et tous les autres.

Merci à mon frère Guillaume et tous mes amis, compagnons de vie, Samir, Juanu, Dimitri, Hugo, Margaux, Romain, Yann, Pedro, Mario, Tex, et tous les autres.

Merci à mes grands parents, et aux amis des mes parents que je considère parfois comme ma deuxième famille, merci Michèle, Pierre et Sakina.

Merci Camille, pour ton aide dans la relecture et l'amélioration de la partie clinique de cette thèse. Merci pour ton soutien, tes encouragements et pour le bonheur que l'on partage.

Merci à mes parents qui ont toujours cru en moi et m'ont aidé à accomplir mes rêves à tout prix, malgré tous les pièges que j'avais tendus. Merci de m'avoir accueilli pour le début de la rédaction de cette thèse. Merci pour l'amour que vous nous donnez tous les jours à Guillaume et à moi.

A ma grand- mère

Table des matières

A. Introduction.....	1
I. Préambule de la physiologie cardiaque.....	1
II. La mort subite cardiaque	6
III. Description clinique du syndrome de Brugada	9
III.1. Epidémiologie	9
III.2. Description électrocardiographique	9
III.3. Test de provocation pharmacologique	12
III.4. Diagnostic positif	14
III.5. Propriétés structurales cardiaques	14
III.6. Stratification du risque et prise en charge des patients	15
III.7. Hypothèses électrophysiopathologiques du SBr	16
IV. Génétique du syndrome de Brugada.....	20
IV.1. Les gènes identifiés dans le syndrome de Brugada.....	20
IV.2. Implication des canaux sodiques dans le SBr	21
IV.3. Implication des canaux calciques dans le SBr	24
IV.4. Implication des canaux potassiques dans le SBr.....	26
IV.5. Concept des syndromes chevauchants	30
IV.6. Remise en question du modèle mendélien dans le SBr	33
IV.7. Applications des nouvelles technologies génétiques au syndrome de Brugada	38
V. Modèles d'étude de mutations génétiques dans le SBr.	42
VI. Objectifs de la thèse	44
B. Matériel et méthodes.....	45
I.1. Bio-collections utilisées.....	45
I.2. Capture et enrichissement des parties codantes du génome	45
I.3. Capture et enrichissement des parties codantes de gènes candidats	47
I.4. Séquençage haut débit - Illumina.....	48

I.5.	Traitement des données de séquençage	52
I.6.	Visualisation des alignements.....	53
I.7.	Séquençage capillaire	54
I.8.	Protocole de détection de réarrangements génomiques.....	54
I.9.	Génotypage haut débit	56
I.10.	Analyses de liaisons paramétriques et non paramétriques.....	56
I.11.	Enregistrement du courant I_{to} par la technique du patch clamp.....	61
I.12.	Etude de la fraction protéique membranaire	64
I.13.	Co-Immunoprécipitation dans les cellules COS-7	65
I.14.	Western-blot.....	65
C.	Résultats.....	67
I.	PROJET 1 : Développement d'un outil pour l'interprétation de données de séquençage haut débit (article 1)	67
II.	PROJET 2 : Approche gène candidat et séquençage haut débit.....	69
II.1.	Stratégie et méthodologie	69
II.2.	Résultats.....	72
II.3.	Discussion.....	74
III.	PROJET 3 : Approche génétique familiale du syndrome de Brugada	76
III.1.	Approche « interfamiliale »	76
III.2.	Approche intrafamiliale et méthodologie –Exome –IBD	78
III.3.	Identification du gène <i>KCNAB2</i>	80
III.4.	Identification du gène <i>CLASP2</i>	88
III.5.	Identification du gène <i>RRAD</i>	101
IV.	PROJET 4 : Etude d'association du syndrome de Brugada	110
D.	Discussion générale, discussion et perspectives	115
E.	ANNEXES.....	121
I.	Liste des gènes inclus dans le système de capture Haloplex	122
II.	Données complémentaires de l'article 3.....	127

III.	Identification de cas familiaux du syndrome de repolarisation précoce (article 4).....	128
F.	BIBLIOGRAPHIE.....	129

Table des figures

Figure 1 - Représentation des potentiels d'action en fonction des zones géographiques du cœur ...	2
Figure 2 - Représentation des courants impliqués dans le potentiel d'action ventriculaire cardiaque	3
Figure 3 - L'électrocardiogramme	4
Figure 4 – Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire	8
Figure 5 – représentation du positionnement des électrodes dans les dérivations précordiales avec projection du cœur.....	10
Figure 6 – Représentation des trois types d'ECG, types I, II et III observés dans le syndrome de Brugada	11
Figure 7 – Test à la flecaïnide démasquant un tracé ECG SBr de type 3 en type 1.....	13
Figure 8 – détection d'un Brugada type 1 en élevant les dérivations V1 et V2 au 3 ^{ème} espace intercostal après test pharmacologique.	13
Figure 9 – Prise en charge des patients Brugada	16
Figure 10 Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de C. Antzelevitch	17
Figure 11 - Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de A.A.M. Wilde.	18
Figure 12 - Cartographie latérale gauche patient SBr	19
Figure 13 - Représentation schématique du canal sodique Nav1.5 et ses protéines régulatrices. ...	22
Figure 14 - Schéma des sous-unités $\alpha 1c$, β et $\alpha 2\delta$ responsables du courant $I_{Ca,L}$	25
Figure 15 - A, schéma de la sous-unité α des canaux Kv4 à 6 segments transmembranaires B, Schéma de la structure tétramérique d'un canal Kv.....	27
Figure 16 – schéma représentatif des sous-unités régulatrices des canaux Kv4.....	28
Figure 17 - Représentation schématique des mutations du gène SCN5A et leurs localisations sur le canal Nav1.5.....	31
Figure 18 – Modélisation de la double conséquence de la mutation Nav1.5-1795insD.....	31
Figure 19 – Exemple de cas familial de SBr présentant une mutation p. Glu161lys sur le gène SCN5A	33
Figure 20 – Schéma récapitulatif de l'étude de Probst et coll, concernant le rôle des mutations SCN5A dans le syndrome de Brugada et les troubles de la conduction.	34
Figure 21 – Manhattan plot montrant l'association de SNPs avec l'intervalle QRS dans une GWAS de 40,407 individus.	36

Figure 22 – Localisation génomique des signaux publiés influant sur le fonctionnement électrique cardiaque.	37
Figure 23 - Méthode d'identification des variants en fonction de la fréquence de l'allèle à risque et de l'intensité de son effet (odds ratio).	39
Figure 24 – représentation du principe de capture des régions codantes avant séquençage haut débit.	47
Figure 25 – représentation des étapes du système de capture et enrichissement Haloplex	48
Figure 26 – réparation des brins d'ADN et ajout des adaptateurs « P5 » et « P7 » permettant le séquençage (préparation de la « librairie »)	49
Figure 27 – génération des clusters lors du séquençage Illumina	50
Figure 28 – réaction de séquençage de la technologie Illumina.	50
Figure 29 – Etape de « flip-flap » pour le séquençage des brins antisens par la technologie Illumina (paired-end)	51
Figure 30 – Exemple de visualisation d'un variant détecté en séquençage haut débit grâce à l'outil IGV	54
Figure 31 – principe de la détection de variations génomique par CGH-array	55
Figure 32 – Visualisation des haplotypes partagés entre individus atteints.....	58
Figure 33 – représentation de l'interface d'utilisation du programme IBD-frame	59
Figure 34 : Séquence de stimulation et courant Ito résultant.	62
Figure 35 - Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'inactivation.....	63
Figure 36 : Protocole de stimulation permettant l'estimation de la levée d'inactivation.....	64
Figure 37 – Représentation du % de bases couvertes par rapport à la couverture moyenne des 42 patients séquencés sur MiSeq	70
Figure 38 - Représentation du % de bases couvertes par rapport à la couverture moyenne des 172 patients séquencés sur HiSeq	71
Figure 39 – Différentes configurations d'enrichissement de variants rares.....	75
Figure 40 – Traitement des fichiers VCF par Knime4bio dans le cadre des analyses familiales du SBr	79
Figure 41 – Epissage alternatif du gène <i>KCNAB2</i> chez l'homme décrit dans les bases Ensembl et NCBI Genbank.....	82
Figure 42 – Identification du transcrit <i>KCNAB2</i> majoritaire cardiaque.....	83
Figure 43 – Etude des sites de phosphorylation de la protéine Kvβ2 identifiés dans le cerveau de rat.....	84

Figure 44 - comparaison entre la séquence de référence de la protéine $Kv\beta 2$ de rat (NP_05900) par rapport à la séquence humaine (NP_00362)	85
Figure 45 – prédiction de la modification de site de phosphorylation par NetPhos pour la mutation R12Q du gène <i>KCNAB2</i>	86
Figure 46 - prédiction de la modification de site de phosphorylation par NetPhos pour la mutation R99H du gène <i>KCNE3</i>	87
Figure 47 – Electrocardiogrammes de base, au 3ème espace intercostal et au cours d’un test à la flécaïnide A du premier propositus et B du deuxième propositus de la famille SBr3	89
Figure 48 - Identification des régions chromosomiques partagées entre individus atteints – famille SBr3.	91
Figure 49 – Représentation du codon du gène <i>CLASP2</i> dans lequel se trouve le variant R658Q..	92
Figure 50- résultat des prédictions d’effet du variant pR 658Q par les algorithmes SIFT et Polyphen2.....	92
Figure 51 – Représentation de l’association génotype / phénotype du variant <i>CLASP2</i> – R658Q dans la famille SBr3	93
Figure 52 – ECG de l’individu IV.4 dans les dérivations V1 et V2 après test à la flécaïnide.....	94
Figure 53 – Résultats du criblage des parties codantes du gène <i>CLASP2</i> par séquençage capillaire sur une cohorte de 190 individus.	95
Figure 54 – Identification du transcrit <i>CLASP2</i> RefSeq majoritaire cardiaque.....	96
Figure 55 – Effet dans les neurones d’une diminution de l’expression des protéines EB1 et EB3 sur la localisation des canaux sodiques voltage-dépendants.....	98
Figure 56 – Représentation de l’interaction de la protéine EB1 avec $Kv\beta 2$ WT ou mutée pour les sites de phosphorylation (S9, S20, S31).....	99
Figure 57 – Electrocardiogramme dans les dérivations précordiales droites du propositus (III.2) de la famille SBr9.	101
Figure 58 - Identification des régions chromosomiques partagées entre individus atteints – famille SBr9.	103
Figure 59 – Représentation des caractéristiques de conservation du variant RRAD – R211H retrouvé dans la famille SBr9.....	104
Figure 60 – Représentation de la ségrégation du variant RRAD-R211H –famille SBr9.....	104
Figure 61 – Représentation des caractéristiques de conservation du variant RRAD – Q186R retrouvé chez un cas sporadique de SBr par criblage du gène.....	105
Figure 62 – Effet du variant RRAD-S105N après transduction par adenovirus sur des cardiomyocytes de cobaye.	106

Figure 63 – caractéristiques electrocardiographiques de la souris RRAD-S105N	107
Figure 64 – prédiction par NetPhos des sites de phosphorylation spécifiques des protéines kinases dans la région de la protéine RRAD contenant le variant R211H	109
Figure 65 – Représentation de l'interaction des gènes identifiés dans le SBr	117
Figure 66 – association d'un loci incluant le gène <i>KCNAB2</i> en liaison avec l'allongement de l'intervalle QT.....	119

Liste des tableaux

Tableau 1 – Gènes identifiés dans les principales arythmies cardiaques primaires.....	7
Tableau 2 – Paramètres des différents types de tracés ECG du SBr.....	11
Tableau 3 - Spectre et prévalence des gènes de susceptibilité du syndrome de Brugada.....	21
Tableau 4 - Troubles du rythme et anomalies structurales associés à des mutations du gène SCN5A.....	32
Tableau 5 - haute prévalence dans une population contrôlée de variants identifiés dans le syndrome de Brugada.....	35
Tableau 6 - Tableau récapitulatif du pourcentage de couverture en fonction de la profondeur de lecture par séquençage MiSeq (42 patients) et séquençage HiSeq (167 patients atteints du SBr) .	71
Tableau 7 - Liste des variants retrouvés dans les gènes de susceptibilité au SBr retrouvés chez 167 patients atteints du SBr	73
Tableau 8 - Pourcentage de variants RARES (<1%) et privés (NOVEL) dans les gènes associés au SBr, dans une cohorte SBr et une cohorte de BAV dégénératifs par rapport à la population générale	74
Tableau 9 - Représentation des filtres successifs réalisés dans le cadre de l'approche «interfamiliale»	77

Liste des abréviations

BAV	Bloc auriculo-ventriculaire
bpm	Battements par minute
CaM	Calmoduline
CaMKII	Calmoduline kinase II
CCVD	Chambre de chasse du ventricule droit
Cellules iPS	Cellules souches pluripotentes induites
CGH	Comparative genomic hybridization (Hybridation génomique comparative)
cM	centiMorgan
CMD	Cardiomyopathie dilatée
CNV	Copy Number Variation (Variation de nombre de copies)
DAVD	Dysplasie arythmogène du ventricule droit
DAVD	Dysplasie arythmogène du ventricule droit
ECG	Electrocardiogramme
ECG	Electrocardiogramme
ECR	Evolutionary conserved regions (Régions conservées avec l'évolution)
FA	Fibrillation auriculaire
FV	Fibrillation ventriculaire
GPD1L	Glycérol-3-Phosphate Pésyhydrogénase 1 Like
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
IBD	Identity by descent - Identité par descendance
kb	kilobases
KChIP	Kv channel interacting protein
Mb	Mégabases
MSEndo	Myocarde sous endocardique
MSEpi	Myocarde sous épocardique
PA	Potentiel d'action
pb	Paires de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SBr	Syndrome de Brugada
SNP	Single nucleotide polymorphism (Polymorphisme d'un nucléotide unique)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme d'un nucléotide unique)
SQTC	Syndrome du QT court
SQTL	Syndrome du QT long
TV	Tachycardie ventriculaire
TVC	Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique
UTR	Untranslated region (Région non traduite)
VD	Ventricule droit
WT	Wild Type (Type sauvage)

Liste des publications

- Portero V*, Le Scouarnec S*, Es-Salah-Lamoureux Z*, Burel S, Gourraud JB, Bonnaud S, Lindenbaum P, Simonet F, Violleau J, Sandoval JE, Scott C, Chatel S, Loussouarn G, O'Hara T, Mabo P, Dina C, Le Marec H, Carter N, Schott JJ, Probst V, Baró I, Marionneau C, Charpentier F#, Redon R#. (2013). A gain-of-function mutation in the voltage-gated K⁺ channel beta-2 subunit is associated with Brugada syndrome. (en finalisation d'écriture)
- Bezzina CR*, Barc J*, Mizusawa Y*, Remme CA*, Gourraud JB*, Simonet F, Verkerk AO, Schwartz PJ, Crotti L, Dagradi F, Guicheney P, Fressart V, Leenhardt A, Antzelevitch C, Bartkowiak S, Schulze-Bahr E, Zumhagen S, Behr ER, Bastiaenen R, Tfelt-Hansen J, Olesen MS, Käb S, Beckmann BM, Weeke P, Watanabe H, Endo N, Minamino T, Horie M, Ohno S, Hasegawa K, Makita N, Nogami A, Shimizu W, Aiba T, Froguel P, Balkau B, Lantieri O, Torchio M, Wiese C, Weber D, Wolswinkel R, Coronel R, Boukens BJ, Béziau S, Charpentier E, Chatel S, Despres A, Gros F, Kyndt F, Lecointe S, Lindenbaum P, Portero V, Violleau J, Gessler M, Tan HL, Roden DM, Christoffels VM, Le Marec H, Wilde AA#, Probst V#, Schott JJ#, Dina C#, Redon R#. (2013). Common variants at *SCN5A-SCN10A* and *HEY2* are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat Genet.* 2013 Aug 28;45(9):1044-9.
- Gourraud JB, Le Scouarnec S, Sacher F, Chatel S, Derval N, Portero V, Chavernac P, Sandoval JE, Mabo P, Redon R, Schott JJ, Le Marec H, Haïssaguerre M, Probst V. (2013) Identification of large families in early repolarization syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Jan 15;61(2):164-72.
- Lindenbaum P, Le Scouarnec S, Portero V, Redon R. (2011) Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinformatics.* Nov 15;27(22):3

A. Introduction

I. Préambule de la physiologie cardiaque

➤ *Naissance et conduction du potentiel d'action dans le cœur*

La fonction hémodynamique du cœur, nécessaire au transport de l'oxygène et des nutriments vers les différents organes, est assurée par une contraction séquentielle et répétée du cœur qui propulse le sang dans l'ensemble de l'organisme. Cette contraction résulte de la propagation d'un influx électrique constitué à l'échelle des cellules contractiles cardiaques par un potentiel d'action permettant l'augmentation de concentration du calcium cytosolique et l'activation des myofibrilles cellulaires.

Des zones spécifiques du cœur, constituées de cellules spécialisées permettent la genèse et la conduction du potentiel d'action (PA) selon une séquence d'activation précise. Ces zones sont constituées de cellules automatiques capables de générer des PA de manière spontanée.

Le nœud sinusal est à l'origine des PA cardiaques. Au travers de la paroi atriale ce PA rejoint le nœud atrio-ventriculaire (NAV), situé entre les oreillettes et les ventricules qui permet la transmission des PA vers les ventricules. La conduction au sein des ventricules se fait par le faisceau de His, dont le tronc commun se divise au niveau du septum interventriculaire, en deux branches, droite et gauche, puis en un large réseau de fibres, dites de Purkinje, au sein des parois ventriculaires permettant la transmission de l'influx électrique aux cardiomyocytes .

La dépolarisation créée lors du PA des cellules du nœud sinusal est diffusée au sein des oreillettes jusqu'au NAV où la vitesse de conduction est alors ralentie. Cette particularité du NAV permet aux oreillettes de se contracter avant les ventricules et d'éjecter le sang qu'elles contiennent dans les ventricules pendant la relaxation de ceux-ci. La propagation rapide du PA au sein des ventricules permet alors leur contraction synchrone aboutissant à l'éjection du sang vers la circulation systémique (ventricule gauche) et la circulation pulmonaire (ventricule droit).

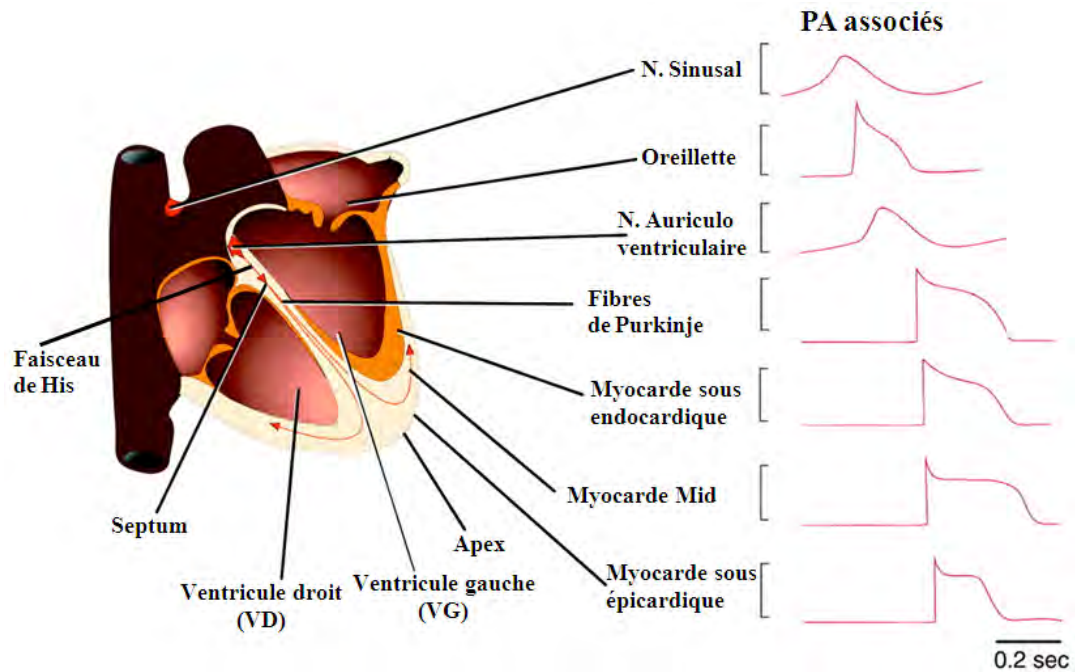


Figure 1 - Représentation des potentiels d'action en fonction des zones géographiques du cœur
(Modifié selon Nerbonne and Kass, 2005)

La fréquence à laquelle se succèdent les contractions cardiaques succédant aux PA (fréquence cardiaque) est imposée par la fréquence de dépolarisation des cellules du nœud sinusal, régulée par le système nerveux autonome. Sans cette régulation, la fréquence intrinsèque de dépolarisation serait d'environ 100 battements/min mais à l'état basal, le tonus parasympathique dominant le tonus sympathique, la fréquence cardiaque est comprise entre 60 et 90/min chez l'homme.

En cas de trouble de la genèse ou de la conduction de l'influx électrique, les cellules spécialisées du tissu électrique, en aval de la dysfonction, vont se dépolariser spontanément mais à une fréquence inférieure à celle du nœud sinusal.

Les cellules du NAV génèrent un PA spontané à une fréquence inférieure (environ 50/min) à celle des cellules du nœud sinusal, et sont à l'état physiologique dépolarisées par l'influx provenant du nœud sinusal avant leur dépolarisation spontanée. En cas de dysfonction sinusale, la fréquence cardiaque, alors dictée par les dépolarisations du NAV, sera alors diminuée (bradycardie).

De la même manière, lors d'un bloc de conduction atrio-ventriculaire complet (dissociant l'activité électrique entre les oreillettes et les ventricules), la fréquence au niveau des oreillettes

sera imposée par le nœud sinusal tandis que la fréquence au niveau des ventricules sera imposée par les cellules conductrices ventriculaires (environ 30/min).

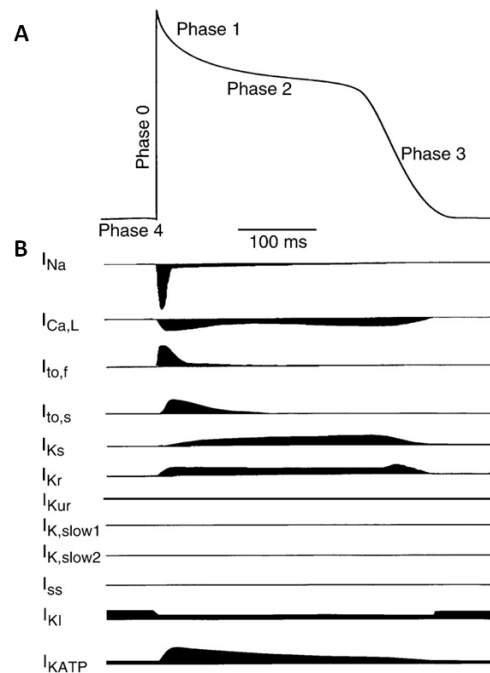


Figure 2 - Représentation des courants impliqués dans le potentiel d'action ventriculaire cardiaque

A- Représentation d'un tracé de PA ventriculaire humain. B – Courants impliqués dans le PA cardiaque (Modifié selon Nerbonne and Kass, 2005)

➤ *L'électrocardiogramme (ECG)*

L'électrocardiogramme ou ECG enregistre en fonction du temps, la sommation spatiale de l'activité électrique générée par la propagation des potentiels d'action cellulaires dans les différents compartiments cardiaques. Cet enregistrement est réalisé par différentes électrodes placées sur le thorax et définissant deux plans perpendiculaires de projection de cette activité électrique. Son caractère non invasif en fait un outil diagnostique très couramment utilisé pour détecter des anomalies cardiaques.

L'ECG est enregistré en disposant des électrodes à différents endroits du corps : 3 au niveau des membres permettant une visualisation de l'activité électrique dans un plan frontal et 6 précordiales permettant une visualisation dans un plan transversal. Cette disposition permet d'enregistrer l'activité électrique du cœur selon ses trois axes principaux : apico-basal, gauche-droite et ventral-dorsal. Douze dérivations sont alors enregistrées entre les différentes électrodes : les dérivations I, II, III (bipolaires) et aVR, aVL et aVF (unipolaires) sont enregistrées par les 4

électrodes des membres, la jambe servant de référence. Les dérivations V1 à V6 sont enregistrées par les électrodes précordiales.

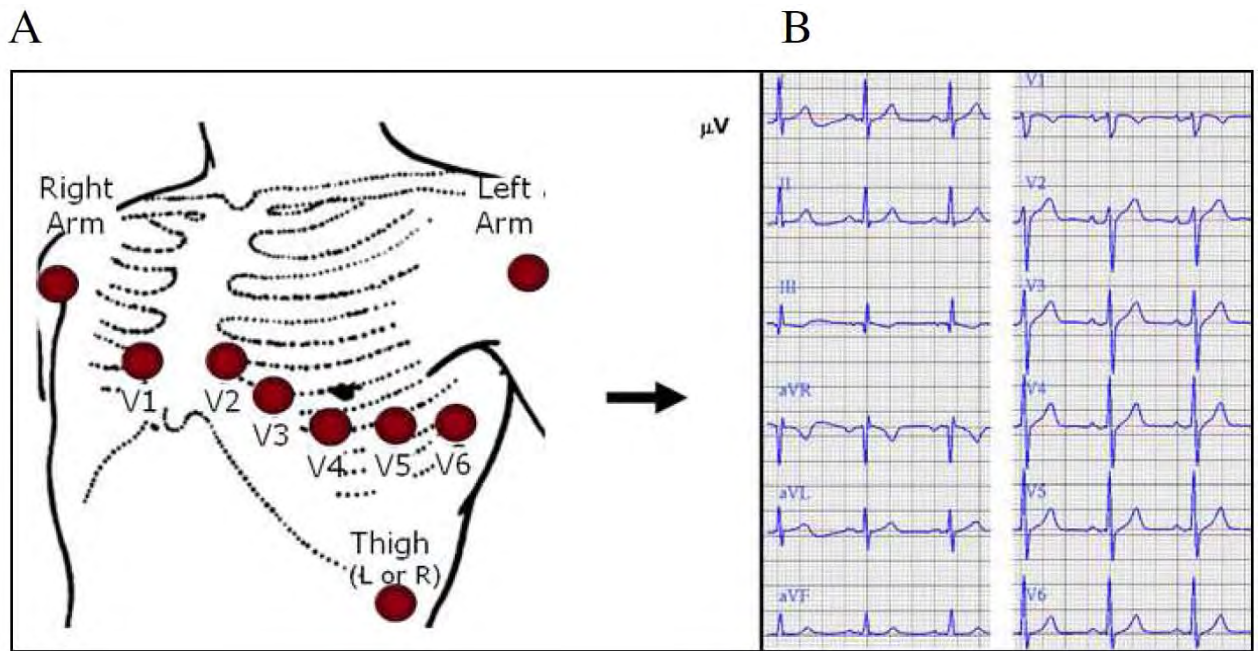


Figure 3 - L'électrocardiogramme

A- placement des 12 dérives standards de l'ECG B- Tracé ECG normal enregistré dans les 12 dérives.

Au niveau de l'ECG, le cycle cardiaque se traduit par l'apparition successive des ondes P, Q, R, S, T, et U, positives ou négatives selon les dérives observées :

- L'onde P : correspond à la dépolarisation des oreillettes.
- Le complexe QRS : reflète la dépolarisation des ventricules associée à la repolarisation des oreillettes.
- L'onde T : traduit la repolarisation des ventricules.
- L'onde U : parfois observée après l'onde T et de faible amplitude. Sa signification est discutée mais l'hypothèse la plus probable lorsqu'elle est physiologique est une repolarisation tardive du réseau de Purkinje.

Chez l'homme, la fréquence cardiaque (FC) normale est comprise entre 60 et 90 battements par minute (bpm) au repos. Le rythme est sinusal, c'est à dire que chaque complexe QRS est précédé d'une onde P positive sur les dérives I et II, caractérisant le bon fonctionnement du nœud sinusal. La durée de l'onde P doit être inférieure à 0.12 seconde (temps de dépolarisation des

oreillettes). L'intervalle PR est compris entre 0.12 et 0.2 seconde. Le complexe QRS est normalement compris entre 0,06 et 0,1 seconde. La valeur normale de l'intervalle QT dépend de la fréquence cardiaque. Il est donc nécessaire de corriger cet intervalle en fonction de la fréquence, définissant l'intervalle QT corrigé ($QT_c = QT/\sqrt{RR}$, en secondes, d'après la formule de Bazett). Celui-ci est compris entre 0.44 et 0.36 seconde.

II. La mort subite cardiaque

La mort subite représente un problème de santé publique majeur. Son incidence dans les pays développés est comprise entre 0.36 et 1.28/1000 habitants par an dans la population générale, suggérant que la mort subite de l'adulte concernerait 40.000 décès annuellement en France et environ 250 000 à 400 000 aux Etats-Unis, soit 8 fois plus que les accidents de la route. (Zheng et al., 2001; Jouven and Escande, 2006; Goldberger et al., 2008). Cette incidence augmente avec l'âge et est plus importante chez les patients de sexe masculin. L'âge moyen de survenue est de 67 ans.

A côté des formes fréquentes de morts subites sur cardiopathie le plus souvent ischémique, touchant plutôt des sujets âgés, il existe également des formes de morts subites touchant les sujets jeunes. Ces cas de morts subites sont majoritairement des formes héréditaires et génétiques (Myerburg and Junttila, 2012).

Certaines comportent des anomalies morphologiques aisément identifiables (cardiopathie hypertrophique, cardiopathie dilatée, dysplasie arythmogène du ventricule droit), d'autres correspondent à des pathologies purement rythmiques (syndrome de Brugada, du QT long, du QT court ou tachycardies ventriculaires catécholergiques) pour lesquelles l'autopsie ne retrouve aucune anomalie.

Cette dernière catégorie représenterait 10 % de l'ensemble de morts subites avec une proportion dépassant 30% chez les sujets jeunes sans antécédents connus (Ellsworth and Ackerman, 2005).

Les symptômes, l'histoire familiale de mort subite et l'ECG éventuel permettent aux cliniciens de s'orienter vers l'une ou l'autre des étiologies de ces troubles du rythme primaire. Les principaux gènes identifiés dans les troubles du rythme cardiaque primaires présentant une composante héréditaire sont décrits dans le tableau 1.

Cependant, les informations cliniques recueillies sont la plupart du temps insuffisantes. L'étude des **troubles du rythme cardiaque primaires**, a montré que ces pathologies présentaient pour la plupart un déterminisme génétique. L'étude de ces bases génétiques dans ces syndromes a permis l'identification de causes potentielles de ces événements de mort subite ainsi que la compréhension des mécanismes physiopathologiques (Tester and Ackerman, 2007; George, 2013).

Phenotype	Gene	Protein	Effect of mutation	OMIM identifier
LQTS	<i>KCNQ1</i> (11p15.5)	K ⁺ voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (Kv7.1)	Loss of function, reduced I_{KS}	607542
	<i>KCNH2</i> (7q35)	K ⁺ voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2 (Kv11.1; HERG)	Loss of function, reduced I_{Kr}	152427
	<i>SCN5A</i> (3p21)	Na ⁺ channel, voltage-gated, type V, α subunit (Na _v 1.5)	Impaired inactivation, increased persistent I_{Na}	600163
	<i>ANK2</i> (4q25)	Ankyrin 2, neuronal	Aberrant localization of ion transporters	106410
	<i>KCNE1</i> (21q22.1)	K ⁺ voltage-gated channel auxiliary subunit	Reduced I_{KS}	176261
	<i>KCNE2</i> (21q22.1)	K ⁺ voltage-gated channel auxiliary subunit	Reduced I_{Kr}	603796
	<i>CAV3</i> (3p25)	Caveolin 3	Increased persistent I_{Na}	601253
	<i>SCN4B</i> (11q23)	Na ⁺ channel, voltage-gated, type IV, β subunit	Increased persistent I_{Na}	608256
	<i>SNTA1</i> (20q11.2)	Syntrophin, α 1	Increased persistent I_{Na}	601017
	<i>AKAP9</i> (7q21)	A kinase (PRKA) anchor protein (<i>yotiao</i>) 9	Reduced I_{KS}	604001
	<i>KCNJ5</i> (11q24)	K ⁺ inwardly rectifying channel, subfamily J, member 5 (Kir3.4)	Reduced $I_{K,ACH}$	600734
	<i>KCNQ1</i> (11p15.5)	K ⁺ voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (Kv7.1)	Loss of function, reduced I_{KS}	607542
	<i>KCNE1</i> (21q22.1)	K ⁺ voltage-gated channel auxiliary subunit	Reduced I_{KS}	176261
Andersen syndrome	<i>KCNJ2</i> (17q23.1)	K ⁺ inwardly rectifying channel, subfamily J, member 2 (Kir2.1)	Loss of function, reduced I_{K1}	600681
Timothy syndrome	<i>CACNA1C</i> (12p13.3)	Ca ²⁺ channel, voltage-dependent, L type, α 1C subunit (Ca _v 1.2)	Gain of function, increased I_{Ca}	114205
SQTS	<i>KCNQ1</i> (11p15.5)	K ⁺ voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (Kv7.1)	Gain of function, increased I_{KS}	607542
	<i>KCNH2</i> (7q35)	K ⁺ voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2 (Kv11.1; HERG)	Gain of function, increased I_{Kr}	152427
	<i>KCNJ2</i> (17q23.1)	K ⁺ inwardly rectifying channel, subfamily J, member 2 (Kir2.1)	Gain of function, increased I_{K1}	600681
	<i>CACNA1C</i> (12p13.3)	voltage-gated Ca ²⁺ channel, Ca _v 1.2	Loss of function, reduced I_{Ca}	114205
	<i>CACNB2</i> (10p12)	Ca ²⁺ channel, voltage-dependent, β 2 subunit	Loss of function, reduced I_{Ca}	600003
	<i>CACNA2D1</i> (7q21)	Ca ²⁺ channel, voltage-dependent, α 2/8 subunit 1	Loss of function, reduced I_{Ca}	114204
BrS	<i>SCN5A</i> (3p21)	Na ⁺ channel, voltage-gated, type V, α subunit (Na _v 1.5)	Loss of function, reduced I_{Na}	600163
	<i>GPD1L</i> (3q22.3)	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like	Reduced I_{Na}	611778
	<i>SCN1B</i> (19q13.1)	Na ⁺ channel, voltage-gated, type I, β subunit	Reduced I_{Na}	600235
	<i>SCN3B</i> (11q23.3)	Na ⁺ channel, voltage-gated, type III, β subunit	Reduced I_{Na}	608214
	<i>MOG1</i> (17p13.1)	RAN guanine nucleotide release factor	Reduced I_{Na}	607954
	<i>KCND3</i> (1p13.3)	K ⁺ voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3 (Kv4.3)	Gain of function, increased I_{to}	605411
	<i>KCNE3</i> (11q13)	K ⁺ voltage-gated channel auxiliary subunit	Increased I_{to}	604433
	<i>KCNE5</i> (Xq22.3)	K ⁺ voltage-gated channel auxiliary subunit	Increased I_{to}	300328
	<i>CACNA1C</i> (12p13.3)	Ca ²⁺ channel, voltage-dependent, L type, α 1C subunit (Ca _v 1.2)	Loss of function, reduced I_{Ca}	114205
	<i>CACNB2</i> (10p12)	Ca ²⁺ channel, voltage-dependent, β 2 subunit	Loss of function, reduced I_{Ca}	60003
	<i>KCNJ8</i> (12p12.1)	K ⁺ inwardly rectifying channel, subfamily J, member 8 (Kir6.1)	Gain of function, increased $I_{K,ATP}$	600935
	<i>RYR2</i> (1q42.1)	Ryanodine receptor 2 cardiac	Gain of function, increased SR Ca ²⁺ release	180902
CPVT	<i>CASQ2</i> (1p13.3)	Calsequestrin 2 cardiac muscle	Loss of function, reduced I_{Ca}	114251
	<i>TRDN</i> (6q22)	Triadin	Impaired regulation of SR Ca ²⁺ release	603283

Tableau 1 – Gènes identifiés dans les principales arythmies cardiaques primaires

LQTS : syndrome du QT long ; SQTS : syndrome du QT court ; BrS : Syndrome de Brugada ; CPVT : tachycardie catécholaminergique polymorphique ventriculaire (George, 2013).

L'arrêt cardiaque est dans la majorité des cas la conséquence d'une arythmie par trouble du rythme ventriculaire. Parmi ces troubles du rythme ventriculaire, on compte :

- la tachycardie ventriculaire monomorphe ou polymorphe correspondant à une activation électrique rapide organisée dans les ventricules, entraînant une baisse du débit cardiaque. Son évolution peut se faire vers la constitution d'une fibrillation ventriculaire.
- les torsades de pointes, dont le mécanisme diffère par une irrégularité de réactivation des ventricules, pouvant également évoluer secondairement vers une fibrillation ventriculaire
- la fibrillation ventriculaire, caractérisée par des contractions anarchiques, non synchrones, des fibres myocardiques ventriculaires incapables d'assurer une éjection ventriculaire efficace.

Le second mécanisme de l'arrêt cardiaque comprend **la bradycardie extrême et l'asystolie** (fréquence cardiaque < 20/min) et traduit une souffrance myocardique importante en rapport avec la maladie sous-jacente ou avec un arrêt cardio-circulatoire prolongé (Figure 4).

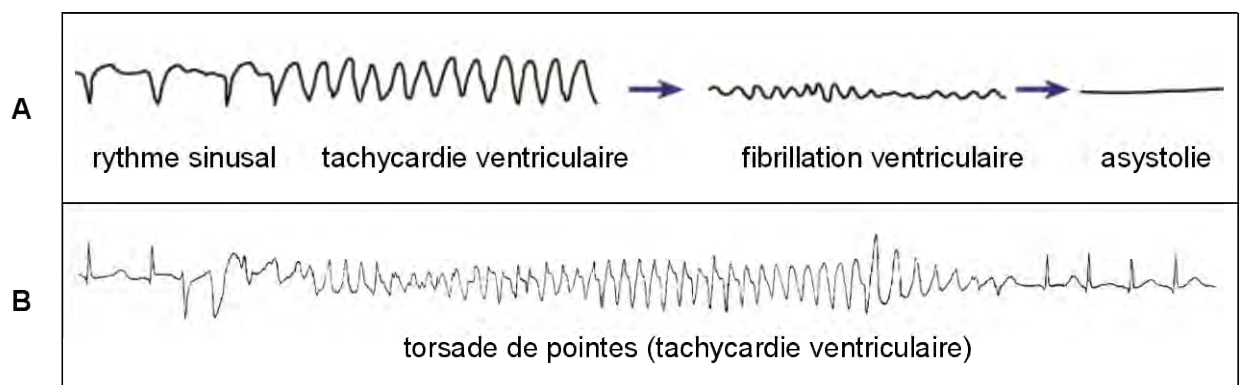


Figure 4 – Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire

A : La tachycardie ventriculaire (TV monomorphe ou polymorphe, complexes QRS larges, fréquence cardiaque rapide) peut dégénérer en fibrillation ventriculaire (FV, perte de toute activité électrique organisée des ventricules) et causer la mort par asystolie. (modifié d'après Huikuri et al., 2001). **B :** Les torsades de pointes (TdPs). Ce sont des TV polymorphes caractérisées par une oscillation des pointes de QRS autour de l'axe isoélectrique. Elles sont liées à un phénomène de ré-entrée ventriculaire (désynchronisation des périodes réfractaires des cellules myocardiques), causée par une bradycardie importante ou un allongement de l'intervalle QT comme dans cet exemple chez un garçon de 15 ans

III. Description clinique du syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada (SBr), identifié comme entité clinique en 1992 par P et J Brugada, est caractérisé par l'association d'une anomalie électrocardiographique typique, malgré un cœur apparemment sain, avec un risque de mort subite cardiaque par trouble du rythme ventriculaire. (Brugada and Brugada, 1992).

III.1. Epidémiologie

Si sa description clinique n'est établie que depuis 1992, le SBr est connu depuis près d'un siècle en Asie du Sud-Est où l'incidence élevée de morts subites nocturnes des jeunes hommes avait été remarquée sans toutefois établir de description clinique ou électrocardiographique propre définissant le syndrome. Aux Philippines, il est décrit sous le nom de Bangungut, signifiant « le cri suivi de la mort brutale pendant le sommeil », au Japon sous le nom de Pokkuri « Mort subite nocturne », en Thaïlande sous le nom de Lai tai « Mort pendant le sommeil ».

La prévalence du SBr est estimée à 1 à 5 cas pour 10 000 en Europe soit 0,05% de la population générale mais serait supérieure dans ces pays d'Asie. Du fait de la grande labilité de l'aspect électrocardiographique, elle varie selon les études et peut aller jusqu'à 0,12% (Gallagher et al., 2008).

Ce syndrome est la première cause de mort subite cardiaque chez les sujets jeunes sans cardiopathie sous jacente ce qui représente environ 1600 décès par an en France (Antzelevitch *et al.* 2005). L'âge moyen d'apparition des premiers symptômes est en moyenne de 40 ans avec une distribution très hétérogène qui concerne préférentiellement les hommes : 72 à 80% des cas selon les études (Eckardt 2007; Benito *et al.* 2008).

III.2. Description électrocardiographique

Trois types d'anomalies électrocardiographiques, de gravité décroissante, sont classiquement décrits. Ces trois types peuvent être rencontrés chez une même personne du fait de la labilité du phénotype électrocardiographique.

Le SBr de type I se définit par un sus-décalage du segment ST d'au moins 0,2 mV, convexe vers le haut, se prolongeant par une onde T négative. Cet aspect est retrouvé dans les dérivations précordiales droites (V1 ; V2 ; V3) en position dites basse (4° espace inter-costal) ou haute (3° ou 2° espace inter-costal). Les différentes alternatives de positionnement des électrodes des dérivations précordiales droites sont décrites dans la Figure 5.

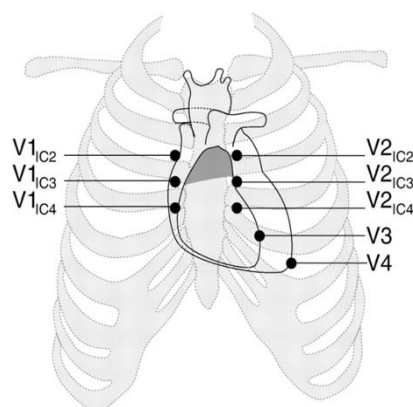


Figure 5 – représentation du positionnement des électrodes dans les dérivations précordiales avec projection du cœur

En gris foncé est représentée la chambre de chasse du ventricule droit
(modifié selon Meregalli et al., 2005a)

Le tracé SBr de type II se caractérise par un segment ST en selle, concave vers le bas, et surélevé d'au moins 0,2 mV mais pouvant décroître dans le temps à 0,1 mV. Le SBr de type III présente un segment ST convexe ou en selle sus-décalé de plus de 0,2 mV au point J puis de moins de 0,1 mV (Figure 6). Dans ces deux derniers types l'onde T est positive. Les mesures associées à ces différents sous type de SBr sont récapitulés dans le Tableau 2.

Le diagnostic de syndrome de Brugada nécessite la présence d'un aspect électrocardiographique de type 1, de manière soit spontanée, soit révélé par l'utilisation d'agents bloqueurs des canaux sodiques (anti-arythmiques de classe I de Vaughan et Williams). Un bloc de branche droit incomplet peut y être associé, mais n'est pas requis pour le diagnostic. Les aspects électrocardiographiques de type 2 et 3 sont considérés comme suggestifs mais ne confirment pas le diagnostic.

La deuxième conférence de consensus, retenant le diagnostic après la mise en évidence d'un aspect de type 1 dans au moins deux des dérivations précordiales contiguës, a récemment été remise à jour autorisant ce diagnostic en n'utilisant qu'une seule de ces dérivations (Priori et al., 2013).

Le risque d'événement rythmique semblerait similaire lorsque l'aspect électrocardiographique est présent dans une ou deux dérivations précordiales droites. (Richter et al., 2010).

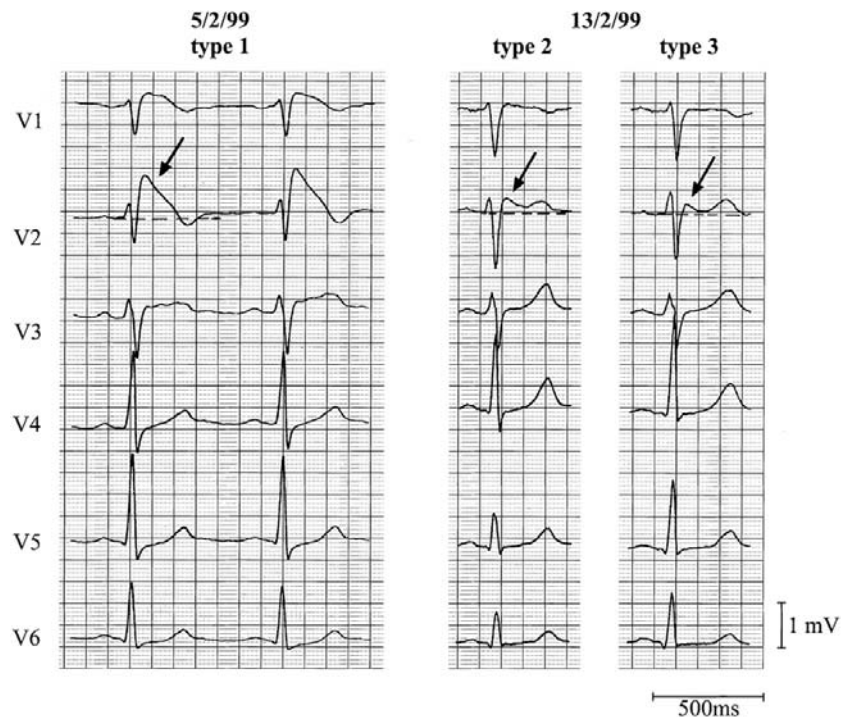


Figure 6 – Représentation des trois types d'ECG, types I, II et III observés dans le syndrome de Brugada

ECG des dérivations précordiales d'un patient SBr ayant survécu à une mort subite cardiaque. Le profil est variable dans le temps et montre les 3 types de SBr. Les flèches pointent le point J. D'après (Wilde et al. 2002)

	Type 1	Type 2	Type 3
Point J	≥ 2 mm	≥ 2 mm	≥ 2 mm
Onde T	Négative	Positive ou biphasique	Positive
Aspect ST-T	Convexe	En selle	En selle ou convexe
segment ST (portion terminale;	Décroissance progressive	≥ 1 mm	< 1 mm

Tableau 2 – Paramètres des différents types de tracés ECG du SBr

Modifié d'après Antzelevitch et al. 2005

De nombreux facteurs confondants peuvent causer une élévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites mimant un SBr et doivent être préalablement éliminés. Ces facteurs sont principalement les troubles hydro-électrolytiques comme l'hyperkaliémie ou l'hypercalcémie, la prise de traitements psychotropes ou anti-arythmiques et certains anesthésiques.

La fièvre module également le phénotype et le risque d'arythmie chez les patients atteints de SBr en provoquant l'accentuation de l'inactivation du canal Na^+ , et donc la majoration de l'aspect électrocardiographique augmentant le risque de déclenchement d'arythmies ventriculaires (Kumar et al., 2013).

L'existence de ces facteurs confondants ainsi que la labilité des anomalies ECG rendent le diagnostic de cette pathologie souvent difficile (Antzelevitch *et al.* 2005).

III.3. Test de provocation pharmacologique

Pour faciliter le diagnostic, des outils pharmacologiques, comme les bloqueurs de canaux sodiques, permettent de démasquer l'aspect de type I chez des individus ne présentant aucun des signes électrocardiographiques décrits ci-dessus ou chez un individu montrant un SBr de type II ou III (Figure 7). Ces bloqueurs font partie des antiarythmiques de classe Ic.

Administrées en perfusion continue sur 10 min, l'ajmaline (1 mg/kg) ou la flécaïnide (2 mg/kg) permettent de « démasquer » l'aspect électrocardiographique chez des individus à risque de trouble du rythme ventriculaire (Brugada *et al.* 2000; Wolpert *et al.* 2005a). Chacune de ces molécules possède des limites : la flécaïnide serait moins efficace et produirait des faux négatifs (Wolpert *et al.* 2005a), alors que l'ajmaline entraînerait des faux positifs (Hong *et al.* 2004).

Il est important de noter que ces notions de faux positifs et faux négatifs provoqués par les tests pharmacologiques proviennent d'études familiales dans lesquelles une mutation causale potentielle avait été identifiée. Dans ces études, la pénétrance (nombre d'individus présentant le phénotype / nombre d'individus porteurs de la mutation) passerait d'environ 32% à 79% grâce à l'utilisation des tests pharmacologiques (Hong *et al.* 2004). Cependant, il est aujourd'hui difficile de statuer de manière définitive sur ces notions d'efficacité des tests pharmacologiques du fait de l'absence de certitude vis à vis des mutations identifiées et donc de gold standard pour comparer les tests.

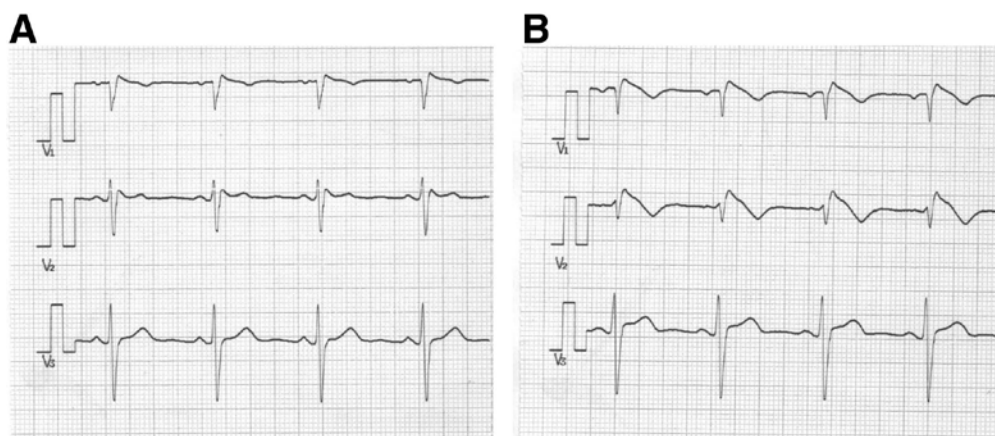


Figure 7 – Test à la flecaïnide démasquant un tracé ECG SBr de type 3 en type 1.

A- ECG basal dans les dérivation précardiales droites. B – Après perfusion de 2mg/kg de flecaïnide, un ECG SBr de type 1 est observé dans les dérivation V1-V2 (Berne and Brugada, 2012).

Au cours du test pharmacologique, les électrodes précardiales doivent être placées au troisième ou au deuxième espace intercostal, pour augmenter la sensibilité de détection d'un tracé Brugada (Berne and Brugada, 2012 - Figure 8).

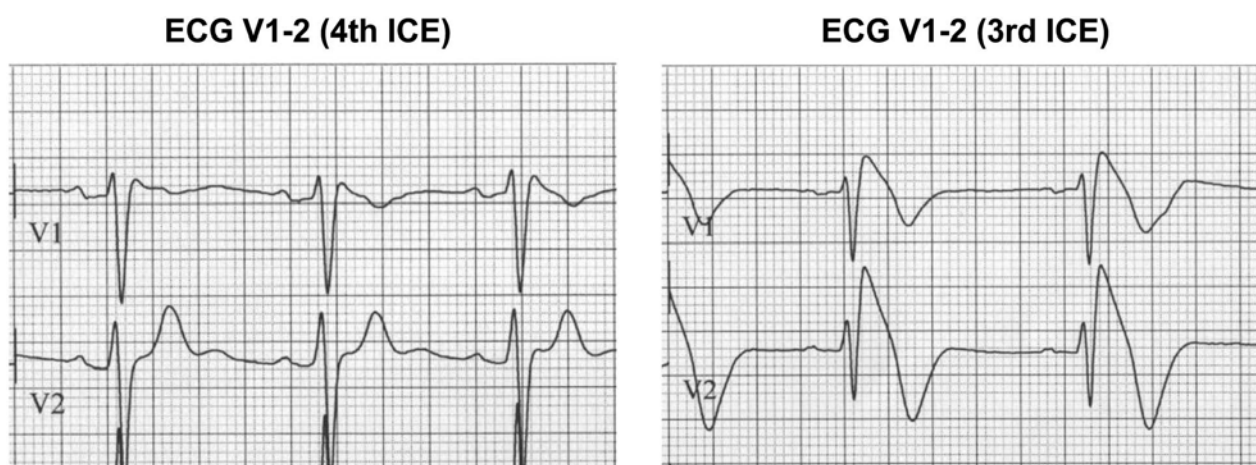


Figure 8 – détection d'un Brugada type 1 en élevant les dérivation V1 et V2 au 3^{ème} espace intercostal après test pharmacologique.

(Berne and Brugada, 2012)

III.4. Diagnostic positif

Le diagnostic positif repose donc sur l'existence d'un ECG de type 1, après avoir éliminé les facteurs confondants, associé à la présence d'au moins un des critères cliniques suivants :

- Histoire familiale : mort subite avant 45 ans, ECG de type 1 chez un des membres de la famille.
- Symptômes en faveur d'une arythmie ventriculaire : syncopes, arrêt cardio-respiratoire récupéré, respiration nocturne stertoreuse.
- Arythmies ventriculaires documentées : TV polymorphes, FV. Ces troubles du rythme ventriculaire se déclenchant au repos, pendant le sommeil ou lors d'une stimulation vagale.

III.5. Propriétés structurales cardiaques

Pour affirmer le diagnostic du SBr, une échocardiographie cardiaque doit être systématiquement réalisée, pour confirmer l'absence d'anomalie structurale apparente du cœur. Certains centres pratiquent des biopsies ventriculaires afin de s'assurer du caractère non fibrosé du tissu et d'établir un diagnostic différentiel avec la dysplasie arythmogène du ventricule droit (Frustaci et al., 2005). Dans cette étude réalisée sur 18 patients atteints du SBr symptomatiques, les auteurs mettent en évidence la présence de changements structuraux non détectables à l'échocardiographie. Les auteurs ont identifié chez ces patients, des remodelages du tissu cardiaque liées à des événements infectieux, ou à une infiltration de tissu graisseux. Ces anomalies sont détectées spécifiquement dans le ventricule droit. Les auteurs montrent également que ces variations structurelles sont indépendantes de la présence d'une mutation sur le gène *SCN5A* (seulement 4 patients sur les 18 présentaient une mutation pour ce gène).

Une étude récente réalisée sur 30 patients (26 hommes et 4 femmes) a mis en évidence par la technique d'imagerie par résonnance magnétique la présence de différences structurelles chez certains patients atteints du SBr. La principale différence anatomique observée dans cette étude est un élargissement de la chambre de remplissage du ventricule droit ou chambre atriale (Catalano et al., 2009). Une autre étude a également montré des variations de dimension de la chambre de chasse du ventricule (CCVD) droit chez des patients atteints du SBr, suggérant un substrat anatomique chez ces patients (Papavassiliu et al., 2004).

III.6. Stratification du risque et prise en charge des patients

La stratification du risque a pour but d'identifier les patients à risques de mort subite et d'adapter la prise en charge en fonction de leur risque.

D'après une étude menée par Brugada *et al*, 69% des patients ayant fait une mort subite ont eu de nouveau une arythmie, contre seulement 19% des patients ayant un antécédent de syncope. Le risque est de 8 % chez les asymptomatiques. Les individus présentant un ECG de type I ont un risque 7,7 fois plus élevé de développer un événement rythmique et le risque de mort subite augmente de 5,5 fois si le patient est un homme (Brugada *et al*. 2002). Des études contradictoires rendent difficile l'interprétation des stimulations programmées et la classification de ces individus en patients à risque (Priori *et al*. 2002; Brugada *et al*. 2003; Eckardt *et al*. 2005).

Ainsi, les patients présentant un ECG de SBr de type 1 spontané ou induit et ayant fait un événement de mort subite cardiaque récupérée ou une syncope présumée cardiaque, bénéficient de l'implantation d'un défibrillateur.

Les patients asymptomatiques, avec un ECG de type 1 induit par un test pharmacologique, semblent avoir un risque relativement faible d'événements rythmiques (0,37% d'événements rythmiques par an et par patient) ne justifiant pas d'une prise en charge spécifique (Priori *et al*., 2013).

Pour les autres patients, symptomatiques avec un aspect ECG induit ou asymptomatiques avec un aspect ECG spontané, aucun test ne semble pertinent pour établir une stratification du risque rythmique. Si l'exploration électrophysiologique a longtemps été proposée, les récentes études de Probst *et coll* et de Priori *et coll* ont souligné l'inefficacité de cette exploration pour ce syndrome (Probst *et al*., 2010; Priori *et al*., 2012)

Finalement, seul l'aspect induit ou spontané de l'ECG et les symptômes semblent décisifs dans l'établissement du risque rythmique comme résumé sur la Figure 9.

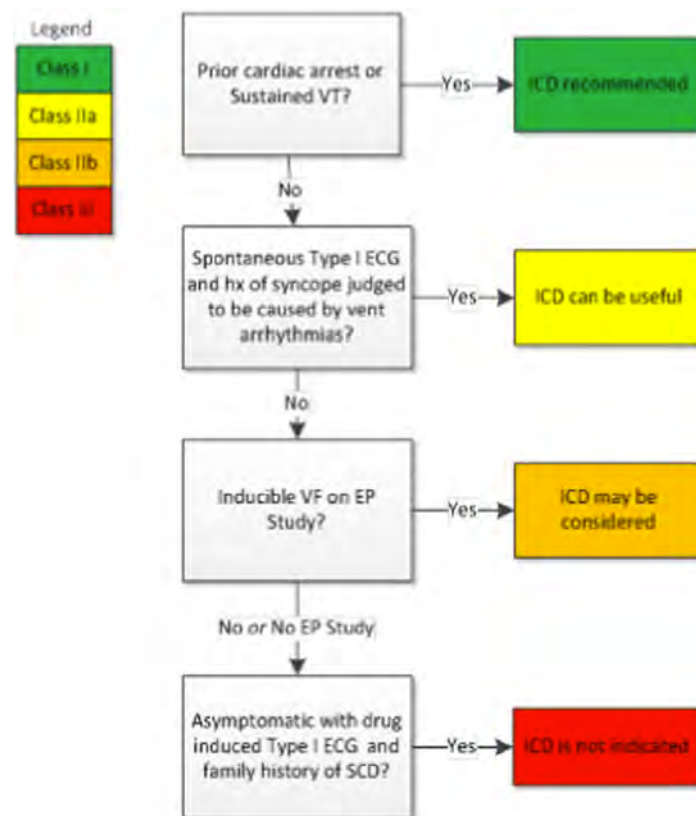


Figure 9 – Prise en charge des patients Brugada

SCD : Sudden Cardiac Death ; NAR : Nocturnal agonic respiration ; ICD : Implantable cardioverter defibrillator; EP Study : Electrophysiological study ; VF: ventricular fibrillation.
(Priori et al., 2005)

III.7. Hypothèses électrophysiopathologiques du SBr

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes physiopathologiques du SBr. Selon la première, le sus-décalage observé sur l'ECG des patients atteints du syndrome de Brugada serait le fait de l'existence d'un gradient de potentiel transmural important pendant la phase de repolarisation. Ce gradient est dû à une forte hétérogénéité de l'amplitude du plateau du potentiel d'action entre les cellules réparties dans la paroi du ventricule droit (Yan and Antzelevitch, 1999a). La phase de repolarisation rapide initiale du potentiel d'action (PA) résulte essentiellement de l'inactivation des canaux sodiques et de l'activation du courant transitoire sortant I_{to} . A la différence des cellules du myocarde sous-endocardique (MSEnd), les potentiels d'action des cellules du myocarde sous-épicaire (MSEpi) présentent une phase 1 plus prononcée, dite en « encoche ». Le courant potassique, I_{to} , présent dans les cellules du MSEpi et pratiquement absent des cellules du MSEnd, serait le principal courant responsable de la différence de morphologie entre les potentiels d'action des cellules de la paroi ventriculaire

(Antzelevitch et al., 1991; Wettwer et al., 1994 ; Näbauer et al., 1996). La perte du plateau de potentiel d'action est due essentiellement au déséquilibre entre les courants impliqués dans la phase 1 (Figure 10)

En théorie, une réduction des courants entrants I_{Na} ou $I_{Ca,L}$, ou une augmentation des courants sortants tels que I_{to} ou $I_{K,ATP}$ ou $I_{K,Ach}$ peut contribuer à la perte du plateau de potentiel d'action (Lukas and Antzelevitch, 1993; Yan and Antzelevitch, 1999b).

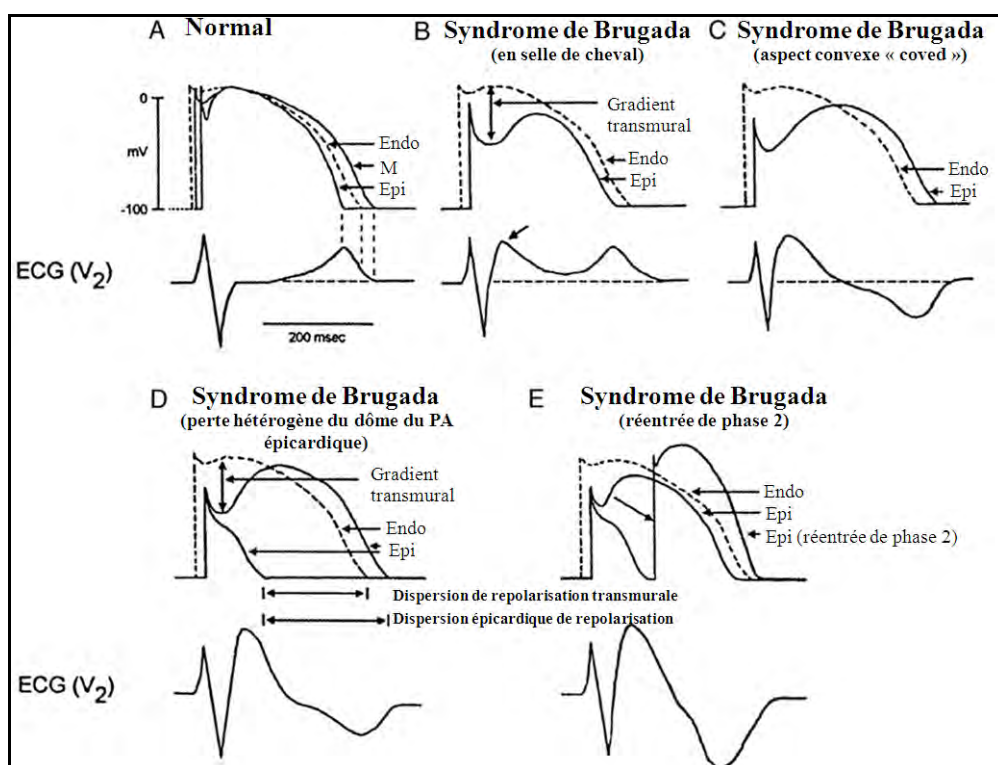


Figure 10 Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de C. Antzelevitch

(modifié selon Naccarelli and Antzelevitch, 2001)

Une deuxième hypothèse a été avancée pour expliquer le profil électrocardiographique du SBr. Elle est basée sur un retard de conduction dans la chambre de chasse du ventricule droit (CCVD) (Meregalli et al., 2005b). Le potentiel d'action de la CCVD (Figure 11B, haut) serait retardé par rapport à celui du reste du ventricule droit (Figure 11B, bas). Au cours du cycle cardiaque, le potentiel de membrane du VD serait alors plus positif que dans la CCVD, générant ainsi un gradient de courant (Figure 11C, a) qui se traduit au niveau de la dérivation précordiale droite V2 par une élévation du segment ST (Figure 11D). Dans la phase suivante du cycle cardiaque, lors de la repolarisation du VD, les gradients de potentiel entre le VD et la CCVD sont inversés, le

potentiel de membrane étant maintenant plus positif dans la CCVD. Le sens de dépolarisation va être alors à l'opposé de ce qui est décrit précédemment. Ce qui se traduit au niveau de l'ECG par une onde T négative (Figure 11).

Le mécanisme proposé par C.Antzelevitch, nommé « théorie de la repolarisation », est appuyé par un certain nombre d'études fonctionnelles alors que celui décrit par A.A.M. Wilde, nommé théorie de la dépolarisation, se base plus sur des données cliniques. L'hypothèse de la dépolarisation nécessite une meilleure caractérisation concernant les propriétés électrophysiologiques et anatomiques de la CCDV.

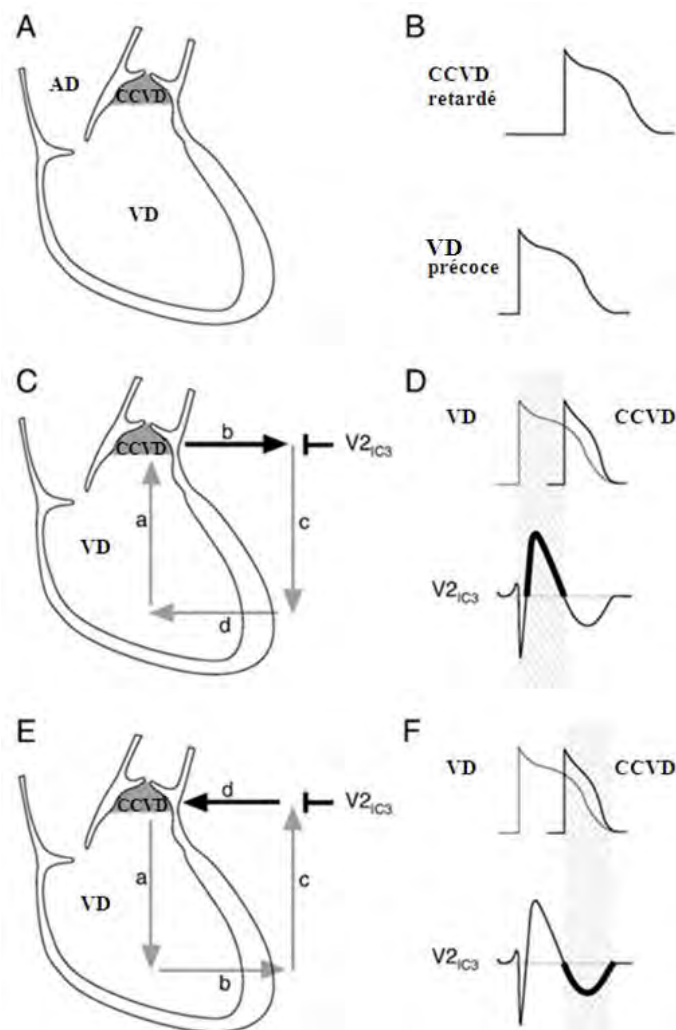


Figure 11 - Bases cellulaires du syndrome de Brugada selon l'hypothèse de A.A.M. Wilde.
(modifié selon Wilde et al., 2010)

L'apport de nouvelles techniques d'électrophysiologie et d'ablation des arythmies chez l'homme vient compléter l'hypothèse d'une anomalie de dépolarisation. Nademanee et coll ont pu prouver

chez l'homme, par un enregistrement épicardique de l'activation électrique du cœur, qu'il existait un retard de conduction dans la chambre de chasse du ventricule droit chez des patients atteints de syndrome de Brugada. La Figure 12 souligne ainsi l'existence de potentiel tardif et fragmenté au niveau de l'épicaire tandis que cette même activation est précoce et rapide au niveau de l'endocarde.

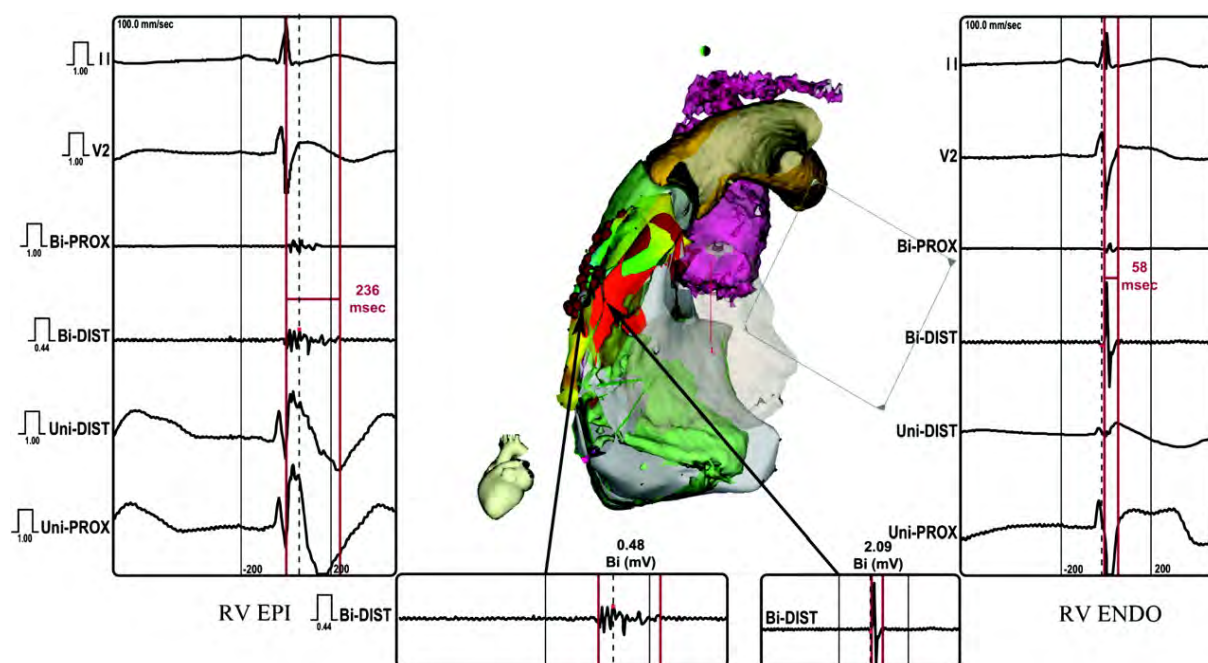


Figure 12 - Cartographie latérale gauche patient SBr

Représentation cartographique du cœur d'un patient atteint du SBr. La sonde d'ablation enregistre les potentiels de manière spécifique au niveau de l'épicaire et de l'endocarde dans le VD. La présence de potentiels fragmentés est observée spécifiquement au niveau épicaire suggérant un trouble de conduction en corrélation avec l'hypothèse de la dépolarisation.

(Nademanee et al., 2011)

Une des hypothèses pour expliquer le ralentissement de conduction spécifiquement observé au sein de la CCVD est l'hétérogénéité cellulaire qui le constitue. En effet, une étude a mis en exergue l'hétérogénéité embryologique constituant cette zone du cœur, mettant en évidence l'importance de la migration de cellules de la crête neurale lors de l'embryogénèse de la CCVD (Elizari et al., 2007).

IV. Génétique du syndrome de Brugada

Après la découverte de ce syndrome, de nombreuses équipes à travers le monde ont constaté la présence d'une transmission de la pathologie dans des cas familiaux suggérant une base génétique à l'apparition de ce syndrome (Brugada et al., 2000). Ces recrutements de patients ont permis de mettre en évidence que le SBr présentait un mode de transmission autosomique dominant.

IV.1. Les gènes identifiés dans le syndrome de Brugada

Les études de liaison visant à identifier un locus causal au sein de famille atteinte du syndrome de Brugada n'ont que très rarement abouti. Cette difficulté est probablement liée au fait que le SBr présente un mode de transmission plus complexe que le mode de transmission autosomique dominant initialement décrit. En effet, pour les variants causaux identifiés dans des études familiales, on constate une faible pénétrance du SBr : environ 32%. La pénétrance est une expression du degré auquel la présence de la mutation va induire la pathologie. Cette pénétrance peut être augmentée par l'utilisation d'un test pharmacologique et passer à 79% (Hong et al., 2004). Par conséquent la quasi-totalité des gènes identifiés dans le SBr sont le résultat d'approches gène candidat. L'approche « gène candidat » consiste à cibler un gène présumé comme étant impliqué dans la voie physiopathologique touchée d'après les données scientifiques collectées comme son expression tissulaire, sa fonction, son interaction avec une protéine impliquée ou son étude dans un modèle animal invalidé pour ce même gène.

Le gène *SCN5A* a été le premier gène identifié comme lié au syndrome de Brugada (Chen et al., 1998). Ce gène code pour la sous unité α du principal canal sodique cardiaque, responsable de la phase de dépolarisation initiale (phase 0) des cardiomyocytes. D'autres gènes ont également été identifiés dans le SBr principalement par des approches gène candidat. De manière globale, les mutations identifiées comme causales dans le SBr conduisent à une perte de fonction des courants dépolarisants et à un gain de fonction des courants repolarisants (Tableau 3).

Des études de criblage des parties codantes des gènes identifiés dans le SBr sur un large nombre de patients non reliés ont permis d'évaluer le degré d'implication de chaque gène (Crotti et al., 2012). Ces résultats suggèrent une forte implication du gène *SCN5A*, que l'on retrouve muté chez 10% à 30% des cas dans le SBr. Les canaux calciques identifiés comme mutés dans 5 à 10% sont

généralement associés à un raccourcissement de l'intervalle QT. L'ensemble des autres gènes impliqués dans le syndrome ne sont retrouvés mutés que dans de très rares cas. Ces éléments indiquent que la cause génétique de ce syndrome reste inexplicée dans approximativement 70% des cas.

Gene	Frequency	Function
Na ⁺ channel		
<i>SCN5A</i>	10–30%	I _{Na+} ↓
<i>SCN1B</i>	Rare	I _{Na+} ↓
<i>SCN2B</i>	Rare	I _{Na+} ↓
<i>SCN3B</i>	Rare	I _{Na+} ↓
<i>GPD1L</i>	Rare	I _{Na+} ↓
<i>MOG1</i>	Rare	I _{Na+} ↓
<i>SLMAP1</i>	Rare	I _{Na+} ↓
Ca ²⁺ channel		
<i>CACNA1C</i>	~5%	I _{Ca2+} ↓
<i>CACNB2b</i>	~5%	I _{Ca2+} ↓
<i>CACNA2D1</i>	Rare	I _{Ca2+} ↓
K ⁺ channel		
<i>HCN4</i>	Rare	I _{K+} ↑
<i>KCNE3</i>	Rare	I _{K+} ↑
<i>KCNE5</i>	Rare	I _{K+} ↑
<i>KCND3</i>	Rare	I _{K+} ↑
<i>KCNJ8</i>	Rare	I _{K+} ↑

Tableau 3 - Spectre et prévalence des gènes de susceptibilité du syndrome de Brugada

(Modifié selon Watanabe and Minamino, 2013)

IV.2. Implication des canaux sodiques dans le SBr

C'est en 1996 que l'isoforme Nav1.5 du canal sodique a été identifiée pour la première fois comme exprimée dans les ventricules cardiaques de rat (Cohen, 1996). Elle est codée par le gène *SCN5A* (Wang et al., 1996), localisée sur le chromosome 3q21-24 (George et al., 1995). Cette isoforme est préférentiellement exprimée au niveau des jonctions cellulaires ou disques intercalaires. En effet, Kucera et coll ont montré une colocalisation des canaux sodiques cardiaques avec la connexine 43 au niveau des disques intercalaires des myocytes ventriculaires

(Kucera et al., 2002). Nav1.5 est aussi exprimé d'une manière homogène au sarcolemme et au niveau des tubules T (Scriven et al., 2000; Brette and Orchard, 2006).

Cette protéine est formée de quatre domaines transmembranaires homologues (DI à DIV) (figure 8). Chaque domaine contient six segments (S1-S6) divisés en deux modules fonctionnels distincts : le pore, constitué des segments S5-S6 et le « voltage sensor » constitué des segments S1-S4 (Gellens et al., 1992). La protéine Nav1.5 présente de plus de nombreux sites d'interaction avec d'autres protéines régulatrices. La Figure 13 schématise de manière non exhaustive les sites spécifiques d'interaction de Nav1.5 avec ses protéines régulatrices (Rook et al., 2012).

Parmi les protéines régulatrices du canal Nav1.5, on peut compter les sous-unités Nav β qui sont des glycoprotéines transmembranaires. Elles sont constituées d'une grande partie extracellulaire N-terminale contenant un domaine de type immunoglobuline, un segment transmembranaire et une partie C-terminale intracellulaire. Quatre sous-unités Nav β ont été décrites dans la littérature : Nav β 1 (*SCN1B*), Nav β 2 (*SCN2B*), Nav β 3 (*SCN3B*) et Nav β 4 (*SCN4B*) (Isom et al., 1992; Isom et al., 1995; Morgan et al., 2000; Yu et al., 2003).

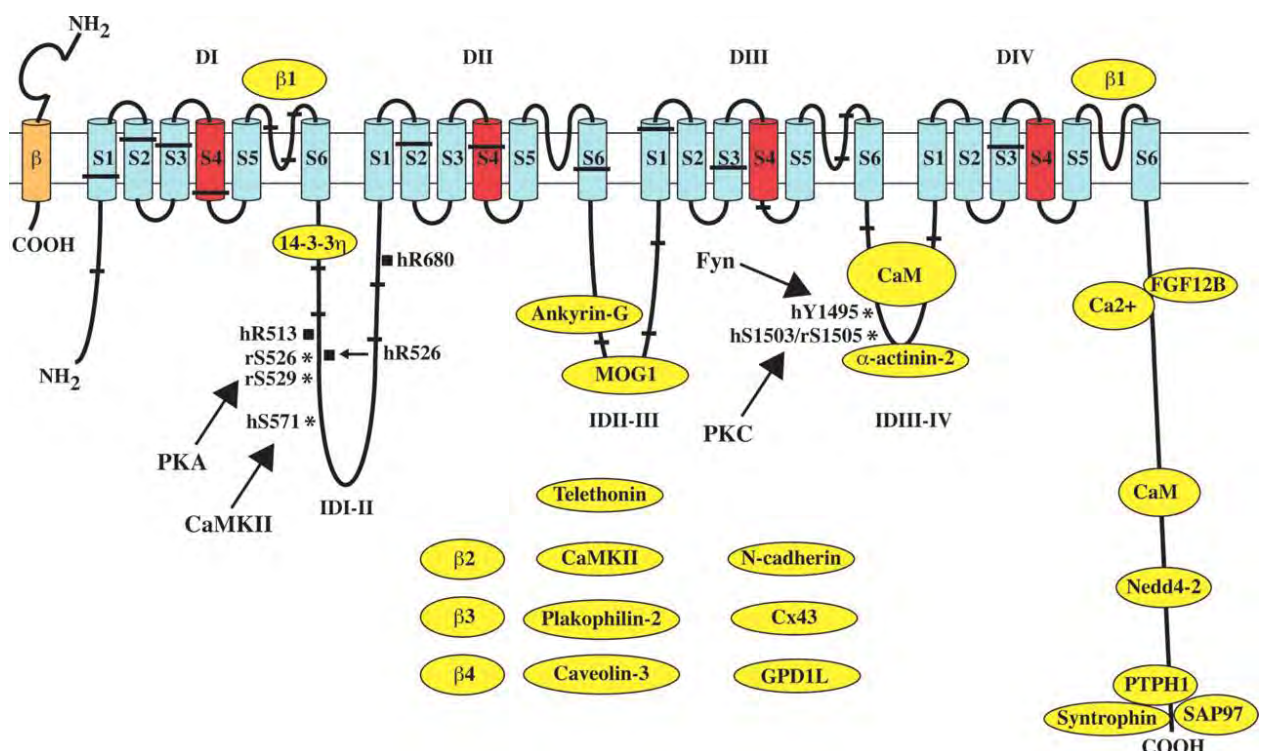


Figure 13 - Représentation schématique du canal sodique Nav1.5 et ses protéines régulatrices.

(Rook et al., 2012)

Les mutations dans le gène *SCN5A* restent de loin les plus fréquemment identifiées dans le SBr avec une prévalence comprise entre 10 à 30% selon les études. Les mutations sur le gène *SCN5A*, dans le SBr, provoquent une perte de fonction de la protéine. Cependant aucune relation génotype/phénotype parfaite n'a été observée au sein d'une famille suffisamment informative. Plus de 300 variants du gène *SCN5A* ont pour l'instant été décrits comme associés au syndrome de Brugada.

Deux mutations dans le gène *SCN1B* codant la sous unité Nav β 1 du canal sodique cardiaque ont été identifiées par notre unité et réduisent le courant sodique (Watanabe et al., 2008). D'autres approches gène candidat ont abouti à l'identification de nouveaux gènes pour le SBr. Ils ne sont associés cependant qu'à de rares cas. Un cas sporadique de SBr a été décrit avec une mutation dans la sous-unité Nav β 3 régulatrice du canal Nav1.5, codée par le gène *SCN3B*, entraînant aussi une perte de fonction du canal sodique cardiaque dans les cellules HEK tsA201. Le mécanisme est double: la mutation L10P de la sous unité Nav β 3 modifie les propriétés biophysiques du canal sodique ainsi que son adressage à la membrane (Hu et al., 2009). L'implication potentielle de la sous-unité Nav β 3 dans les troubles du rythme chez l'homme avait déjà été suggérée par l'exploration électrophysiologique de la souris invalidée pour *SCN3B* montrant une susceptibilité plus importante à développer des tachycardies ventriculaires mono ou polymorphes (Hakim et al., 2008). Très récemment, une mutation sur le gène *SCN2B* codant la protéine Nav β 2 a été mise en évidence dans un cas sporadique de syndrome de Brugada. Cette mutation provoque une diminution du courant du canal sodique liée à une diminution de l'adressage membranaire de Nav1.5 (Riuró et al., 2013).

En 2007, une approche familiale a permis d'identifier une mutation, A280V, sur le gène *GPD1L* codant pour la glycerol-3-phosphate dehydrogenase like (London et al., 2007). Des études, effectuées sur des cellules HEK, suggèrent que ce variant altère l'adressage de Nav1.5 à la membrane expliquant la diminution de densité du courant sodique cardiaque. Le gène *GPD1L* est le seul à avoir été mis en évidence par analyse de liaison. Les mutations du gène *GPD1L* dans le syndrome de Brugada sont peu fréquentes.

Le gène *RANGRF* codant pour la protéine MOG1, identifiée comme régulatrice de Nav1.5, a été criblé sur une cohorte de patients Brugada (Kattygnarath et al., 2011). Cette étude a conduit à l'identification du variant E83D chez une femme symptomatique. L'étude fonctionnelle de ce

variant dans des cellules HEK a montré une diminution de 54% de la densité de courant générée par le canal sodique. Les mutations du gène *RANGRF* dans le syndrome de Brugada sont peu fréquentes.

Le gène *SLMAP1*, codant pour une protéine localisée au niveau des tubules T des cardiomyocytes et du sarcoplasme, a été identifié comme étant impliqué dans le syndrome de Brugada grâce à un criblage des parties codantes du gène réalisée sur 190 patients (Ishikawa et al., 2012). Les variants V269I et E710A produisent une diminution de l'expression membranaire de la protéine Nav1.5. (Ohno et al., 2011). L'adressage membranaire est rétabli lorsqu'on diminue l'expression des gènes portant les variants. Des expériences de potentiel imposé en configuration cellule entière ont confirmé la diminution de la densité de courant liée aux défauts d'adressage.

IV.3. Implication des canaux calciques dans le SBr

Dans le cœur, le calcium est impliqué dans le contrôle et la régulation d'une grande variété de fonctions cellulaires allant du couplage excitation-contraction, à l'activation d'enzymes ou à l'expression de certains gènes. Le courant calcique de type L ($I_{Ca,L}$) est généré par des complexes protéiques formés de la sous unité $\alpha 1c$ ou Cav1.2 formant le pore du canal, à laquelle sont associées les sous-unités régulatrices $\beta 2a$, $\alpha 2/\delta$ et γ selon une stoechiométrie de 1:1:1:1 (Catterall, 2000). Le courant I_{CaL} présente une inactivation très lente et une conductance élémentaire assez élevée (Fox et al., 1987). Le canal Cav1.2 et ses sous-unités sont préférentiellement localisés au niveau des tubules T des cardiomyocytes ventriculaires (Wibo et al., 1991; Carl et al., 1995; Jurevicius & Fischmeister, 1997; Scriven et al., 2000).

La sous-unité $\alpha 1c$, codée par le gène *CACNA1C*, est formée de quatre domaines transmembranaires, DI à DIV (Figure 14). Comme le canal Nav1.5, chaque domaine contient six segments (S1-S6) portant les domaines nécessaires à la fonction de canal : (i) Le segment S4 : comme pour les canaux sodiques dépendants du potentiel, l'ouverture et la fermeture dépendantes du potentiel sont contrôlées par ce segment. (ii) les segments S5-S6 forment le pore du canal. L'association des boucles S5-S6 constitue le filtre de sélectivité au calcium grâce à la présence de quatre résidus glutamate formant le motif EEEE (Parent and Gopalakrishnan, 1995). D'autres domaines participent à la régulation des canaux calciques Cav1.2 tels que les interdomaines I-II,

II-III et III-IV par interactions avec plusieurs protéines régulatrices du canal Cav1.2 tels que la calmoduline, la calmoduline kinase II (Pitt et al., 2001 ; Bradshaw et al., 2002).

De plus, c'est au niveau de l'interdomaine I-II que se situe le domaine AID « Alpha Interacting Domain », correspondant à la séquence QQLEEDL-GY-WITQ-E, indispensable à l'interaction avec le domaine ABP, « α binding pocket », des sous-unités β des canaux calciques (Pragnell et al., 1994). Cette interaction masque une séquence de rétention endoplasmique, et permet ainsi l'adressage du canal à la membrane (Bichet et al., 2000).

Les sous-unités Cava δ 1-4 interagissent avec la partie extracellulaire du domaine III de Cav1.2 et participent à la régulation du canal. Cava δ 1 augmente l'adressage membranaire de Cav1.2 et accélère les cinétiques d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Gurnett et al., 1997). Cava δ 2 et Cava δ 4 augmentent la densité de courant de Cav1.2 (Felix et al., 1997). Cava δ 3 en présence de β 2, augmente l'amplitude du courant généré par Cav1.2, accélère les cinétiques d'activation et d'inactivation et décale les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Klugbauer et al., 1999).

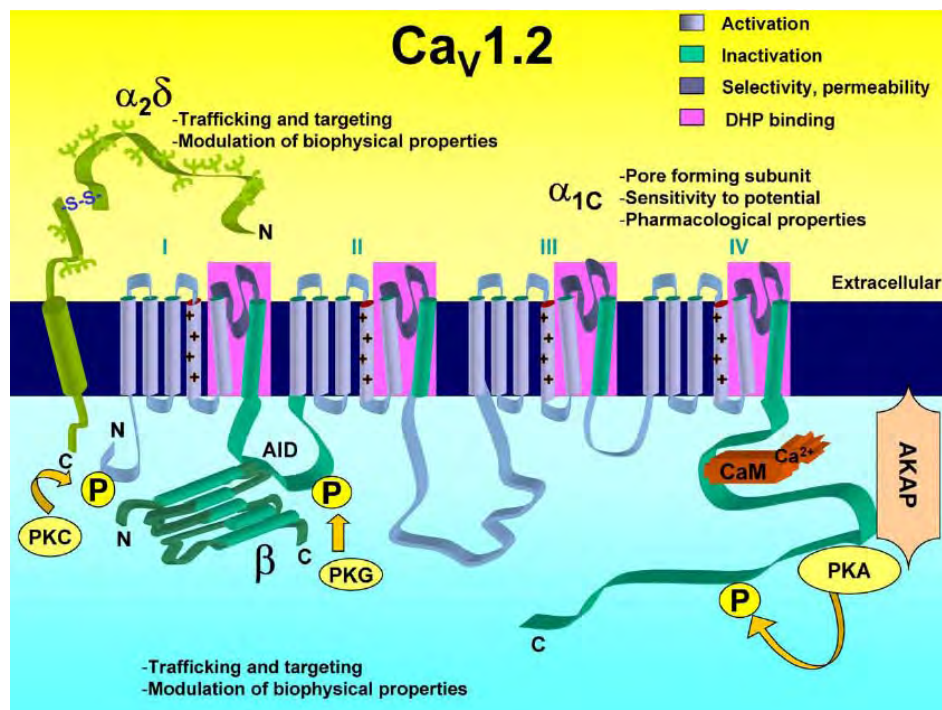


Figure 14 - Schéma des sous-unités α 1c, β et α 2 δ responsables du courant $I_{\text{Ca,L}}$
(Brette et al., 2006)

Des mutations dans les gènes *CACNA1C* (G490R et A39V) et *CACNB2* codant respectivement les sous-unités α (Cav1.2), et $\beta 2$ responsables du courant $I_{Ca,L}$, ont été identifiées, provoquant une perte de fonction (Antzelevitch et al., 2007) et menant au phénotype chevauchant de SBr et du syndrome du QT court. Des mutations dans le gène *CACNA2D1*, codant une autre sous-unité régulatrice de Cav1.2 ($\alpha 2\delta 1$) ont été identifiées dans le syndrome de Brugada ainsi que dans le syndrome de repolarisation précoce (Burashnikov et al., 2010a) toutes associées à des pertes de fonction du courant $I_{Ca,L}$ généré par Cav1.2.

IV.4. Implication des canaux potassiques dans le SBr

Le principal courant potassique impliqué dans le syndrome de Brugada est le courant $I_{to,f}$, très présent dans les cellules du MSEpi comparativement aux cellules du MSendo. Le courant $I_{to,f}$ est un courant transitoire rapide sortant impliqué dans la phase de repolarisation précoce (phase 1) du potentiel d'action ventriculaire. Le courant $I_{to,f}$ est généré chez l'homme par la protéine Kv4.3. Les canaux Kv4 sont exprimés dans de nombreux tissus avec un haut niveau d'expression dans le cerveau, les vaisseaux et le cœur. Il existe un autre courant $I_{to,s}$ plus persistant que le courant $I_{to,f}$ et généré par la protéine Kv1.4. Les protéines Kv4 sont exprimées dans les ventricules droit et gauche avec une prédominance pour le ventricule droit, alors que la protéine Kv1.4 est principalement présente au niveau du septum interventriculaire. Kv4.3 représente la forme prédominante chez l'homme et le chien et Kv4.2 la forme principale chez la souris (Dixon et al., 1996; Kong et al., 1998; Zhu et al., 1999; Guo et al., 2005; Gaborit et al., 2007). Contrairement aux canaux sodiques et calciques, les canaux Kv4 s'organisent en homo ou hétérotétramères de sous-unités α qui forment le pore du canal (Christie et al., 1990; Isacoff et al., 1990; Ruppertsberg et al., 1990; MacKinnon, 1991). Ces sous-unités sont formées de 6 segments transmembranaires S1 à S6 avec les extrémités N- et C terminales intra-cytoplasmiques (Figure 15). Le segment S4 possédant des résidus chargés positivement constitue le « voltage-sensor » du canal (Snyders, 1999). Entre les segments S5 et S6 se retrouve la boucle du pore P contenant le motif G(Y/F)G qui confère la sélectivité aux ions K^+ (Doyle et al., 1998).

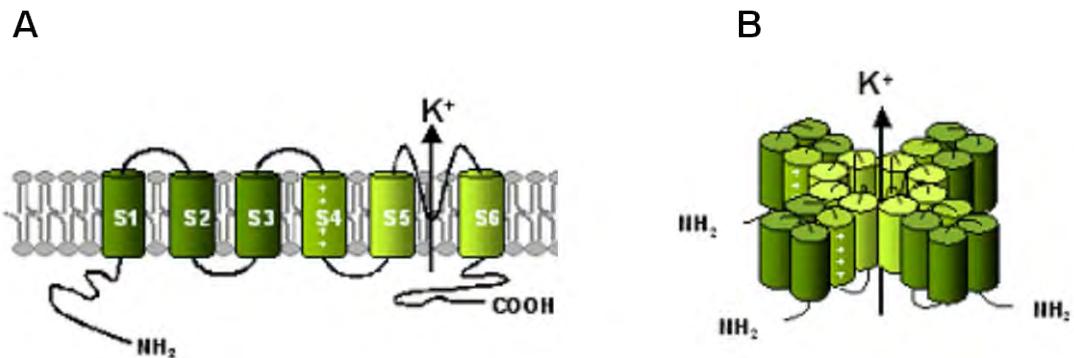


Figure 15 - A, schéma de la sous-unité α . des canaux Kv4 à 6 segments transmembranaires
B, Schéma de la structure tétramérique d'un canal Kv

Les canaux Kv4 interagissent avec un grand nombre de protéines régulatrices modulant leurs adressages vers la membrane plasmique, leurs cinétiques ou encore leurs dépendance au potentiel.

La protéine KChip2 codée par le gène *KCNIP2*, principalement exprimée dans le MSEpi (Gaborit et al., 2010a), augmente l'adressage membranaire de Kv4.3 et est identifiée comme la cause d'un courant Ito prononcé dans le MSEpi. KChiP2 joue également un rôle sur les canaux Kv4 en diminuant sa cinétique d'inactivation et en décalant les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus positifs (Shibata et al., 2003; An et al., 2000).

La protéine DPP6 codée par le gène *DPPX* a été identifiée initialement comme interagissant avec la protéine Kv4.2 dans le cerveau et a été suggérée comme ayant un rôle également dans le cœur. DPP6 augmente l'adressage membranaire des canaux Kv4 et décale les courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. DPP6 accélère également les cinétiques d'activation, d'inactivation et de réactivation (Radicke et al., 2005).

Les protéines MiRP1 et MiRP2 codées respectivement par les gènes *KCNE2* et *KCNE3*, provoquent toutes deux, lorsqu'elles sont co-exprimées avec Kv4.3 une perte de fonction du courant Ito (Wu et al., 2010; Delpón et al., 2008).

Les sous-unités Kv β sont des protéines de faible poids moléculaire. Kv β 1, Kv β 2 et Kv β 3 lorsqu'elles sont co-exprimées avec Kv4.3 provoquent une augmentation de la densité de courant (Yang et al., 2001a). Les mécanismes régissant cette augmentation de courant restent pour l'instant peu décrits. Cependant, ces protéines ont été identifiées comme appartenant à la famille des aldo-keto-reductases. La protéine Kv β 2 présente entre autre un taux de transcrits élevé dans

les ventricules droits et gauches sans la présence d'un gradient épicarde/endocarde (Gaborit et al., 2010).

Différents travaux ont montré l'importance des mécanismes oxido-réducteurs dans le fonctionnement et la régulation du courant $I_{to,f}$. Il a par exemple été démontré que chez le rat diabétique, l'activité de la thioredoxine et de la glutathione reductase sont diminuées dans le cœur et qu'une inhibition de ces deux agents réducteurs évite une augmentation du courant I_{to} dans des cardiomyocytes ventriculaires de rat traités à l'insuline. Une autre étude réalisée sur des cardiomyocytes de rat du ventricule gauche a montré qu'un stress oxydatif engendre une diminution du courant $I_{to,f}$ (Li et al., 2005; Xu et al., 2002). Les résultats de ces études suggèrent qu'un environnement réducteur pourrait provoquer une augmentation du courant I_{to} .

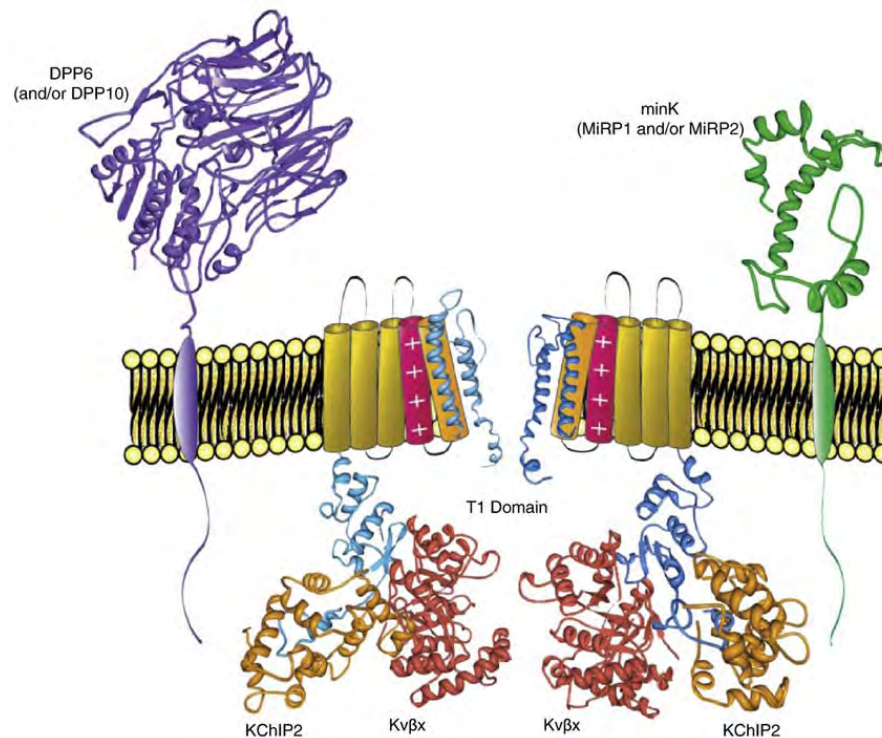


Figure 16 – schéma représentatif des sous-unités régulatrices des canaux Kv4.

(Niwa and Nerbonne, 2010)

Le canal Kv4.3 semble directement lié à la structure du cytosquelette d'actine. En effet, la perturbation du cytosquelette d'actine par des traitements à la cytochalasine D, dans des cardiomyocytes hypertrophiés a été associée à une diminution de la densité d' I_{to} alors qu'une stabilisation du réseau d'actine par la phalloïdine provoque une augmentation (Yang et al., 2002).

D'autres études suggèrent également l'importance du réseau de microtubules dans la génération du courant Ito (Shimoni et al., 1999).

Une mutation (R99H) a été identifiée dans le gène *KCNE3* codant pour une sous-unité (MiRP2) des canaux potassiques (Delpón et al., 2008). Cette mutation provoque une augmentation du courant généré par Kv4.3 ce qui renforce l'implication du courant Ito dans le syndrome de Brugada. Dans cette étude, les auteurs montrent une co-immunoprécipitation de MiRP2 et du canal Kv4.3 dans le tissu atrial humain.

Récemment, une étude a mis en évidence des mutations directement sur le gène *KCND3* codant pour le canal Kv4.3 aboutissant à un gain de fonction. Ces mutations ont été découvertes dans des cas sporadiques de patients Brugada de sexe masculin. La modélisation du gain de fonction du courant Ito aboutit à un raccourcissement du potentiel d'action des cellules MSEpi pour les 2 mutations (L450F et G600R) identifiées (John R. Giudicessi et al., 2011). Les auteurs n'ont cependant pas modélisé les effets obtenus dans les conditions hétérozygotes dans cette étude.

Le variant S422L du gène *KCNJ8* codant pour la protéine Kir6.1, préalablement identifié dans un cas du syndrome de repolarisation précoce a été retrouvé chez 3 patients atteints du syndrome de Brugada (Barajas-Martínez et al., 2012). Ce variant provoque un gain de fonction du canal potassique sensible à l'ATP, Kir6.1 (Medeiros-Domingo et al., 2010). Il est retrouvé dans approximativement 0.2% de la population générale (selon exome variant server).

Le gène *KCNE5* a également été identifié comme étant impliqué dans le syndrome de par sa régulation du courant Ito (Ohno et al., 2011). Sur une cohorte de 205 patients japonais, le variant Y81H a été retrouvé chez 3 patients non reliés entre eux (deux femmes et un homme). Le variant D92E;E93X a été retrouvé chez un patient. Ces deux mutations provoquent une augmentation du courant Ito.

Une étude additionnelle a consisté à cribler le gène *HCN4* dans une cohorte de patients atteints de SBr et une cohorte de patients atteints du syndrome du QT long. Le gène *HCN4* code pour une des protéines canalaire responsables du courant I_f qui est à la base du phénomène de dépolarisation diastolique observé dans les cellules du nœud sinusal. Les auteurs justifient l'intérêt pour ce gène compte-tenu du fait que les événements bradycardiques sont identifiés comme déclencheurs d'événements de fibrillation ventriculaire. Dans cette étude, les auteurs suggèrent une augmentation du risque de mort subite lorsqu'une perte de fonction est observée

dans ce canal (Ueda et al., 2004). Très peu de variants sur ce gène ont été identifiés dans le syndrome de Brugada et l'implication du gène *HCN4* dans ce syndrome porte à controverse.

IV.5. Concept des syndromes chevauchants

Plusieurs troubles du rythme tels que le SBr, le syndrome du QT long (SQTL) et le syndrome du QT court (SQTC) qui sont des entités cliniques séparées voient certains gènes communs être impliqués dans leur mécanisme physiopathologique. De plus, certaines études portant sur le gène *SCN5A* font état de phénotypes différents pour une même mutation (Bezzina *et al.*, 1999). Plus surprenant encore, ce phénomène peut se rencontrer au sein d'une même famille (Kyndt *et al.*, 2001).

Un certain nombre de mutations du gène *SCN5A* sont reconnues comme étant impliquées dans le SQTL, le SBr, les troubles de la conduction (cardiac conduction defect : CCD) ou encore les cardiopathies dilatées (dilated cardiomyopathy : DCM). La Figure 17 illustre les différentes mutations retrouvées dans ces pathologies. On constate que la répartition des mutations dans ces pathologies est aléatoire dans la séquence de la protéine.

La plus surprenante association phénotypique est celle du SBr et LQT3 du fait de l'opposition des effets des mutations associées à ces syndromes. En effet, les mutations de *SCN5A* impliquées dans le SBr induisent une perte de fonction du canal sodique $\text{Na}_v1.5$ alors que dans le cas du SQTL il s'agit de mutations entraînant un gain de fonction. Des études de la mutation Nav1.5-1795insD, retrouvée dans une famille hollandaise, ont montré qu'à elle seule, la mutation, est suffisante pour causer plusieurs phénotypes (Clancy & Rudy, 2002; Remme *et al.*, 2006). La mutation Nav1.5-1795insD associe une perte de fonction du canal Nav1.5 et une persistance du courant I_{Na} tardif (Figure 18).

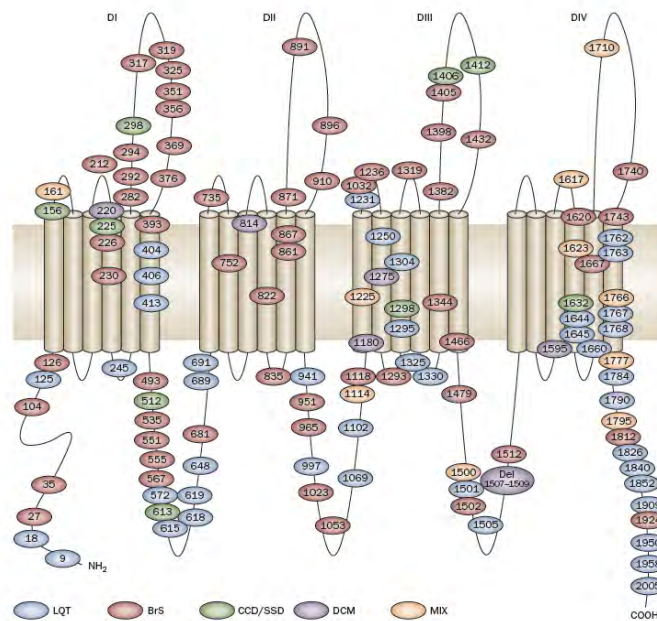


Figure 17 - Représentation schématique des mutations du gène *SCN5A* et leurs localisations sur le canal $\text{Na}_v1.5$

LQT : Syndrome du QT long, BrS : Syndrome de Brugada, CCD/SSD : trouble de la conduction cardiaque/dysfonction sinusale, DCM : cardiomyopathie dilatée, Mix ; phénotype mixte (Ruan et al., 2009).

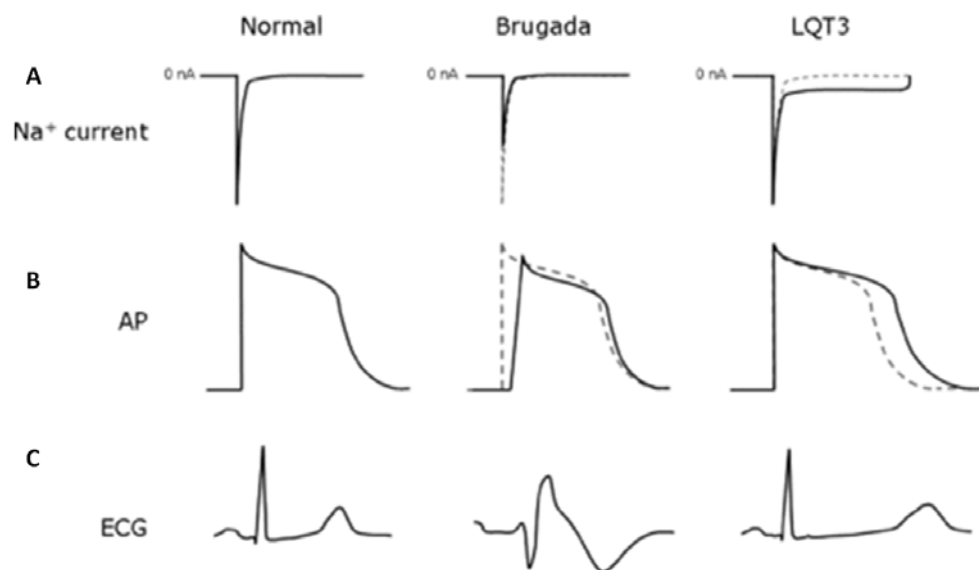


Figure 18 – Modélisation de la double conséquence de la mutation *Nav1.5-1795insD*

A- Représentation de la modification du courant I_{Na} en voltage imposé configuration cellule entière. B- Modélisation du potentiel d'action en fonction des deux effets (perte de fonction et persistance du courant I_{Na}). C- Modélisation de l'ECG selon ces deux effets (Modifié d'après Remme and Bezzina, 2010).

En plus du SBr et du SQT, les mutations *SCN5A* ont également été trouvées dans d'autres arythmies ou des anomalies structurales cardiaques (Tableau 4).

Antzelevitch *et coll* ont également montré l'implication du gène *CACNA1C* chez des patients présentant SBr isolé mais aussi chez des patients associant SBr et intervalle QT court (Antzelevitch *et al.*, 2007). Des mutations dans le gène *CACNA2D1* chez des patients atteints du SBr et également chez des patients atteints du syndrome de repolarisation précoce (Burashnikov *et al.*, 2010b). Le variant S422L du gène *KCNJ8* a aussi été retrouvé dans ces 2 pathologies.

Les syndromes chevauchants augmentent la difficulté pour les cliniciens de choisir un traitement adapté. En effet, le traitement à la flécaïnide utilisé pour diminuer la durée de l'intervalle QT dans le cadre d'un SQT de type 3 peut déclencher une surélévation du segment ST caractéristique du SBr et augmenter le risque de développer des arythmies ventriculaires (Priori *et al.*, 2000).

Pathologie	Référence
Fibrillation ventriculaire idiopathique	(Akai <i>et al.</i> , 2000)
Mort subite du nourrisson	(Wang <i>et al.</i> , 2007)
Dysfonction sinusale	(Benson <i>et al.</i> , 2003)
sidération associée à un SBr	(Takehara <i>et al.</i> , 2004)
Cardiomyopathie dilatée associée à des anomalies du système de conduction ou de la fibrillation auriculaire	(Olson <i>et al.</i> , 2005)
Tachycardies ventriculaires monomorphes et anomalies structurales du ventricule droit	(Frigo <i>et al.</i> , 2007)
Orage rythmique dans un contexte d'infarctus du myocarde	(Hu <i>et al.</i> , 2007)

Tableau 4 - Troubles du rythme et anomalies structurales associés à des mutations du gène *SCN5A*

Cette étude montre aussi que les patients mutés pour le gène *SCN5A* ont en moyenne un intervalle PR et QRS plus long que les non-porteurs ce qui démontre que ces mutations ont cependant un effet fonctionnel impliquant des troubles de la conduction (Figure 20).

Cet élément corrèle avec plusieurs études ayant montré que des mutations dans le gène *SCN5A* sont souvent associées à un ralentissement de la conduction cardiaque (Smits et al., 2002; Probst et al., 2006 ; Yokokawa et al., 2007). L'étude de Probst et coll montre que le modèle monogénique initialement décrit, ne permet pas d'expliquer à lui seul la présence du tracé ECG du SBr et empêche une bonne prédiction du risque rythmique. Les mutations perte de fonction du canal sodique constitueraient plus une base génétique des troubles de conduction que du SBr pour lequel ces mutations ne sont, dans certains cas, ni nécessaires ni suffisantes à l'apparition de ce syndrome.

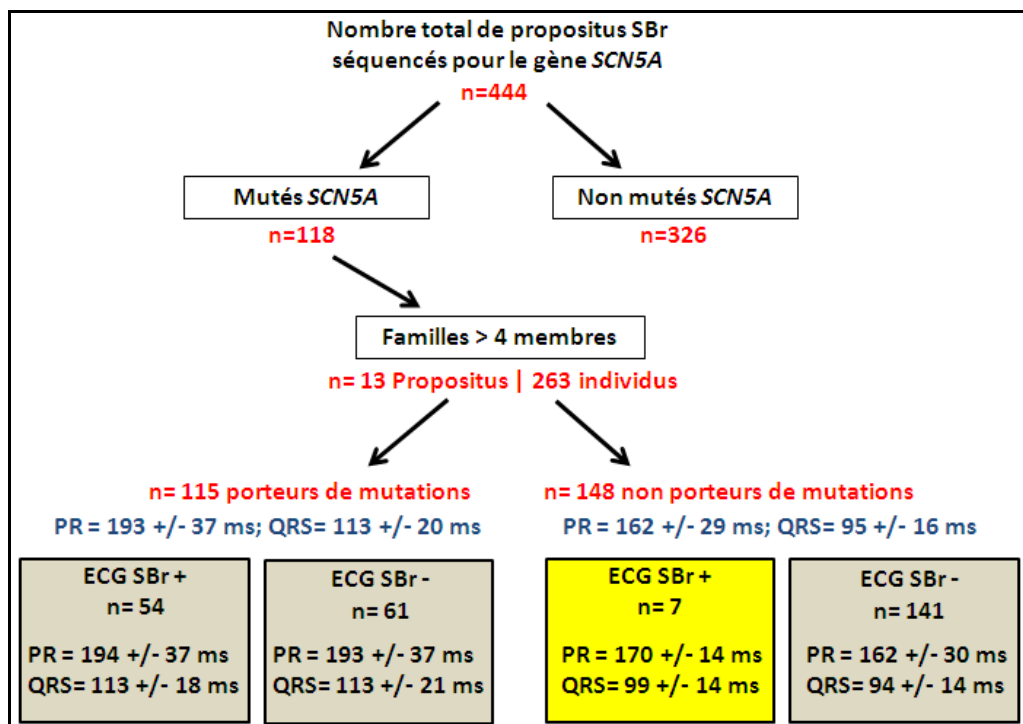


Figure 20 – Schéma récapitulatif de l'étude de Probst et coll, concernant le rôle des mutations *SCN5A* dans le syndrome de Brugada et les troubles de la conduction.

(Probst et al., 2009)

Les études ayant mis en avant l'implication d'autres gènes dans le SBr, présentent pour la plupart une analyse fonctionnelle donnant la preuve de concept de leur implication dans le syndrome de Brugada. Ces nouveaux gènes du syndrome de Brugada suggèrent des mécanismes électrophysiologiques différents impliquant des voies de signalisation variées aboutissant au phénotype du SBr.

De plus un certain nombre de variants rares identifiés comme causaux dans le SBr se sont avérés être présents dans la population générale dans une étude danoise récente (Risgaard et al., 2013). Cette étude pointe du doigt le manque d'ADN contrôles utilisés dans certaines études si l'on considère la prévalence de 2/1000 du SBr (Tableau 5).

Genes	Amino acid	Found in number of patients	Prevalence
<i>CACNA2D1</i>	p.S709N	6	1:89
<i>CACNB2</i>	p.S143F	3	1:178
<i>CACNB2</i>	p.T450I	6	1:89
<i>SCN5A</i>	p.F2004L	3	1:178
Overall	–	18	1:30 (18:536)

Tableau 5 - haute prévalence dans une population contrôle danoise de variant identifiés dans le syndrome de Brugada.
(Risgaard et al., 2013)

L'influence de variants fréquents sur les paramètres électrocardiographiques ont récemment été mis en évidence par de nombreux travaux. Parmi ceux-ci, une étude d'association sur génome entier (GWAS) réalisée sur 40,407 individus a montré que des polymorphismes de l'ADN pouvaient influencer sur la durée de l'intervalle QRS (Sotoodehnia et al., 2010). Parmi les 22 loci identifiés dans cette étude, celui présentant la probabilité d'association la plus forte est localisé à l'emplacement des gènes *SCN5A* et *SCN10A* (Figure 21).

Les résultats de cette étude confirment que des polymorphismes de l'ADN peuvent influencer sur la conduction cardiaque et renforcent également les résultats concernant les troubles de conduction observés dans les études familiales du SBr présentant des mutations du gène *SCN5A*.

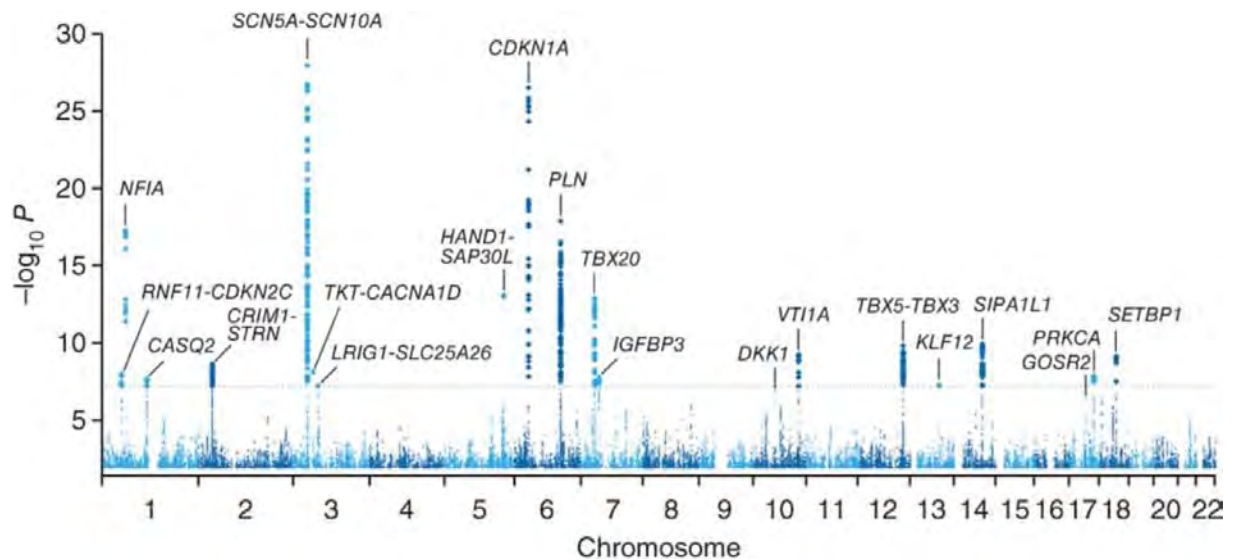


Figure 21 – Manhattan plot montrant l'association de SNPs avec l'intervalle QRS dans une GWAS de 40,407 individus.

Le seuil de significativité ($P = 5 \times 10^{-8}$) est marqué par la ligne horizontale de pointillés.

(Sotoodehnia et al., 2010)

Des études GWAS similaires ont mis en évidence l'influence de polymorphismes de l'ADN sur d'autres paramètres de l'ECG tels que l'intervalle QTc (Pfeufer et al., 2009), l'intervalle PQ (Pfeufer et al., 2010) ou encore la fréquence cardiaque (den Hoed et al., 2013). Récemment deux études ont identifié chacune un locus lié à l'augmentation du risque de mort subite cardiaque par fibrillation ventriculaire (Bezzina et al., 2010, Arking et al., 2011). L'ensemble des loci identifiés parmi ces études sont résumés en Figure 22.

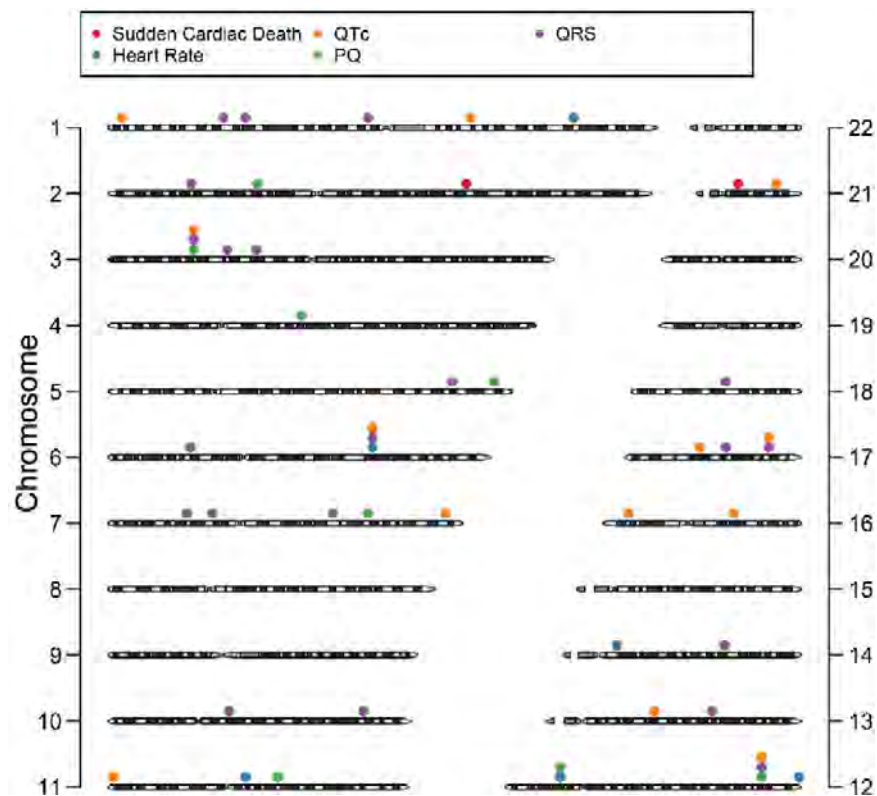


Figure 22 – Localisation génomique des signaux publiés influant sur le fonctionnement électrique cardiaque.

Sont présents les signaux significatifs ($P = 5 \times 10^{-8}$) associés à la mort subite cardiaque (SCD), à la fréquence cardiaque et à la durée des intervalles QTc, QRS et PR (Kolder et al., 2012).

L'ensemble de ces données, tant au niveau des études familiales que de la récente découverte de modulateurs génétiques communs des paramètres ECG influant sur le risque de mort subite cardiaque suggère que le syndrome de Brugada pourrait être une pathologie oligogénique dont le phénotype serait régulé par la présence de facteurs génétiques communs associés à des troubles de la conduction cardiaque. Cette hypothèse remet en question le mode de transmission mendélien jusqu'alors considéré dans le syndrome de Brugada.

De manière à éclaircir la compréhension des mécanismes génétiques régissant la survenue du SBr, de nouvelles stratégies génétiques doivent être appliquées.

IV.7. Applications des nouvelles technologies génétiques au syndrome de Brugada

On pensait auparavant que les maladies rares comme le SBr pouvaient être expliquées par l'identification de variants rares à effet fort et que les pathologies fréquentes comme l'hypertension artérielle étaient associées à des variants retrouvés fréquemment dans la population générale (Doris, 2002) (« common disease common variant » : maladie fréquente variant fréquent (Risch and Merikangas, 1996). Cependant il est difficile de classer les maladies génétiques en fonction de leur modèle. On parle aujourd'hui plutôt d'un continuum entre les formes monogéniques, oligogéniques et polygéniques. En effet, au sein de la majorité des maladies monogéniques on constate des défauts de pénétrance et d'expressivité que l'on peut attribuer à la présence de variants à effet mineur (Kääb and Schulze-Bahr, 2005). De même, un modèle polygénique d'une maladie fréquente, où une combinaison de variants à effet faible doit être observée pour comprendre le phénotype et ne permet pas systématiquement d'expliquer l'ensemble des cas rencontrés.

La transmission d'une pathologie génétique, en fonction de sa complexité, se produit par l'intermédiaire de différents types de variants (voir Figure 23). 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** dans la population générale ayant un **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 couplant statistiques et séquençage de régions codantes de gène sur une population de malades par rapport à une population contrôle.

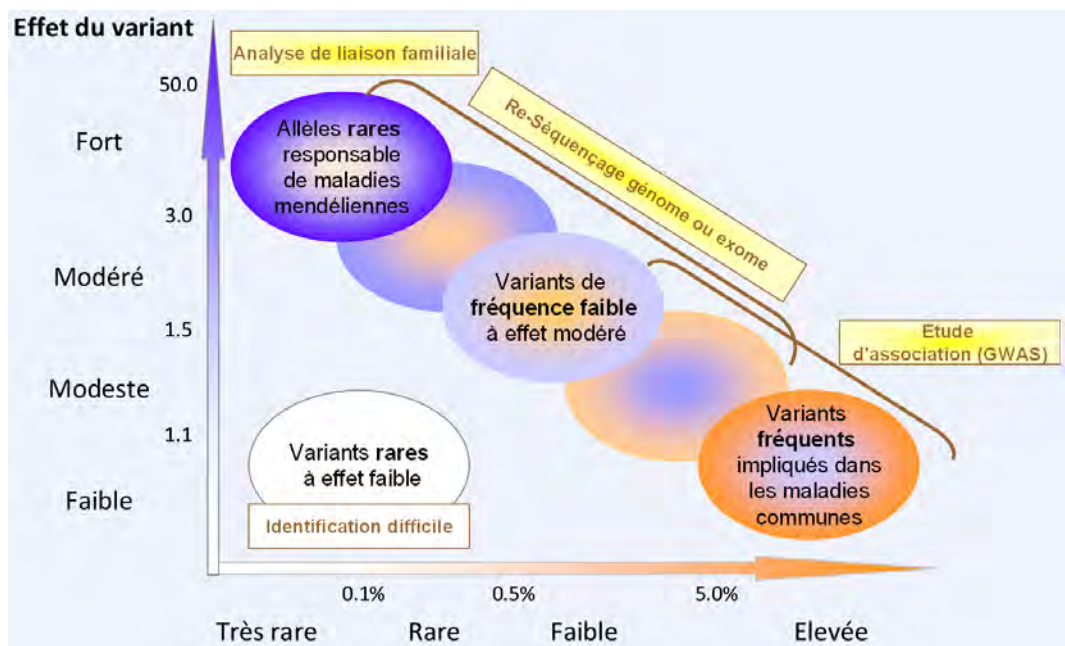


Figure 23 - Méthode d'identification des variants en fonction de la fréquence de l'allèle à risque et de l'intensité de son effet (odds ratio).

Modifié d'après Manolio et al., 2009

➤ **Identification de variant rares**

Ces 15 dernières années, soit depuis la mise en évidence du gène *SCN5A* dans le SBr, le domaine de la génétique a énormément évolué. Le développement du séquençage et du génotypage haut débit a ouvert la porte à de nouvelles stratégies génétiques. Il est possible aujourd'hui de séquencer l'ensemble du génome d'un individu en une semaine ou encore de génotyper 96 individus en même temps sur plus d'1 million de SNPs. Les puces CGH (comparative genomic hybridization) permettent l'identification des CNV (pour « copy number variations ») qui sont des duplications ou des délétions allant d'1kb à plusieurs Mega bases.

Le séquençage du génome entier par les techniques de séquençage haut débit apporte beaucoup de données qui sont difficiles à interpréter compte-tenu des faibles connaissances sur la structure et les modes de régulation du génome. Un autre élément qui rend compliquée l'identification d'un variant non codant dans une pathologie rare est le manque d'informations pour filtrer les données selon la rareté des variant. En effet, les bases de données de variant génétiques sont plus bien plus exhaustives dans les régions codantes que dans les régions intergéniques.

Dans le cadre des stratégies familiales, une approche intermédiaire est le séquençage d'exome, qui consiste à capturer et à séquencer l'ensemble des régions codantes du génome. Il est en effet plus

réalisable de prouver l'implication d'un variant dans une pathologie lorsque celui-ci affecte directement la séquence ou l'épissage d'un gène donné.

Le séquençage haut débit appliqué à des approches familiales constitue un outil extrêmement puissant pour l'identification de variants rares à effet fort. Dans le but d'identifier un gène fortement impliqué dans une pathologie rare, il peut être envisagé de séquencer plusieurs patients de familles différentes et de tester la ségrégation des variants rares identifiés dans un même gène. Si cette stratégie échoue ou si le nombre de familles étudiées est trop faible, d'autres stratégies sont alors réalisables.

Le séquençage de deux patients éloignés, ou plus, au sein d'une même famille, peut permettre d'identifier un variant causal. Le risque est cependant que le variant causal ne soit pas détecté chez l'un des deux individus séquencés à cause d'un problème technique, comme par exemple une couverture de séquençage trop faible.

Le génotypage et l'analyse de liaison peuvent permettre de focaliser l'analyse de ces données de séquençage haut débit sur des régions restreintes du génome. Cependant, dans des cas de maladies génétiques présentant des défauts de pénétrance, cette approche présente un risque et il parait préférable de se focaliser sur les régions chromosomiques (haplotypes) partagées entre les individus atteints. Différents algorithmes adaptés aux technologies de génotypage haut débit rendent ces stratégies possibles et présentent l'avantage d'une bien meilleure résolution par rapport aux techniques de génotypage classiques basées sur la détection des microsatellites (Han and Abney, 2011a; Abecasis et al., 2002).

Dans le cadre du séquençage haut débit, de nombreux algorithmes de détection de variants se sont développés au cours des dernières années et permettent la détection de variations génétiques de plus en plus complexes. Il est aujourd'hui possible de détecter par exemple la présence de CNV grâce au séquençage haut débit en se basant sur la profondeur de lecture d'une région de l'ADN par rapport à la moyenne de couverture de l'ensemble des parties séquencées. La quantité de données générée par le séquençage haut débit a nécessité le développement d'outils informatiques facilitant son analyse.

D'autres systèmes de capture ont été développés permettant de séquencer simultanément un nombre important de patients sur un grand nombre de gènes candidats. Cette stratégie peut permettre d'évaluer, pour les gènes considérés, l'enrichissement de variants dans une population de patients non reliés entre eux par rapport à une population contrôle. L'analyse statistique de ces données peut permettre d'identifier un gène impliqué dans une pathologie. Par cette approche les

variants rares à effet fort ainsi que les variants peu fréquents à effet modéré peuvent être identifiés.

➤ *Identification de variants fréquents*

Le développement de nouvelles technologies de génotypage a permis depuis les années 2005, grâce au projet HapMap (International HapMap Consortium, 2005), l'émergence des études d'association sur génome entier. Ces études d'association sont basées sur le principe du déséquilibre de liaison : au cours des générations et des méioses successives, un variant fréquent modulateur de risque dans une pathologie va rester porté par le même haplotype que d'autres variants fréquents n'ayant eux aucun impact sur la pathologie (on dit alors que ces variants sont en déséquilibre de liaison). Basé sur ce principe, la détection de plusieurs de ces variants fréquents comme statistiquement liés à une pathologie, permet de mettre en évidence un loci incluant le variant causal.

Au-delà des applications aux pathologies, ces études permettent d'identifier des locus en relation avec une caractéristique donnée, comme par exemple une variation d'un paramètre de l'ECG représenté par une variable quantitative. Les études d'association avaient au départ pour but d'identifier des variants communs pouvant expliquer des maladies communes.

L'interrogation de la base de données PubMed recense environ 2000 occurrences par an pour le terme « Whole Genome Association » depuis 2009 par rapport à un total de 274 entre 2003 et 2008. Ceci nous montre à quel point ces études se multiplient à l'heure actuelle dans la communauté scientifique. L'utilisation des puces récentes permet de génotyper de 500 000 à 1 million de variants fréquents répartis sur l'ensemble du génome ce qui permet d'augmenter la précision de détection de régions régulatrices d'un trait particulier.

Elles constituent sans nul doute une manière innovante d'aborder les mécanismes physiopathologiques des maladies étudiées, révélant des gènes totalement inattendus, ou de fonction inconnue. Mais, dans la plupart des cas, les effets sur le risque individuel (en terme d'odds ratio) sont faibles (l'augmentation du risque n'est souvent que de 20 ou 30 %). Il existe cependant des exceptions comme par exemple, le cas des deux gènes majeurs de prédisposition à la dégénérescence maculaire liée à l'âge, où la présence de 3 ou 4 allèles de prédisposition multiplie le risque de 15 à 50 fois par rapport à une personne ne portant aucun des allèles à risque

(Rivera et al., 2005). Ces observations rendent le lien avec la clinique complexe. Vient alors toute la difficulté des études fonctionnelles permettant d'interpréter ces résultats.

Différentes stratégies sont mises en œuvre pour faciliter l'interprétation de ces données. Les approches eQTL pour « expression quantitative trait loci » permettent, à l'échelle du génome entier d'associer un génotype donné et une variation d'expression des transcrits. Ces études nécessitent d'avoir accès pour chaque individu à un échantillon du tissu considéré de manière à pouvoir en extraire l'ARN. D'autres travaux dédiés à l'étude des régions promotrices, permettent grâce à des expériences de Chip-seq d'identifier des modulations de fixation de facteurs de transcription en présence d'une variation génomique donnée (van den Boogaard et al., 2012).

➤ *Influence de l'environnement*

Outre la cause génétique, l'environnement joue très certainement un rôle dans le déterminisme de la plupart de ces pathologies. L'étude des jumeaux monozygotes demeure l'approche la plus pertinente pour déterminer l'impact du fond génétique de l'environnement sur une maladie (Vanscoy et al., 2007).

Dans le cadre du SBr, une étude basée sur l'étude histologique de biopsies de patients atteints du syndrome a montré la présence dans le cœur, et plus particulièrement dans le ventricule droit, de modifications de la structure du myocarde liées à des phénomènes inflammatoires. Les auteurs évoquent ainsi à partir de ce travail, une implication potentielle de facteurs environnementaux tels l'exposition aux virus. Cependant, d'un point de vue clinique, la majorité des myocardites sont retrouvées dans le ventricule gauche. Dans ce travail, les marquages histologiques mettent également en évidence la présence de remodelages structuraux liés à la fibrose du tissu myocardique (Frustaci et al., 2005).

V. Modèles d'étude de mutations génétiques dans le SBr.

L'utilisation de modèles cellulaires ou animaux dans l'étude de mutations identifiées dans le syndrome de Brugada dépend de la nature du gène impliqué. Dans le cas de situations simples comme la mutation directe d'un canal ionique, les systèmes d'expression hétérologues constituent un modèle d'étude simple et rapide consistant à exprimer le gène d'intérêt dans un vecteur

d'expression avec ou sans la mutation. Cette stratégie permet d'étudier d'une manière focalisée l'effet d'une mutation en étudiant par exemple le courant électrophysiologique par la technique du patch clamp ou encore l'adressage à la membrane par des techniques de biochimie ou d'immunofluorescence. Différents algorithmes ont été créés de manière à simuler l'effet observé de ces variations génétiques sur le potentiel d'action cardiaque puis sur l'électrocardiogramme. Les résultats obtenus par l'étude de systèmes d'expression hétérologues sont à prendre cependant avec précaution compte-tenu de l'ensemble des variables qui diffèrent des modèles *in vivo* et *ex vivo*. Ainsi, les défauts d'adressage membranaire causés par des mutations ne sont pas systématiquement détectés en système d'expression hétérologue comme l'ont montré les études sur les mutations D1275N et 1757InsD du gène *SCN5A* (Watanabe et al., 2011; Remme et al., 2006).

L'étude de modèles animaux invalidés pour un gène d'intérêt, la génération d'une souche animale portant la mutation humaine identifiée, permettent d'étudier à l'échelle intégrée l'effet d'une mutation dans un gène dont le mode de régulation est plus complexe et ne peut être étudié dans un système d'expression hétérologue. L'étude de facteurs de transcription ou encore des protéines impliquées dans un réseau d'interactions complexe nécessite souvent ce genre d'approche. Ces stratégies sont plus coûteuses et surtout plus longues à mettre en œuvre mais constituent souvent un outil indispensable. Chez la souris, le fond génétique semble jouer un rôle crucial sur l'expressivité phénotypique d'évènements arythmiques (Remme et al., 2009; Scicluna et al., 2011). Ces modèles présentent le net avantage de pouvoir étudier le remodelage cardiaque associé au processus de sénescence, paramètre essentiel dans le SBr (van Veen et al., 2005).

Depuis 2007, les laboratoires de recherche ont vu l'essor d'une nouvelle stratégie consistant à induire des cellules pluripotentes (iPSC : Induced Pluripotent Stem Cells) à partir de fibroblastes d'un patient (Takahashi et al., 2007). La différenciation de ces cellules iPS en cardiomyocytes permet de pouvoir travailler directement sur les cellules de patients, prenant ainsi en compte l'ensemble des variations génétiques d'un individu (Zhang et al., 2012). Il est donc possible d'étudier un certain nombre de paramètres électrophysiologiques, biochimiques ou transcriptomiques et de vérifier ainsi l'hypothèse et l'implication de la variation génétique identifiée chez ce patient. Cependant, les cardiomyocytes obtenus par cette stratégie présentent une grande variabilité phénotypique ainsi que des propriétés électriques immatures proches de celles des cardiomyocytes néonataux/embryonnaires.

VI. Objectifs de la thèse

L'objectif de ma thèse a été d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement du SBr en utilisant 3 différentes approches.

➤ *Approche gène candidat et séquençage haut débit de régions ciblées du génome :*

Cette approche vise à identifier un enrichissement de variants rares dans une cohorte de patients atteints de SBr par rapport à la population générale. Pour cette approche, un système de capture dédié a été mis en place, permettant le séquençage de 163 gènes impliqués (ou suspectés de l'être) dans les arythmies cardiaques.

➤ *Approche familiale par séquençage d'exome et identité par descendance :*

Cette approche a pour but d'identifier des variants rares dans de nouveaux gènes impliqués dans des formes familiales de SBr. Vingt familles (dont 13 provenant de la biocollection de l'institut du thorax) ont été sélectionnées selon les critères suivants: (i) Le propositus présente une forme symptomatique de SBr (ii) Présence d'évènements de mort subite familiale (iii) au moins 3 membres atteints par famille (iiii) Absence de variant sur le gène *SCN5A* chez le propositus.

Une stratégie couplant le séquençage des parties codantes du génome (par séquençage d'exome), l'identification de CNV (par hybridation génomique comparative) a été entreprise pour le propositus de chacune des 20 familles. L'identification d'haplotypes partagés entre individus atteints (par génotypage haut débit et calcul d'identité par descendance) a également été effectuée pour chaque famille.

➤ *Etude d'association sur génome entier (GWAS) du syndrome de Brugada:*

Cette stratégie permet de mettre en évidence une association statistique entre des polymorphismes fréquents génétiques et le SBr. L'institut du thorax a coordonné une base de données cliniques

internationale pour rassembler un nombre maximal de cas-index, à travers l'Europe, les Etats-Unis et le Japon. A partir de cette bio-collection, j'ai participé à une étude d'association sur génome entier afin de déterminer si des variations génétiques fréquentes favorisent la survenue d'un phénotype de Brugada.

B. Matériel et méthodes

I.1. Bio-collections utilisées

L'institut du thorax de Nantes est une structure créée en 2004 en partenariat avec le CHU, l'Université de Nantes et l'Inserm. L'institut du thorax est aujourd'hui un centre de recherche reconnu en Europe pour son travail sur la mort subite de l'adulte et des troubles du rythme cardiaque. Grâce au Centre de Référence National pour les maladies rythmiques héréditaires, l'institut a effectué un recrutement très important de patients atteints du syndrome de Brugada : environ 500 cas index atteints de syndrome de Brugada ont été recrutés, pour lesquels une bio-collection d'ADN a été constituée. L'ADN et les enregistrements ECG sont disponibles pour chaque patient, ainsi que leur consentement éclairé (validé par le comité d'éthique local). Chaque patient présente un aspect à l'ECG typique du SBR, validé par deux cliniciens selon les critères consensuels internationaux. Enfin, les antécédents familiaux de SBr sont connus pour chaque cas index. Les projets de recherche décrits dans la partie résultats de ce manuscrit sont basés sur l'exploitation de cette bio-collection qui figure parmi les plus larges au monde pour le SBr.

I.2. Capture et enrichissement des parties codantes du génome

Préalablement au séquençage haut débit, nous avons utilisé la technique « SureSelect in-solution capture protocol » pour capturer les parties codantes du génome. Ce protocole permet de capturer 39.3 Mb de séquences génomiques. Pour cette technique 15 μ g de l'ADN génomique de chaque patient est préalablement dégradé par sonication (Covaris sonicator, Woburn, MA, USA) de manière à obtenir des fragments de 100-400 pb. Le produit de cette dégradation est ensuite quantifié par un Bioanalyser 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), et 7.5 μ L de COT 1 DNA à

100 ng/ μ L. Cette étape permet de masquer les régions répétées du génome. La préparation d'ADN est ensuite lyophilisée dans un vacuum et repris dans 3.4 μ L d'eau ultra pure. 10 μ g du produit d'ADN dégradé est ensuite réparé et une queue poly A est ajoutée aux deux extrémités. Les adaptateurs Illumina permettant la fixation des fragments d'ADN sur la flow cell sont ensuite ajoutés aux extrémités de chaque fragment d'ADN suivant le protocole « Illumina Paired end DNA sample protocol » (San diego, CA, USA).

La purification des fragments compris entre 200 et 300 pb est réalisée en utilisant un système de billes magnétiques SPRI (Solide phase reversible immobilisation). La solution de capture est constituée de sondes ribonucléiques complémentaires de l'ADN génomique. Cette solution contient 5 μ L de mélange de sondes, 1,5 μ L d'eau ultra pure et 6,5 μ L de solution RNase Block afin d'éviter une dégradation des sondes de capture. Pour chaque échantillon, 500 ng de chaque préparation d'ADN est mélangé au mix de capture et placé dans un thermocycler à 65°C pendant 24h. La capture des régions codantes est effectuée en utilisant des billes magnétiques coatées à la streptavidine (Invitrogen, Paisley, UK). Une série de 3 lavages est réalisée et l'ADN est ensuite élué sur colonne grâce au kit Mini Elute column (Qiagen, Hilden, Germany; dans un volume final de 50 μ L d'eau ultra pure.

Une PCR est ensuite réalisée à partir de l'ADN élué grâce à l'ADN polymerase Pfx DNA polymerase (Invitrogen).

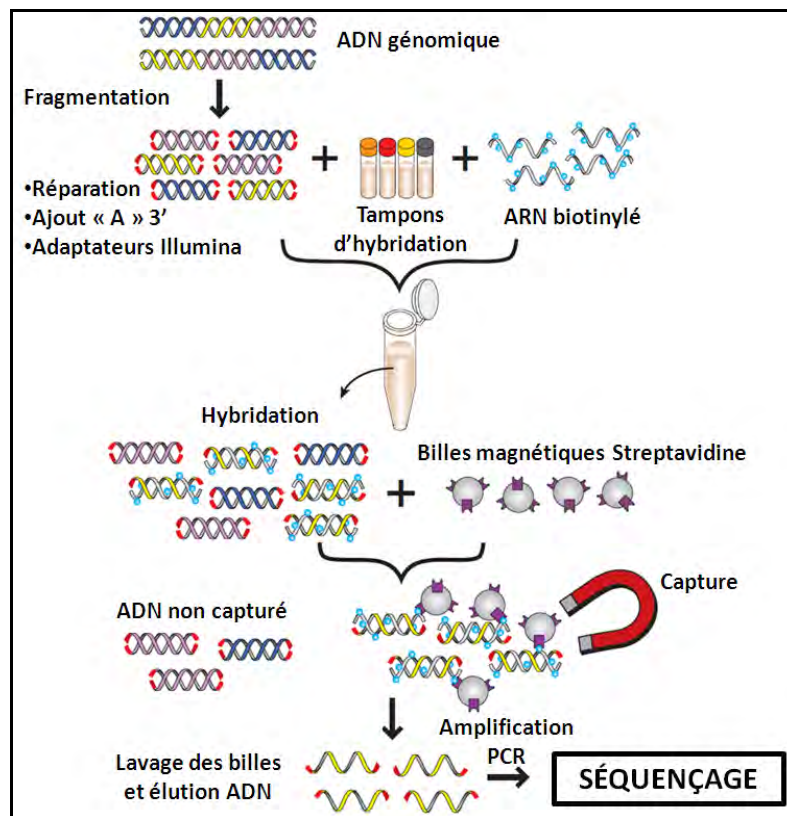


Figure 24 – représentation du principe de capture des régions codantes avant séquençage haut débit.

I.3. Capture et enrichissement des parties codantes de gènes candidats

Les échantillons d'ADN sont tout d'abord digérés par 8 cocktails différents d'enzymes de restriction. Les régions ciblées sont ensuite hybridées par des séquences nucléotidiques biotinyllées conçues de manière à ce qu'elles complètent les fragments d'intérêt aux deux extrémités. Une séquence code barre est ajoutée lors de cette étape. L'addition d'une séquence « code barre » permet de pouvoir identifier par la suite la correspondance entre une séquence et un patient lorsque plusieurs individus sont séquencés sur la même ligne.

L'ADN biotinyllé est ensuite capturé et purifié par une série de rinçage grâce à des billes magnétiques couplées à la streptavidine. L'ADN circulaire résultant est ensuite amplifié par PCR. Les fragments d'ADN compris entre 175 et 625 paires de base sont ensuite purifiés. Une dernière étape de quantification par qPCR, des produits d'ADN avant séquençage, de manière à couvrir les échantillons d'une même ligne de façon homogène.



Figure 25 – représentation des étapes du système de capture et 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.

I.4. Séquençage haut débit - Illumina

Le séquençage haut-débit dans l'approche familiale a été effectué à l'aide d'un séquenceur Solexa GAIIX alors que le séquençage des fragments préparés avec la technologie Haloplex pour l'approche gène candidat a été réalisé à l'aide d'un séquenceur HiSeq 1000. Le principe de fonctionnement de ces deux séquenceurs est globalement le même. Cependant, si le GAIIX ne permettait de séquencer que des fragments de 54pb maximum, le séquenceur HiSeq permet de séquencer des fragments de 100pb.

Les fragments d'ADN sont préparés suivant deux étapes principales (Figure 26):

- Les fragments obtenus sont ensuite réparés dans le cas d'un séquençage d'exome afin d'obtenir des fragments double brin à coupe franche ;
- Des adaptateurs « P5 » et « P7 » sont ensuite ajoutés à chaque extrémité des fragments ainsi qu'un index qui permet d'identifier après séquençage à quel patient appartient le fragment d'ADN.

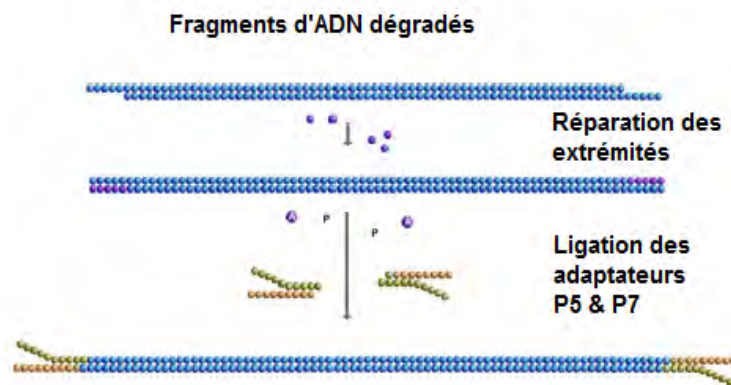


Figure 26 – réparation des brins d’ADN et ajout des adaptateurs « P5 » et « P7 » permettant le séquençage (préparation de la « librairie »)

La « librairie » ainsi produite est ensuite injectée dans une flow-cell (lame de verre sur laquelle va se dérouler le séquençage). 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.

Une étape d’amplification « par ponts » comportant 35 cycles permet ensuite 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 (fig 3). Cette étape va permettre au moment du séquençage de fournir 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. Dans un premier temps, les brins sens sont conservés tandis que les brins anti-sens sont clivés.

L’injection d’une trop grande concentration de la préparation d’ADN peut conduire ensuite au recouvrement des clusters. Dans ce cas, les séquences obtenues ne sont pas utilisables et sont écartées de l’analyse.

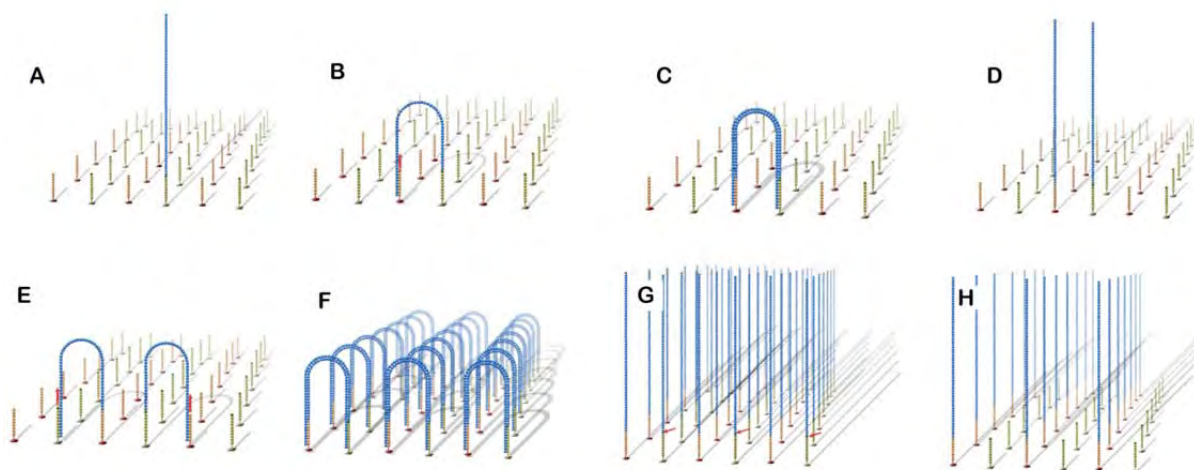


Figure 27 – génération des clusters lors du séquençage Illumina

A- fixation d'un fragment d'ADN sur les sondes complémentaires présentes sur la flow-cell. B- Le fragment P7 ou P5 se fixe à la sonde complémentaire lors du premier cycle. C- synthèse du brin complémentaire fixé à un adaptateur P5 et P7. D- séparation des deux brins sens et anti-sens. E, F – Répétition de cette procédure pendant 35 cycles. G – Clivage des fragments sens à la base des sondes P7 de manière à ne lire uniquement, dans un premier temps, les fragments sens. H – la constitution des clusters est effectuée et le séquençage peut débuter.

L'étape suivante consiste à procéder au séquençage. 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'optimiser la photo instantanée réalisée par la 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 au nucléotide suivant de se fixer. Un nouveau cycle peut ensuite avoir lieu (Figure 28).

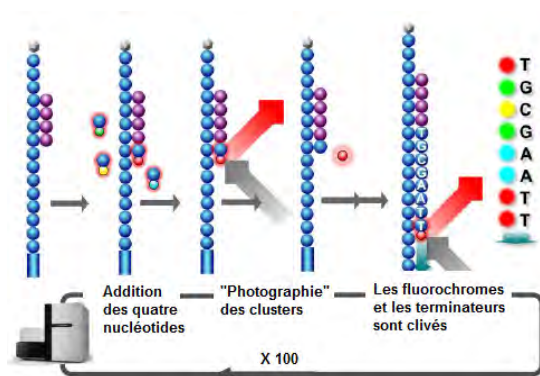


Figure 28 – réaction de séquençage de la technologie Illumina.

Une fois les 100 cycles effectués, dans le cadre d'un séquençage « paired-end », 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 300pb de séquencer 100pb en 3' puis 100pb en 5'.

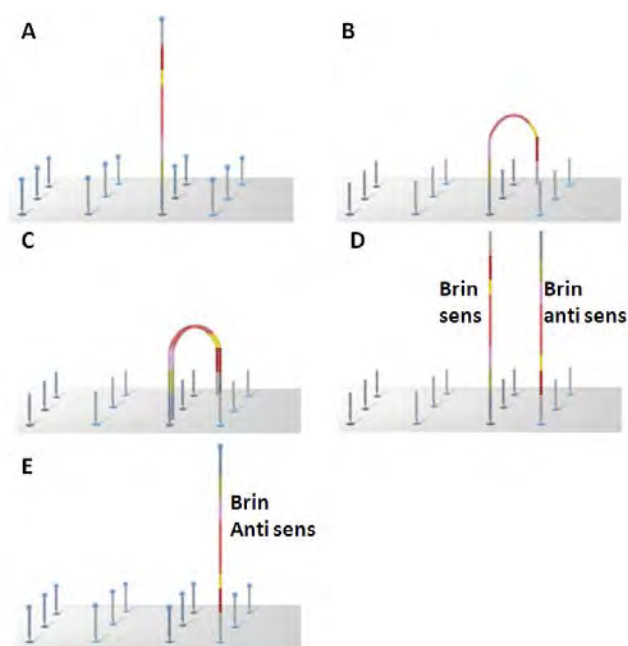


Figure 29 – Etape de « flip-flap » pour le séquençage des brins anti sens par la technologie Illumina (paired-end)

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 P7 se fixe à sa sonde complémentaire. C- le brin complémentaire est synthétisé. D – le brin sens est clivé à la base des adaptateurs P5. E- Seul les brins anti-sens sont présents sur la flow cell permettant de séquencer chaque cluster dans le sens opposé.

Les séquences des 100 pb ainsi obtenues, appelées « reads » sont ensuite alignées sur le génome de référence humain. Cet alignement est facilité par le fait que les reads sont couplés deux à deux (après un run paired-end comme décrit précédemment). On sait en effet que les deux reads d'un couple doivent être alignés relativement proche l'un de l'autre (100-200pb) 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 simplement les bases séquencées et alignées aux bases du génome de référence correspondantes.

I.5. Traitement des données de séquençage

Le séquençage haut débit de chaque individu génère des fichiers FASTQ qui correspondent à un format permettant d'associer une qualité de lecture à chaque séquence nucléotidique. Les fichiers FASTQ sont extraits à l'aide du logiciel CASAVA d'Illumina. Chaque paire de séquence est alignée sur le génome humain (human_g1k_v37.fasta) grâce à l'outil BWA qui annote également la qualité de chaque alignement. Lorsque la fragmentation du génome est réalisée avant séquençage, 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 duplons. 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, ce paramètre doit être enlevé.

Les données de sortie sont alors redirigées vers Samtools pour produire un fichier BAM qui est un fichier compressé, indexé des positions chromosomiques. Les reads BAM sont réalignés autour des insertions / délétions spécifiquement dans les régions capturées (dans le cas d'une capture préalable). Les reads identifiés comme dupliqués sont ensuite annotés avec Picard / MarkDuplicates. Une re-calibration des reads BAM est ensuite effectuée grâce à GATK.

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 produite par BWA est également un paramètre à prendre en compte lors du contrôle qualité du séquençage.

La détection des variants est réalisée grâce aux deux algorithmes Samtools (Li et al., 2009) et GATK (McKenna et al., 2010) et un fichier VCF est généré (Danecek et al., 2011). Les fichiers VCF, pour « Variant Calling Format » sont des fichiers table regroupant sur chaque ligne les informations relatives à la position et à la nature du changement de chaque variant. Ces fichiers VCF sont ensuite annotés en utilisant la base VEP pour « Variant Effect Predictor ». Cette

annotation permet d'ajouter un certain nombre d'informations comme l'effet du changement nucléotidique sur la séquence protéique ou encore la prédiction de l'effet délétère de la variation. Ces fichiers VCF sont ensuite annotés avec les données du projet 1000 Genomes et du projet EVS pour « Exome Variant Server » de manière à avoir directement la fréquence de chaque variation génétique dans la population générale. Ces fichiers sont également annotés avec les scores de conservation GERP pour « Genomic Evolutionary Rate Profiling ». Ces scores donnent une idée de la conservation nucléotidique inter-espèce et peuvent être un outil potentiel dans la priorisation de variant (Pollard et al., 2010).

Le traitement des données HaloPlex est similaire, à l'exception de certaines étapes liées à la spécificité de la technique. Une étape supplémentaire consiste à éliminer avant l'alignement les séquences correspondant aux adaptateurs haloplex. Du fait de l'utilisation d'enzymes de restriction, un grand nombre de reads s'alignent exactement au même endroit sur le génome. En conséquence, l'étape consistant à annoter les reads dupliqués grâce à Picard / MarkDuplicates a été retirée. D'autre part, lors de l'étape de détection des variants, l'algorithme Samtools écarte de l'analyse les reads couverts plus de 200 fois. Cette étape a également été écartée, car certaines régions génomiques peuvent présenter une profondeur de lecture de plus de 1000X dans la technologie haloplex. Une dernière particularité est que malgré le fait que le séquençage soit réalisé en « paired-end », de nombreux reads ne sont lus que dans un sens. Le paramètre de Samtools ne considérant que les reads sens et anti-sens a donc également été retiré.

I.6. Visualisation des alignements

L'outil IGV (Integrative Genome Viewer) permet de visualiser l'alignement des séquences à un endroit donné du génome. Cette étape permet avant validation capillaire de faire une présélection des variants de manière à écarter les faux positifs (Figure 30).

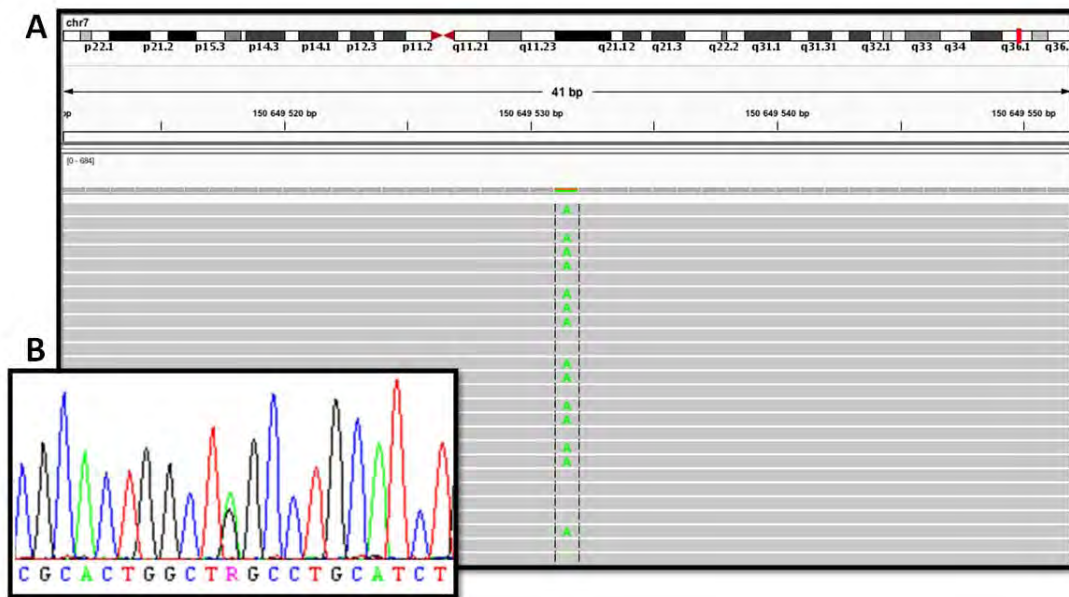


Figure 30 – Exemple de visualisation d’un variant détecté en séquençage haut débit grâce à l’outil IGV

A – Visualisation du variant G>A dans l’outil IGV. B – Électrophoregramme confirmant la présence du variant après séquençage capillaire.

I.7. Séquençage capillaire

La validation des variants a été réalisée par séquençage capillaire comme décrit dans le matériel et méthode de l’article 2 (A gain-of-function mutation in the voltage-gated K^+ channel beta-2 subunit is associated with Brugada syndrome).

I.8. Protocole de détection de réarrangements génomiques

La méthode de CGH-array (hybridation génomique comparative sur puce à ADN) consiste à détecter des réarrangements chromosomiques appelés CNV (copy number variation) qui sont des délétions ou des duplications de régions du génome d’une taille supérieure à 1 kb.

Cette méthode est basée sur l’utilisation de puces contenant un nombre important de sondes d’ADN complémentaires de l’ADN génomique. Ces sondes sont réparties de manière à couvrir l’ensemble du génome et sont enrichies dans les régions codantes. L’ADN du patient est marqué à

la cyanine 5 alors que l'ADN contrôle est marqué à la cyanine 3. Ces deux fluorochromes ayant une longueur d'onde d'émission différente il est possible de détecter spécifiquement, l'intensité du signal émis par permet d'évaluer le rapport d'hybridation de l'ADN du patient par rapport à celui du contrôle. Ainsi, il est possible de détecter une duplication ou une délétion d'un fragment d'ADN entre ces 2 ADN (Figure 31).

Dans cette étude, nous avons utilisé comme contrôle un pool d'ADN grâce à une collaboration avec l'Etablissement Français du Sang. Etant à la recherche de CNV rares dans ces études, l'utilisation d'un pool d'ADN permet de lisser le profil observé au niveau des CNP fréquents et ainsi de diminuer le bruit de fond. D'autre part, après détection des CNV, les remaniements chromosomiques fréquents détectés dans les bases de données sont écartés. Dans ces études, nous avons utilisé des CGH-array 1M (Agilent), présentant 1 million de sondes distribuées sur l'ensemble du génome et enrichies dans les régions codantes. L'outil de visualisation utilisé a été développé dans notre équipe par P.Lindenbaum.

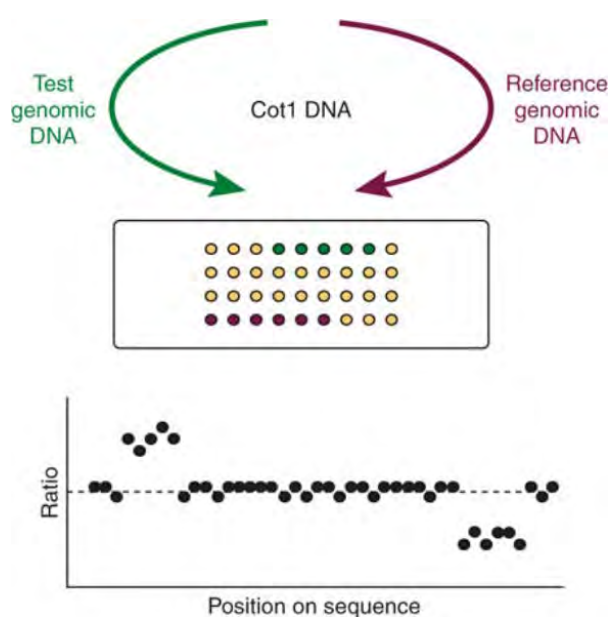


Figure 31 – principe de la détection de variations génomique par CGH-array

L'ADN de référence (Reference genomic DNA) et l'ADN du patient (test genomic DNA) sont marqués avec des fluorophores différents (Cy5 et Cy3), et hybridés aux puces (« arrays ») après blocage des éléments répétés avec l'ADN COT-1. Après l'hybridation, le ratio de fluorescence Cy3: Cy5 est déterminé et révèle les variations de nombre de copies présentes dans l'ADN du patient par rapport à l'ADN génomique de référence (*Fiegler et al., 2007*).

I.9. Génomage haut débit

Le génomage haut débit a été effectué sur puces *Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1*, comme décrit dans le matériel et méthodes de l'article 3 (Common variants at *SCN5A-SCN10A* and *HEY2* are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death).

I.10. Analyses de liaisons paramétriques et non paramétriques

Dans les études familiales de ce travail, un des objectifs a été d'identifier les haplotypes partagés entre individus atteints de manière à focaliser l'analyse du séquençage haut débit dans ces régions. Nous avons utilisé la plateforme de génomage haut débit *Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU1*, permettant de génotyper chaque individu pour 600 000 SNPs simultanément. Le contrôle qualité réalisé sur ces données de génomage est décrit dans le matériel et méthode de l'article 3. Cette stratégie de génomage, par rapport à une stratégie de génomage par microsatellite, est avantageuse au niveau du coût et du temps mais permet également d'obtenir une meilleure résolution des intervalles chromosomiques. A partir de ces données de génomage, deux types de stratégies ont été mises en œuvre : 1) l'analyse paramétrique, permettant de calculer un score de liaison en incluant différents paramètres, comme le mode de transmission ou le score de pénétrance; 2) l'analyse non paramétrique permet, lorsque seuls les individus atteints sont comparés, de s'affranchir des paramètres liés à des problèmes de pénétrance ou de labilité phénotypique.

➤ *Analyse de liaison non paramétrique – identité par descendance*

La stratégie d'identité par descendance consiste à identifier chez des individus, des allèles identiques provenant d'un ancêtre commun.

Un algorithme (IBDL- Identity By Descent Linkage Disequilibrium) permettant le calcul des probabilités d'identité par descendance (IBD) à partir de données de génomage haut débit a été utilisé dans le cadre des analyses familiales de ce travail (Han and Abney, 2011).

L'algorithme IBDL a pour principale spécificité de conserver l'ensemble des marqueurs SNPs sélectionnés dans l'évaluation du statut IBD. Ce paramètre permet d'augmenter la résolution de

l'analyse par rapport à d'autres algorithmes nécessitant la création de groupes de SNPs, chaque groupe se trouvant en équilibre de liaison.

La présélection des SNPs a été réalisée de façon à récupérer les SNPs fréquents à plus de 10% et d'écarter ceux présentant un fort déséquilibre de Hardy Weinberg.

Une autre particularité de cet algorithme est que la probabilité de statut IBD est évaluée par paire d'individus ce qui accélère considérablement le temps de calcul et permet d'effectuer l'analyse sur de grandes familles.

Les auteurs signalent qu'il est préférable d'intégrer à l'analyse soit les données de déséquilibre de liaison entre chaque SNP, soit les fréquences observées des SNP dans une large population. L'objectif étant d'inférer le calcul statistique d'un état, pour un locus entre deux individus. En effet, une population de référence permet d'estimer les liens entre les marqueurs et de mieux modéliser l'effet des SNP adjacents sur l'estimation de l'IBD.

Cet algorithme présente plusieurs options d'utilisation et seule l'alternative LD-RR a été utilisée car elle présente une meilleure estimation du statut IBD entre individus. Le principe de calcul se base sur les informations de déséquilibre de liaison entre chaque SNP et une probabilité est attribuée pour chaque SNP en fonction de 20 SNPs présents dans un intervalle de 2 cM autour du SNP considéré. La probabilité ainsi calculée est ensuite corrigée par la probabilité de partage de régions d'ADN entre deux individus en fonction de leur relation familiale.

Trois probabilités sont calculées pour chaque paire d'individus :

- Probabilité d'être IBD=0, correspondant à l'absence de partage d'un haplotype.
- Probabilité d'être IBD=1, correspondant au partage d'un haplotype entre deux individus. Un géniteur et sa descendance partageront un haplotype sur l'ensemble de leurs génomes.
- Probabilité d'être IBD=2, correspondant au partage de deux haplotypes entre deux individus. Le partage de 2 haplotypes entre 2 individus n'est possible que dans une fratrie.

Les résultats sont analysés grâce à IBD-FRAME, un logiciel développé par l'ingénieur bio-informatique de l'équipe. Cet outil permet à des biologistes de pouvoir analyser les données brutes issues du calcul par l'algorithme IBDLD.

La principale stratégie d'analyse utilisée dans ce travail a consisté à considérer les régions présentant une probabilité très faible d'être IBD=0 entre individus d'une même famille. Indirectement, cette méthodologie permet de se focaliser sur les régions IBD=1 et IBD=2.

L'analyse consiste à fixer un seuil de 0,2 de la probabilité IBD=0 pour chaque paire d'individu. Les positions chromosomiques associées à ces probabilités IBD=0 <0,2 correspondent donc à des régions IBD=1 ou IBD=2 (lorsque deux individus d'une fratrie sont comparés) entre 2 individus.

Le programme IBD frame, permet ensuite de générer un graphique (Manhattan plot) représentant le nombre de compte de paires d'individus présentant une IBD=1 ou IBD=2, pour chaque position associée à un SNP (Figure 32).

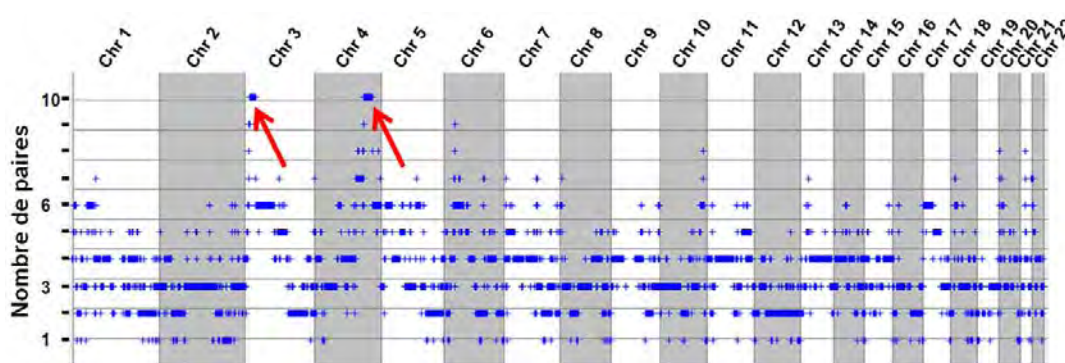


Figure 32 – Visualisation des haplotypes partagés entre individus atteints

Les intervalles chromosomiques partagés par l'ensemble des individus atteints sont symbolisés par une flèche rouge. Dans cet exemple, le génotype de 5 individus est comparé 2 à 2. Un score de dix paires est obtenu lorsqu'un haplotype est partagé parmi les 5 individus sélectionnés.

L'outil IBD-frame, permet d'associer la couleur verte dans les régions dépassant le seuil d'IBD=0 <0,2 et la couleur rouge aux régions présentant une probabilité d'IBD=0 >0,2. Ainsi, lorsqu'à un locus donné, l'ensemble des cases comparant les probabilités d'IBD entre paires d'individus sont vertes, cela correspond au partage entre chaque individu d'au moins un haplotype.

En plaçant un curseur dans cette région, une option permet d'obtenir les intervalles chromosomiques d'intérêt en délimitant les régions télomériques et centromériques à la première valeur d'IBD=0 atteignant la valeur seuil de 0,95.

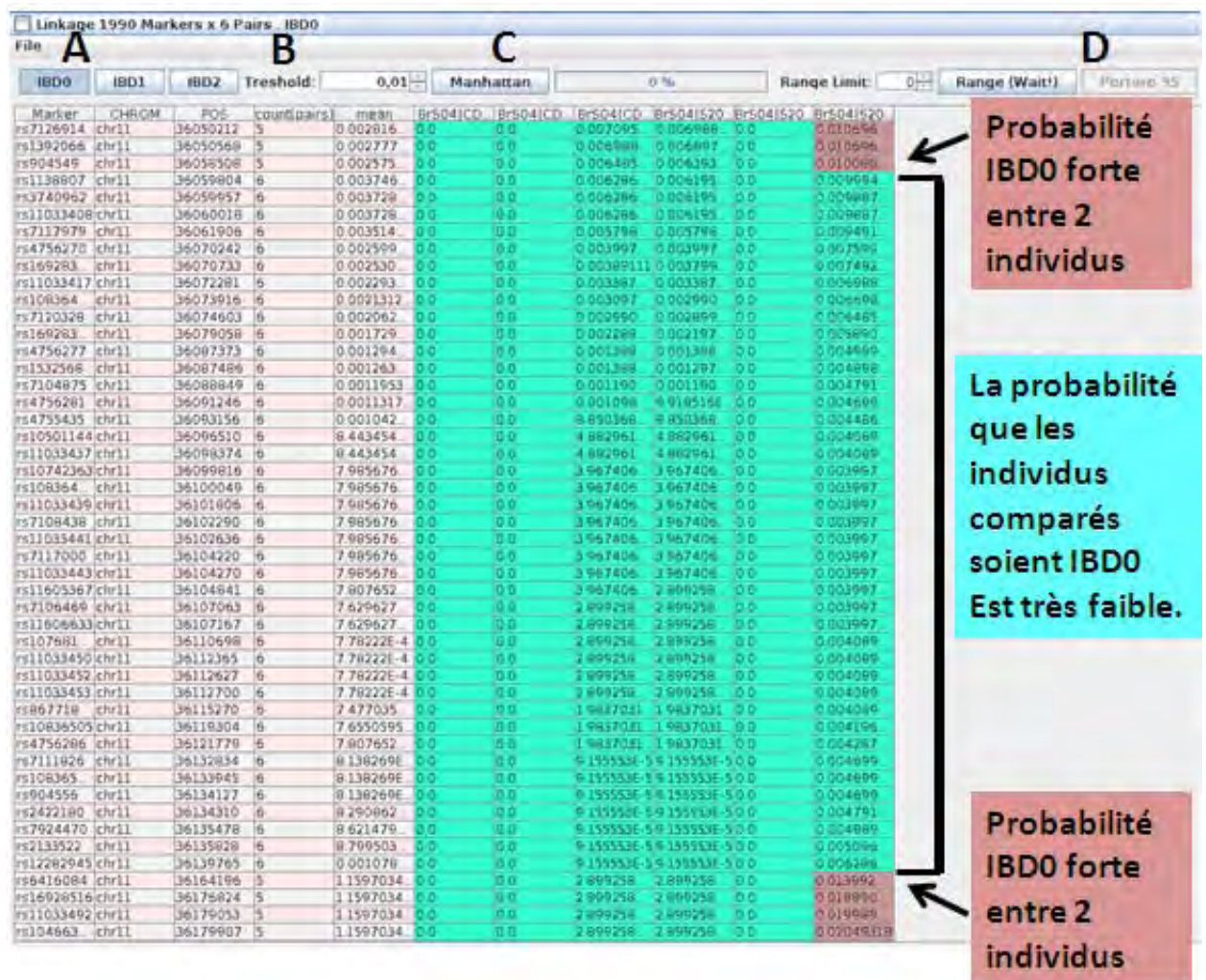


Figure 33 – représentation de l'interface d'utilisation du programme IBD-frame

A – choix de l'apparition des probabilités selon le taux de partage entre individus (IBD=0, IBD=1, IBD=2). B- Seuil de probabilité au-delà duquel on rejette l'hypothèse de départ. Dans l'exemple ci-dessus, on souhaite connaître les régions partagées entre tous les individus. On s'intéresse donc aux probabilités fortes de ne pas être IBD=0 (zones vertes). Lorsque pour une paire d'individus comparés on dépasse le seuil, cela signifie qu'il y'a eu recombinaison chez un des deux individus. La comparaison avec les autres membres de la famille permet de déduire l'individu délimitant les régions partagées. C- Le programme permet la génération d'un graphique (Manhattan plot) représentant le nombre de paires d'individus homologues comparés selon les seuils de probabilité choisis. D- L'option « Portero 95 » permet, lorsqu'on place son curseur dans une zone partagée entre individus (zone verte) de donner les positions chromosomiques en amont et en aval atteignant une probabilité de 0,95 de considérer l'hypothèse IBD0 comme vraie.

➤ *Analyse de liaison paramétrique*

L'approche paramétrique prend en compte différents éléments : le modèle génétique de la maladie (mode de transmission dominant ou récessif, fréquence de l'allèle morbide, pénétrance, taux de phénocopies), les informations spécifiques à chaque famille (structure du pedigree, statut phénotypique des individus, génotypes), et les fréquences alléliques des marqueurs génotypés.

La liaison entre un haplotype et un phénotype s'exprime en LOD score (*logarithm of odds*, Z), et correspond au logarithme décimal du rapport de la vraisemblance de la liaison sur celle de la non-liaison entre deux loci, tel qu'introduit par Morton (Morton, 1955).

Le *LOD score* en θ est : $Z(\theta) = \log_{10} [L(\theta) / L(0,5)]$ avec $0 \leq \theta \leq 0,5$.

Traditionnellement, on considère un marqueur significativement lié au locus morbide si Z est supérieur à 3 (1 000 chances sur 1 de liaison), et non lié si Z est inférieur à -2. Entre ces deux valeurs, le *LOD score* n'est pas significatif. Cependant, à l'échelle d'une famille de taille modeste, les haplotypes présentant une valeur maximale de *LOD score*, bien que non significatifs, peuvent être considérés. Cette stratégie revient à considérer les haplotypes les plus vraisemblablement liés à la pathologie.

Spécifiquement dans l'étude familiale SBr17, nous avons utilisé l'algorithme MERLIN (Abecasis et al., 2002) pour déterminer les régions chromosomiques corrélant avec le phénotype atteint. L'étape de découverte dans cette étude familiale ayant été effectuée grâce à IBDLD, l'utilisation de cet algorithme a eu pour but de réduire l'ampleur des haplotypes à considérer dans l'analyse d'exome de cette famille.

Contrairement à l'algorithme IBDLD, MERLIN évalue le statut en prenant en compte le génotype de tous les individus d'une famille en même temps. Cette spécificité technique, rend difficile l'analyse de grandes familles et il est nécessaire de créer des sous groupes. Compte-tenu de la taille variable des 13 familles SBr étudiées, ce paramètre rendait contraignante l'analyse d'identité par descendance par l'algorithme MERLIN.

Une autre spécificité de l'algorithme MERLIN est qu'il est nécessaire, contrairement à IBDLD, de générer des sous-groupes de SNP se trouvant en déséquilibre de liaison. Les sous groupes de SNP se trouvent en équilibre de liaison les uns par rapport aux autres et sont répartis sur l'ensemble du génome. Cette étape permet artificiellement de générer des marqueurs présentant une informativité suffisante pour pouvoir reconstituer les haplotypes. Une fois les sous groupes de

SNP constitués pour chaque individu, l'analyse paramétrique est effectuée par l'algorithme MERLIN.

A l'échelle de grandes familles il est probable que des régions de très petite taille puissent être manquées par l'utilisation de cette méthode. C'est une des raisons pour lesquelles l'algorithme MERLIN n'a pas été utilisé pour l'ensemble des familles.

I.11. Enregistrement du courant I_{to} par la technique du patch clamp

➤ *Protocole de transfection du canal Kv4.3 et de la sous unité Kvβ2*

Les cellules COS-7, obtenues à partir de la collection américaine CRL-1651 sont cultivées en milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal en présence d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine). Les cellules sont transfectées avec 2 µg total d'ADN plasmidique complexé à l'agent transfectant JET-PEI (polyplus). La transfection est réalisée dans une plaque 6 puits lorsque les cellules atteignent approximativement 60-80% de confluence. L'agent transfectant mélangé à l'ADN plasmidique reste en contact 8 heures avec les cellules avant décollement, isolement, dilution et ensemencement dans des boîtes de pétri de 36 mm.

Pour la caractérisation électrophysiologique du variant Kvβ2-R12Q, le mélange plasmidique est le suivant : Kv4.3 (pCMV6; KCND3-NM_004980.3; 100 ng) ; Kvβ2 (pCMV6; KCNAB2-NM_003636.2, WT ou R12Q; 500 ng) et GFP (1400 ng). Pour la caractérisation biochimique, de manière à obtenir un signal suffisamment élevé, la quantité plasmidique a été augmentée à 666 ng pour Kv4.3 et 1333 ng pour Kvβ2. La GFP n'a pas été utilisée pour les expériences de biochimie.

➤ *Enregistrement des courants ioniques en Patch-Clamp*

L'étude électrophysiologique de l'influence du variant Kvβ2-R12Q sur le courant I_{to} a été réalisée en configuration «cellule entière». Elle permet d'enregistrer l'ensemble des courants de la cellule. Cette technique consiste à poser la pointe d'une pipette en verre, dont l'extrémité a un diamètre d'environ 1 µm, sur une membrane cellulaire de telle sorte que le contact pipette/membrane soit électriquement très résistant. Ce contact est augmenté par une légère aspiration exercée à l'intérieur de la pipette. Lorsque la résistance du contact atteint le gigaOhm,

le contact est alors appelé "giga-seal". Cette très grande résistance permet une isolation électrique parfaite de l'ensemble pipette-cellule. Pour la configuration «cellule entière», le fragment de membrane isolé sous la pipette est rompu par aspiration. Après rupture de la membrane, la résistance entre le milieu intra-pipette et le milieu intracellulaire diminue, permettant l'accès électrique au milieu intracellulaire. Le potentiel de membrane est alors imposé et les courants transmembranaires sont enregistrés entre l'électrode placée dans la pipette et celle de référence dans le bain, à l'aide d'un amplificateur de patch-clamp (AxoPatch 200A, Axon Instruments) relié à un ordinateur et en utilisant le logiciel d'acquisition et d'analyse Acquis-1 (Bio-Logic).

➤ *Le courant potassique Ito*

Le courant Ito est potentiel dépendant et s'active pour des potentiels supérieurs à -40 mV. Lors d'une dépolarisation membranaire, ce courant s'active rapidement puis s'inactive. La séquence de stimulation comprend une phase de dépolarisation d'une durée de 1000 ms allant de -70 mV à +60 mV avec une incrémentation de 10 mV. Sont mesurées l'amplitude du courant à -80 mV, l'amplitude du courant maximum à la fin de chaque dépolarisation. Le courant ainsi mesuré exprimé en pA est divisé par la capacitance membranaire exprimée en pF (proportionnelle à la taille de la cellule), permettant d'obtenir la densité de courant. L'ensemble des densités de courants enregistrés dans les différentes conditions permettent de constituer la courbe I/V caractérisant pour chaque condition le courant en fonction du voltage imposé. Ces enregistrements permettent également de constituer la courbe d'activation.

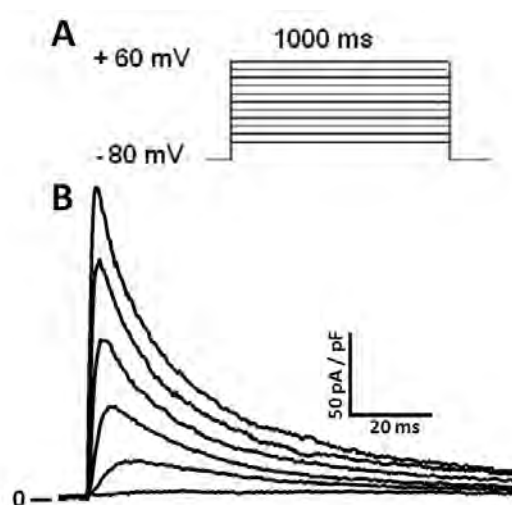


Figure 34 : Séquence de stimulation et courant Ito résultant.

A – Représentation du protocole de stimulation. B – Tracé obtenu lors du protocole d’activation à partir d’une cellule COS-7 dans les conditions de transfection décrites ci-dessus.

➤ **La courbe d’inactivation**

Le protocole utilisé afin d’évaluer la disponibilité des canaux en fonction du potentiel est le suivant : un prépulse allant de -100 mV à +20 mV avec un incrément de 10 mV ; Fréquence de stimulation : 1/4 Hz. Ce dernier est suivi d’une deuxième phase de dépolarisation ou test pulse à +60 mV ou pulse. Entre deux séquences, le potentiel est maintenu à -100 mV. La durée du prépulse est de 1000 ms et celle du pulse de 500 ms (Figure 35). Les paramètres $V_{1/2}$ d’inactivation et k sont calculés par régression non-linéaire de la courbe de disponibilité selon la fonction de Boltzman.

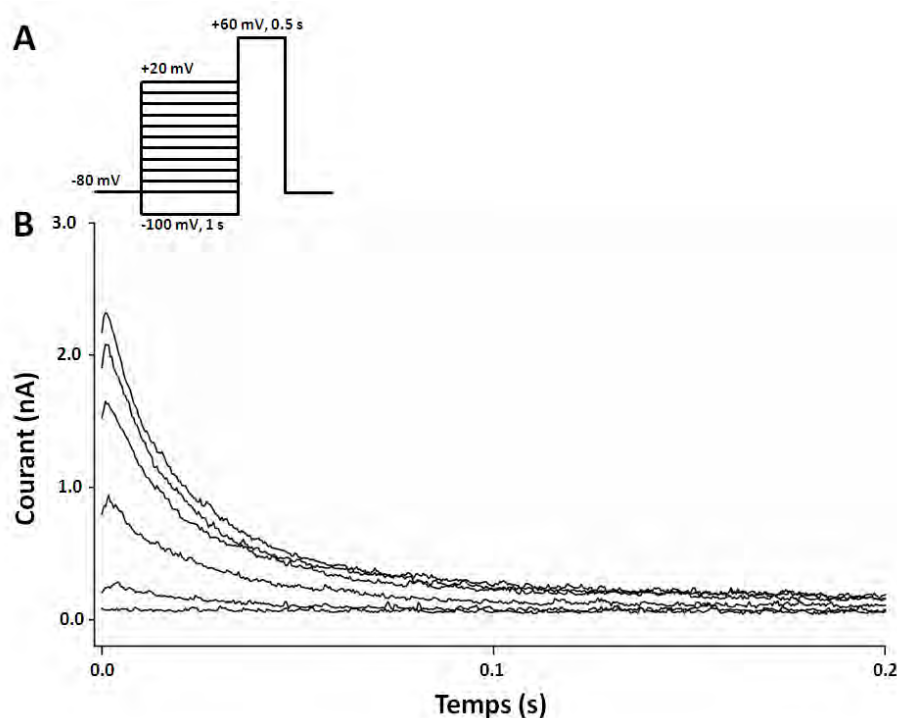


Figure 35 - Protocole de stimulation permettant l’estimation de l’inactivation.

A – Représentation d’inactivation. B – Tracé obtenu lors du protocole d’inactivation à partir d’une cellule COS-7 dans les conditions de transfection décrites ci-dessus.

➤ *La levée d'inactivation ou réactivation*

L'étude de la levée d'inactivation permet de caractériser le temps nécessaire au canal pour passer de l'état inactivé à l'état fermé. La levée d'inactivation des canaux est évaluée en utilisant une séquence de stimulation comprenant un pré-pulse allant de -80 à +60 mV d'une durée de 1000 ms, suivie d'un test pulse à +60 mV avec une durée d'inter-pulse variable entre les 2 stimulations ($\Delta t = 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 500, 1000, 2000$ ms). A partir de ces données, la constante de temps (τ) est calculée à partir d'une équation mono exponentielle.

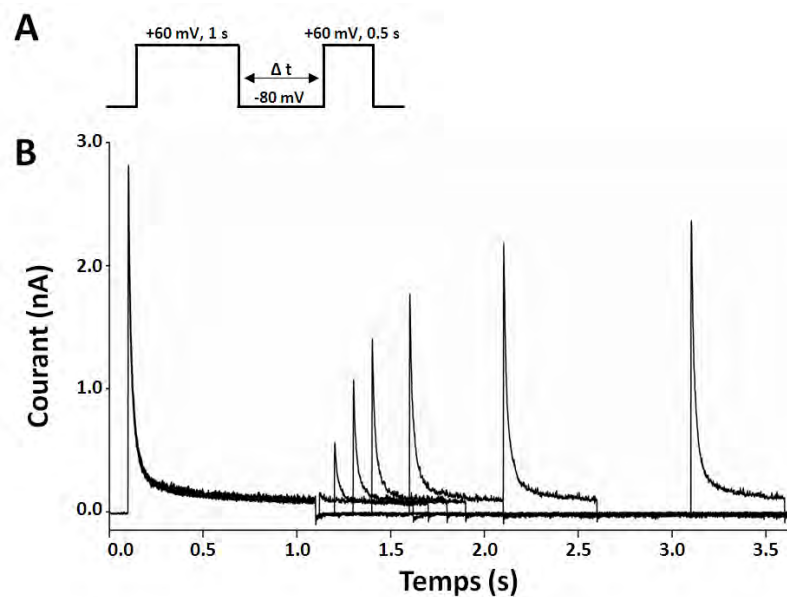


Figure 36 : Protocole de stimulation permettant l'estimation de la levée d'inactivation.

A - La levée d'inactivation des canaux est évaluée en utilisant une séquence de stimulation comprenant un pré-pulse allant de -80 à +60 mV d'une durée de 1000 ms, suivie d'un test pulse à +60 mV avec une durée d'inter-pulse variable entre les 2 stimulations. B – Tracé obtenu lors du protocole de levée d'inactivation à partir d'une cellule COS-7 dans les conditions de transfection décrites ci-dessus.

I.12. Etude de la fraction protéique membranaire

La technique de biotinylation des protéines membranaires est utilisée afin de quantifier l'expression de la protéine Kv4.3 à la membrane de cellules COS-7. Les cellules à confluence

sont rincées avec du PBSCM puis incubées avec de la biotine couplée à un groupement ester sulfonique par un pont disulfure (sulfo-NHS-SS-biotine, thermo scientific) diluée dans le PBSCM à 0,5 mg/mL pendant 30 minutes à 4°C sous agitation douce. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS contenant 200 mM de glycine, trois fois dix minutes. Puis, les cellules sont lysées, centrifugées et dosées selon le même protocole que le Western blot. 1.5 mg de lysat protéique est incubé avec 50µL de streptavidine couplée à des billes d'agarose (thermo scientific) pendant une nuit à 4°C et sous agitation. Les protéines biotinylées liées à la streptavidine sont purifiées par centrifugation (1000 rpm, 1 minute) et lavées avec le tampon de lyse utilisé précédemment. Cette étape est répétée 4 fois en alternant les tampons de lyse contenant 150 mM et 500 mM de NaCl. Les protéines biotinylées ainsi précipitées sont dénaturées 30 minutes à 64 température ambiante dans un tampon contenant :4% de SDS, 20% de glycérol, 200 mM de DTT, 145 mM de tris pH6.8 et une pointe de bleu de bromophénol.

I.13. Co-Immunoprécipitation dans les cellules COS-7

Quarante-huit heures après transfection, les cellules COS-7 sont rincées deux fois avec du PBS 1X pH 7.4 puis lysées dans le tampon de lyse contenant 20 mM d'HEPES, 0,5 % d'amidosulfobetaine-14 (ASB-14, Sigma), 150 mM de NaCl, des inhibiteurs de protéases (1X, Roche), 1 mM de PMSF (Interchim), 0,7 µg/mL de pepstatine A (Thermo Scientific) et des inhibiteurs de phosphatases (1X, Thermo Scientific). Après 15 min d'agitation à 4°C, les lysats cellulaires sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min, puis les surnageants sont récupérés. Les protéines sont dosées à l'aide du kit *BCA Protein Assay Kit* (Pierce).

Pour les immunoprécipitations, les lysats cellulaires ont été incubés pendant 2 h à 4°C avec 25 µL de billes magnétiques (*Dynabeads Protein G*, Invitrogen) préalablement couplées à 6 µg d'anticorps polyclonaux anti-Kv4.3 (RbαKv4.3 ; Alomone Labs). Les billes ont ensuite été lavées trois fois dans du tampon de lyse, et les complexes protéiques ont été élués avec du *XT Sample Buffer* 1X (Biorad) supplémenté en DTT (100 µM) pendant 10 min à 60°C. Les lysats protéiques totaux ainsi que les fractions immunoprécipitées sont enfin analysés par Western blot.

I.14. Western-blot

Les échantillons protéiques sont repris dans 1X de *XT Sample Buffer* (Biorad) contenant du DTT (100 µM), dénaturés pendant 5 min à 60°C, puis les protéines sont séparées sur gel d'acrylamide.

Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose à l'aide du TransBlot[®] Turbo[™] (Biorad), et la membrane est saturée pendant 1 h dans 5% de lait dans du PBS-Tween 0,1%. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C ou à température ambiante pendant 1 h selon les anticorps utilisés. L'anticorps polyclonal anti-Kv4.3 (RbαKv4.3, Alomone labs) a été utilisé au 1:200^{ème}. L'anticorps monoclonal anti-Kvβ2 (MαKvβ2, Origene) a été utilisé au 1:1000^{ème} et l'anticorps monoclonal anti transferrine (MαTfR ; Invitrogen) au 1:10000^{ème}. Après trois rinçages de 10 min avec du PBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée 1 h avec un anticorps secondaire, couplé à la *HorseRadishPeroxidase*, dirigé contre les anticorps de lapin ou de souris. Pour l'analyse des immunoprécipitations et des Western blot réalisés avec l'anticorps RbαDsRed, le kit *Clean-Blot IP Detection Reagent* (Thermo Scientific) a été utilisé de façon à éviter la détection des chaînes lourdes et légères des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation. Après trois nouveaux rinçages avec du PBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée avec du réactif *ECL plus (ElectroChemiLuminescence Plus*, Amersham) pendant 5 min, puis les signaux de chemiluminescence sont révélés à l'aide de l'appareil ImageQuant RT ECL (GE Healthcare). L'intensité des bandes détectées est ensuite évaluée grâce au logiciel ImageJ.

C. Résultats

I. PROJET 1 : Développement d'un outil pour l'interprétation des données de séquençage haut débit (article 1)

L'ampleur des données générées par les technologies de séquençage haut débit rend l'analyse compliquée pour les personnes ne maîtrisant pas les lignes de commandes UNIX. Ainsi, l'étape d'analyse est souvent déléguée aux bio-informaticiens. La création d'un outil facilement abordable devient nécessaire compte-tenu du nombre croissant de laboratoires de recherche et de diagnostic utilisant ces technologies.

Depuis 2010, plusieurs outils ont été créés au laboratoire en collaboration entre les biologistes et les bio-informaticiens, mais ces outils nécessitaient le développement de nouvelles fonctionnalités lorsqu'une nouvelle hypothèse à tester n'était pas permise par le logiciel en question.

Nous avons en particulier créé Knime4Bio, une suite de modules personnalisés pour l'interprétation de larges jeux de données NGS, et démontré que cet outil permet d'identifier efficacement et rapidement les mutations responsables de maladies (Lindenbaum et al., 2011). Knime4Bi constitue une extension du logiciel KNIME (The Konstanz Information Miner).

Cet outil permet sous la forme d'interface graphique (nœuds) de générer des lignes de commandes spécifiques et adaptées à l'analyse du séquençage haut débit. Il est ainsi possible de charger et de traiter des fichiers de taille importante sans maîtriser les langages informatiques.

L'ensemble des personnes, au sein de notre laboratoire, travaillant sur des données de séquençage haut débit utilisent aujourd'hui ce logiciel.

Article 1: Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing with KNIME

(Bioinformatics. 2011 Nov 15;27(22):3200-1.)

Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME†

Pierre Lindenbaum¹, Solena Le Scouarnec², Vincent Portero¹ and Richard Redon^{1,*}

¹Institut du thorax, Inserm UMR 915, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, 44000 Nantes, France and

²The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK

Associate Editor: John Quackenbush

ABSTRACT

Summary: Analysing large amounts of data generated by next-generation sequencing (NGS) technologies is difficult for researchers or clinicians without computational skills. They are often compelled to delegate this task to computer biologists working with command line utilities. The availability of easy-to-use tools will become essential with the generalization of NGS in research and diagnosis. It will enable investigators to handle much more of the analysis. Here, we describe Knime4Bio, a set of custom nodes for the KNIME (The Konstanz Information Miner) interactive graphical workbench, for the interpretation of large biological datasets. We demonstrate that this tool can be utilized to quickly retrieve previously published scientific findings.

Availability: <http://code.google.com/p/knime4bio/>.

Contact: richard.redon@univ-nantes.fr

Received on August 11, 2011; revised on September 13, 2011; accepted on September 29, 2011

1 INTRODUCTION

Next-generation sequencing (NGS) technologies have led to an explosion of the amount of data to be analysed. As an example, a VCF (Danecek *et al.*, 2011) file (Variant Call Format—a standard specification for storing genomic variations in a text file) produced by the 1000 Genomes Project contains about 25 million Single Nucleotide Variants (SNV), [<http://tinyurl.com/ALL2of4intersection> (retrieved September 2011)], making it difficult to extract relevant information using spreadsheet programs. While computer biologists are used to invoke common command line tools—such as Perl and R—when analysing those data through Unix pipelines, scientific investigators generally lack the technical skills necessary to handle these tools and need to delegate data manipulation to a third party.

Scientific workflow and data integration platforms aim to make those tasks more accessible to those research scientists. These tools are modular environments enabling an easy visual assembly and an interactive execution of an analysis pipeline (typically a directed graph) where a node defines a task to be executed on input data and an edge between two nodes represents a data flow. These applications provide an intuitive framework that can be used by

the scientists themselves for building complex analyses. They allow data reproducibility and workflows sharing.

Galaxy (Blankenberg *et al.*, 2011), Cyrille2 (Fiers *et al.*, 2008) and Mobyle (Nron *et al.*, 2009) are three web-based workflow engines that users have to install locally if computational needs on datasets are very large, or if absolute security is required. Alternatively, softwares such as the KNIME (Berthold *et al.*, 2007) workbench or Taverna (Hull *et al.*, 2006) run on the users' desktop and can interact with local resources. Taverna focuses on web services and may require a large number of nodes even for a simple task. In contrast, KNIME provides the ability to modify the nodes without having to re-run the whole analysis. We have chosen this latest tool to develop Knime4Bio, a set of new nodes mostly dedicated to the filtering and manipulation of VCF files. Although many standard nodes provided by KNIME can be used to perform such analysis, our nodes add new functionalities, some of which are described below.

2 IMPLEMENTATION

The java API for KNIME was used to write the new nodes, which were deployed and documented using some dedicated XML descriptors. A typical workflow for analysing exome sequencing data starts by loading VCF files into the working environment. The data contained in the INFO or the SAMPLE columns are extracted and the next task consists in annotating SNVs and/or indels. One node predicts the consequence of variations at the transcript/protein level. For each variant, genomic sequences of overlapping transcripts are retrieved from the UCSC knownGene database (Hsu *et al.*, 2006) to identify variants leading to premature stop codons, non-synonymous variants and variants likely to affect splicing. Some nodes have been designed to find the intersection between the variants in the VCF file and a various source of annotated genomic regions, which can be: a local BED file, a remote URL, a mysql table, a file indexed with tabix (Li, 2011), a BigBed or a BigWig file (Kent *et al.*, 2010). Other nodes are able to incorporate data from other databases: dbSNFRP (Liu *et al.*, 2011), dbSNP, Entrez Gene, PubMed, the EMBL STRING database, Uniprot, Reactome and GeneOntology (von Mering *et al.*, 2007), MediaWiki, or to export the data to SIFT (Ng and Henikoff, 2001), Polyphen2 (Adzhubei *et al.*, 2010), BED or MediaWiki formats. After being annotated, some SNVs (e.g. intronic) can be excluded from the dataset and the remaining data are rearranged by grouping the variants per sample or per gene as a pivot table. Some visualization tools have also been implemented: the Picard API (Li *et al.*, 2009) or the IGV

*To whom correspondence should be addressed.

†During the reviewing process of this article another solution based on KNIME but focusing on FASTQ data files was published by Jagla *et al.* (Jagla *et al.*, 2011).

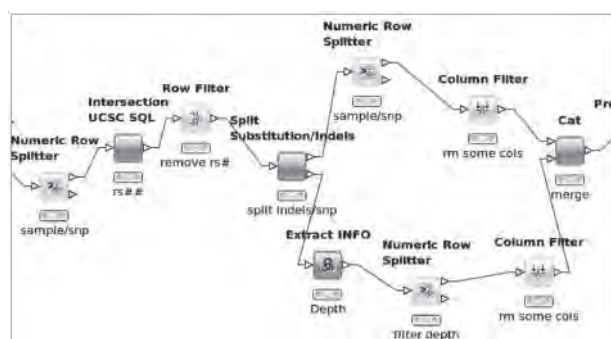


Fig. 1. Screenshot of a Knime4Bio workflow for the NOTCH2 analysis.

browser (Robinson *et al.*, 2011) can be used visualize the short reads overlapping a variation.

As a proof of concept, we tested our nodes to analyse the exomes of six patients from a previously published study (Isidor *et al.*, 2011) related to the Hajdu Cheney syndrome (Fig. 1). For this purpose, short reads were mapped to the human genome reference sequence using BWA (Li and Durbin, 2010) and variants were called using SAMtools mpileup (Li *et al.*, 2009). Homozygous variants, known SNPs (from dbSNP) and poor-quality variants were discarded, and only non-synonymous and variants introducing premature stop codons were considered. On a RedHat server (64 bits, 4 processors, 2 GB of RAM), our KNIME pipeline generated a list of six genes in 45 min: *CELSR1*, *COL4A2*, *MAGEF1*, *MYO15A*, *ZNF341* and more importantly *NOTCH2*, the expected candidate gene.¹

3 DISCUSSION

In practical terms, a computer biologist was close to our users to help them with the construction of a workflow. After this short tutorial, they were able to quickly play with the interface, add some nodes and modify the parameters without any further assistance, but the suggestion or the configuration of some specific nodes (for example, those who require a snippet of java code). At the time of writing, Knime4Bio contains 55 new nodes. We believe Knime4Bio is an efficient interactive tool for NGS analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank the Biostar community for its help, Jim Robinson and his team for the BigWig java API, and Dr Cedric Le Caignec for the *NOTCH2* data.

Funding: Inserm, the 'Centre Hospitalier Universitaire' of Nantes; the 'Fédération Française de Cardiologie' (FFC); 'Fondation pour la Recherche Médicale' (FRM). Solena Le Scouarnec is supported by the Wellcome Trust (Grant n WT077008).

Conflict of Interest: none declared.

REFERENCES

- Adzhubei, I.A. *et al.* (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*, **7**, 248–249.
- Berthold, M.R. *et al.* (2007) Knime: the konstantz information miner. In Preisach, C. *et al.* (eds) *GfKI, Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization*, Springer, pp. 319–326.
- Blankenberg, D. *et al.* (2011) Integrating diverse databases into a unified analysis framework: a Galaxy approach. *Database*, **2011**, bar011.
- Danecek, P. *et al.* (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, **27**, 2156–2158.
- Fiers, M.W.E.J. *et al.* (2008) High-throughput bioinformatics with the Cyrille2 pipeline system. *BMC Bioinformatics*, **9**, 96.
- Hsu, F. *et al.* (2006) The UCSC Known Genes. *Bioinformatics*, **22**, 1036–1046.
- Hull, D. *et al.* (2006) Taverna: a tool for building and running workflows of services. *Nucleic Acids Res.*, **34**, W729–W732.
- Isidor, B. *et al.* (2011) Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. *Nat. Genet.*, **43**, 306–308.
- Jagla, B. *et al.* (2011) Extending KNIME for next generation sequencing data analysis. *Bioinformatics*, **27**, 2907–2909.
- Kent, W.J. *et al.* (2010) BigWig and BigBed: enabling browsing of large distributed datasets. *Bioinformatics*, **26**, 2204–2207.
- Liu, X. *et al.* (2011) dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Hum. Mutat.*, **32**, 894–899.
- Li, H. and Durbin, R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **26**, 589–595.
- Li, H. *et al.* (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078–2079.
- Li, H. (2011) Tabix: fast retrieval of sequence features from generic TAB-delimited files. *Bioinformatics*, **27**, 718–719.
- Nron, B. *et al.* (2009) Mobyle: a new full web bioinformatics framework. *Bioinformatics*, **25**, 3005–3011.
- Ng, P.C. and Henikoff, S. (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.*, **11**, 863–874.
- Robinson, J.T. *et al.* (2011) Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.*, **29**, 24–26.
- von Mering, C. *et al.* (2007) STRING 7—recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, **35**, D358–D362.

¹The workflow was posted on myexperiment.org at: www.myexperiment.org/workflows/2320.

II. PROJET 2 : Approche gène candidat et séquençage haut débit

II.1. Stratégie et méthodologie

Le développement récent de nouvelles stratégies de criblage de variations génétiques rares basées sur les technologies de séquençage haut débit nous donne une opportunité unique de cribler de manière systématique les mutations touchant les gènes déjà impliqués (ou soupçonnés de l'être) dans les troubles héréditaires du rythme et de la conduction cardiaque. Nous avons validé au laboratoire le système de capture Haloplex™ (Agilent) couplé au séquençage sur une ligne d'Illumina HiSeq. Cette combinaison permet le séquençage de 500 kb de séquences génomiques sélectionnées pour 48 patients simultanément. En collaboration avec le groupe de C.Bezzina (AMC, Amsterdam), nous avons donc conçu un kit personnalisé couvrant 163 gènes d'intérêt, qui inclut: (1) chaque gène connu comme impliqué dans les arythmies cardiaques, (2) tous les gènes identifiés comme candidats par nos approches basées sur le séquençage d'exome, ainsi que leurs principaux partenaires connus, (3) tous les gènes connus comme impliqués dans les cardiomyopathies, afin de vérifier si les cardiomyopathies et des arythmies cardiaques sont des pathologies génétiquement chevauchantes (4) une sélection de gènes suspectés d'être impliqués dans les arythmies. Les sites donneurs et accepteurs d'épissage ont été systématiquement inclus, ainsi que les régions 5' et 3' UTR pour les gènes de prédisposition majeurs (*KCNH1*, *KCNQ2*, *SCN5A*). Par cette technique, 172 patients SBr, 86 patients souffrant de troubles de conduction et 167 individus contrôles ont été séquencés. Les 167 individus contrôles sélectionnés, sont des patients atteints de rétrécissement aortique calcifié. Cette pathologie présente une étiologie distincte du SBr et l'avantage de cette population est que chaque patient atteint de rétrécissement aortique calcifié inclus a été le sujet d'une exploration cardiologique approfondie. D'autre part, les 172 patients atteints du SBr ainsi que les 167 individus contrôles proviennent de l'ouest de la France.

Un premier set d'ADN de 42 patients portant des variants connus dans un ou plusieurs des 163 gènes, ont été sélectionnés comme contrôles positifs. Parmi les 69 variants sélectionnés sur les 42 patients, 66 ont été retrouvés par cette technique de capture et séquençage sur une machine MiSeq. Dans les 3 variants non détectés, 1 était présent dans une zone non capturée et 2 sont liés à un problème de détection en raison d'une couverture faible pour des insertions de petite taille.

Compte-tenu du faible pourcentage de bases couvertes dans les régions d'intérêt, un seuil d'une profondeur de lecture moyenne supérieure à 100 X a été déterminé (ligne verte verticale, Figure 37 et Figure 38).

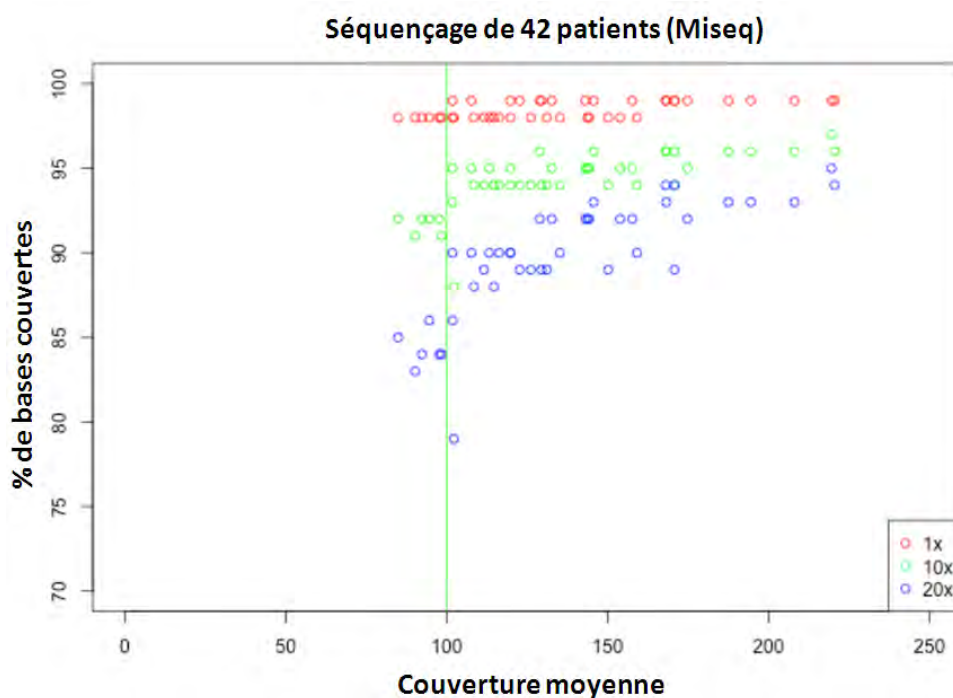


Figure 37 – Représentation du % de bases couvertes par rapport à la couverture moyenne des 42 patients séquencés sur MiSeq

De manière à diminuer le risque de ne pas détecter un variant à cause d'une faible couverture, nous avons pris la décision de procéder au séquençage des régions capturées sur un séquenceur HiSeq qui présente l'avantage d'une plus grande capacité de séquençage. La profondeur de lecture ainsi que le nombre de patients séquencés simultanément ont ainsi pu être augmentés (Figure 38).

Le Tableau 6 compare le pourcentage de bases couvertes sur les régions cibles entre les deux techniques de séquençage (MiSeq et HiSeq) pour des profondeurs de lecture supérieures à 1, 10, 20 et 30.

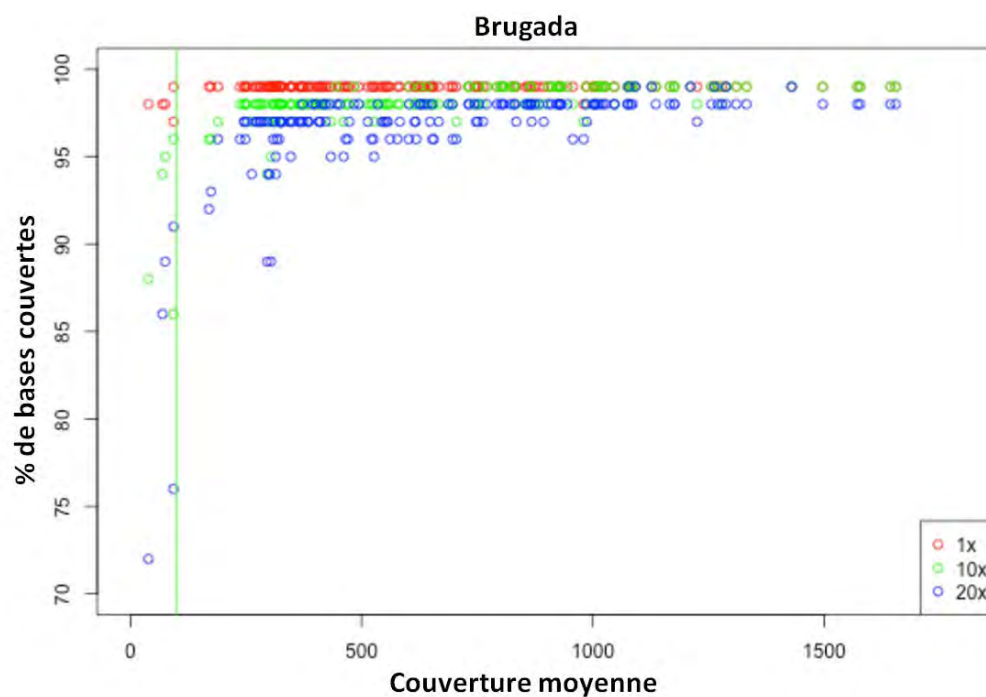


Figure 38 - Représentation du % de bases couvertes par rapport à la couverture moyenne des 172 patients séquencés sur HiSeq

% bases couvertes		MiSeq	HiSeq
> 1x	Min	98	98
	Médiane	98	99
	Moyenne	98.48	98.99
	Max	99	99
> 10x	Min	88	94
	Médiane	94.5	98
	Moyenne	94.26	98.19
	Max	97	99
> 20x	Min	79	89
	Médiane	90	97
	Moyenne	89.7	97.13
	Max	95	99
> 30x	Min	70	84
	Médiane	85	97
	Moyenne	85	96.2
	Max	92	99

Tableau 6 - Tableau récapitulatif du pourcentage de couverture en fonction de la profondeur de lecture par séquençage MiSeq (42 patients) et séquençage HiSeq (167 patients atteints du SBr)

Le pourcentage de bases couvertes est précisé pour des profondeurs de lectures supérieures à 1, 10, 20 et 30.

Les algorithmes Samtools et GATK ont été utilisés pour la détection des variants issus du séquençage. Un nombre important de variants ont été validés par séquençage capillaire après visualisation par l'outil IGV. Douze variants détectés uniquement par Samtools ont ainsi été sélectionnés, mais tous étaient des faux positifs après séquençage capillaire. Douze autres variants ont également été sélectionnés pour avoir été détectés uniquement par GATK, 6 ont été validés par séquençage capillaire. Les variants GATK validés présentant tous de valeurs de qualité différentes (min= 31 ; max= 32767), aucun seuil de qualité n'a pu être utilisé pour la détection des variants. En revanche, lorsque l'on se focalise uniquement sur les variants détectés à la fois par les algorithmes GATK et Samtools, 96% des variants sont confirmés par séquençage capillaire (sur 50 variants sélectionnés, 2 étaient des faux positifs).

Cette validation a permis de standardiser le mode de détection des variants et ainsi de permettre l'analyse pour l'ensemble des individus séquencés par cette technologie.

II.2. Résultats

De manière à pouvoir valider génétiquement la cohorte de patients atteints du SBr, l'analyse a été focalisée dans un premier temps sur les 12 gènes impliqués dans le SBr dont la prévalence a été caractérisée par une étude incluant 126 patients atteints du SBr (Crotti et al., 2012).

L'analyse sur les 12 gènes associés au SBr coïncide avec les données précédemment publiées. Le Tableau 7 récapitule l'ensemble des variants présents sur ces 12 gènes sur les 167 individus séquencés (présentant une couverture moyenne de 100X). Ainsi, 23,35% de la population SBr présente un variant rare (fréquence allélique mineur <1%) pour le gène *SCN5A*. Si on ne considère que les variants privés (absents des bases de données), 9,58% des patients atteints de SBr présentent une mutation sur ce gène.

CHROM	Position	Ref	Alt	rs	Gerp-score	effet	changement	Gene	%
chr12	2797688	A	C	?	4.86	missense_variant	T/P	CACNA1C	2.39%
chr12	2224627	C	T	?	4.69	missense_variant	T/M	CACNA1C	
chr12	2791822	C	G	?	4.67	missense_variant	P/A	CACNA1C	
chr12	2788916	C	T	?	4.92	missense_variant	P/S	CACNA1C	
chr7	81637060	C	T	?	5.59	missense_variant	V/I	CACNA2D1	0.59%
chr10	18828283	A	G	?	5.84	missense_variant	H/R	CACNB2	0.59%
chr15	73660433	G	C	?	1.61	missense_variant	A/G	HCN4	0.59%
chr1	112318808	G	T	?	5.76	missense_variant	P/H	KCND3	0.59%
chr3	38627409	CA	C	?	4.44	frameshift - truncation		SCN5A	9.58%
chr3	38648297	A	T	?	4.73	missense_variant	C/S	SCN5A	
chr3	38651225	C	T	?	5.86	missense_variant	E/K	SCN5A	
chr3	38603904	A	G	?	4.04	splice_donor_variant		SCN5A	
chr3	38592524	T	C	?	4.82	missense_variant	E/G	SCN5A	
chr3	38646314	C	T	?	1.51	missense_variant	R/K	SCN5A	
chr3	38592792	TGTC	T	?	4.44	inframe_deletion	D/-	SCN5A	
chr3	38592969	G	A	?	4.54	missense_variant	R/C	SCN5A	
chr3	38639282	T	C	?	4.68	missense_variant	M/V	SCN5A	
chr3	38592882	C	T	?	4.68	missense_variant	G/R	SCN5A	
chr3	38662410	G	A	?	4.13	stop_gained	R/*	SCN5A	
chr3	38647591	T	C	?	5.54	missense_variant	I/V	SCN5A	
chr3	38639371	A	G	?	3.71	missense_variant	M/T	SCN5A	
chr3	38592884	A	C	?	4.68	missense_variant	I/S	SCN5A	
chr3	38603904	A	G	?	4.04	splice_donor_variant		SCN5A	
chr3	38598774	G	T	?	4.1	missense_variant	A/E	SCN5A	

Tableau 7 - Liste des variants retrouvés dans les gènes de susceptibilité au SBr retrouvés chez 167 patients atteints du SBr

Les variants rares portés sur le gène *CACNA1C* représentent, comme décrit dans la littérature, une prévalence de l'ordre de 5% dans la population SBr. Cependant, lorsque l'on prête attention à la prévalence de variants rares dans ces gènes dans la population générale, on constate un enrichissement en variants rares similaire (Tableau 8).

Les gènes *CACNB2* et *CACNA2D1* semblent présenter en revanche des variants rares exclusivement dans les cohortes de patients atteints de SBr et de troubles de conduction (BAV).

	167 patients SBr		86 patients BAV		167 contrôles	
	Brugada <1%	Brugada NOVEL	BAV <1%	BAV NOVEL	Contrôle <1%	Contrôle NOVEL
SCN5A	23.35 (39)	9.58 (16)	8.13 (7)	1.16 (1)	5.38 (7)	1.79 (3)
SCN1B	-	-	2.32 (2)	-	2.99 (5)	1.19 (2)
SCN3B	0.59 (1)	-	-	-	0.59 (1)	0.59 (1)
GPD1L	-	-	1.16 (1)	-	-	-
RANGRF	-	-	-	-	-	-
CACNA1C	5.38 (9)	2.39 (4)	8.13 (7)	2.32 (2)	8.38 (14)	4.19 (7)
CACNB2	2.99 (5)	0.59 (1)	3.48 (3)	1.16 (1)	-	-
CACNA2D1	3.59 (6)	0.59 (1)	2.32 (2)	1.16 (1)	2.99 (5)	-
KCND3	1.19 (2)	0.59 (1)	1.16 (1)	-	2.39 (4)	1.19 (2)
KCNE3	-	-	1.16 (1)	-	1.19 (2)	-
KCNJ8	-	-	-	-	-	-
HCN4	2.39 (4)	0.59 (1)	1.16 (1)	1.16 (1)	2.99 (5)	-

Tableau 8 - Pourcentage de variants RARES (<1%) et privés (NOVEL) dans les gènes associés au SBr, dans une cohorte SBr et une cohorte de BAV dégénératifs par rapport à la population générale

Pour chaque gène, le pourcentage, suivi du nombre de variant détecté est précisé. L'absence d'information dans une case signifie qu'aucun variant n'a été détecté.

Les autres gènes identifiés dans le SBr présentent une prévalence très faible dans la cohorte de patients SBr, comme précédemment décrit.

II.3. Discussion

L'analyse préliminaire des variants présents sur les 12 gènes de susceptibilité liés au SBr a permis dans un premier temps de vérifier que la fréquence des variants identifiés dans la cohorte de patients atteints du SBr coïncide avec les données de la littérature récemment publiées (Crotti et al., 2012). Les résultats obtenus concernant les autres gènes sont en cours d'analyse

L'analyse préliminaire des ces données portant sur les 12 gènes de susceptibilité liés au SBr montre d'autre part les limites des études consistant à cribler les parties codantes de gènes dans une population de malades sans comparer ces mêmes résultats à une population contrôle.

Il est cependant important ici de préciser qu'une faible prévalence de mutations pour un gène donné dans une population malade par rapport à une population contrôle ne remet pas en cause

l'implication de celui-ci. Pour cela, il est envisagé pour chaque gène individuellement d'étudier la localisation des variants à l'échelle de la protéine, de manière à identifier une région statistiquement plus touchée dans la population malade.

L'équipe travaille actuellement sur l'analyse statistique de ces données dans le but d'identifier un enrichissement de variants rares chez les patients atteints du SBr par rapport à la population générale dans les gènes considérés. Un contrôle positif pour ce test pourrait être la détection de l'enrichissement en variants rares dans le gène *SCN5A*. Cette stratégie pourrait conduire à l'identification de nouveaux gènes impliqués fortement dans l'apparition du SBr comme l'est *SCN5A*.

Différents tests statistiques sont disponibles dans la littérature permettant la détection d'enrichissement en variants rares. Pour évaluer un enrichissement du nombre total de variants en prenant en compte l'ensemble des séquences codantes d'un gène (Figure 39-A), l'outil CAST (Morgenthaler and Thilly, 2007) est actuellement utilisé.

Dans d'autres cas, un enrichissement en variant rare peut potentiellement concerner une région spécifique d'un gène (Figure 39-B). De manière à évaluer cette potentielle alternative, un autre outil, basé sur le principe de tests statistique réalisés dans des intervalles prédéterminés (fenêtres coulissantes) a été utilisé (Chen et al., 2013). Les résultats sont en cours d'analyse.

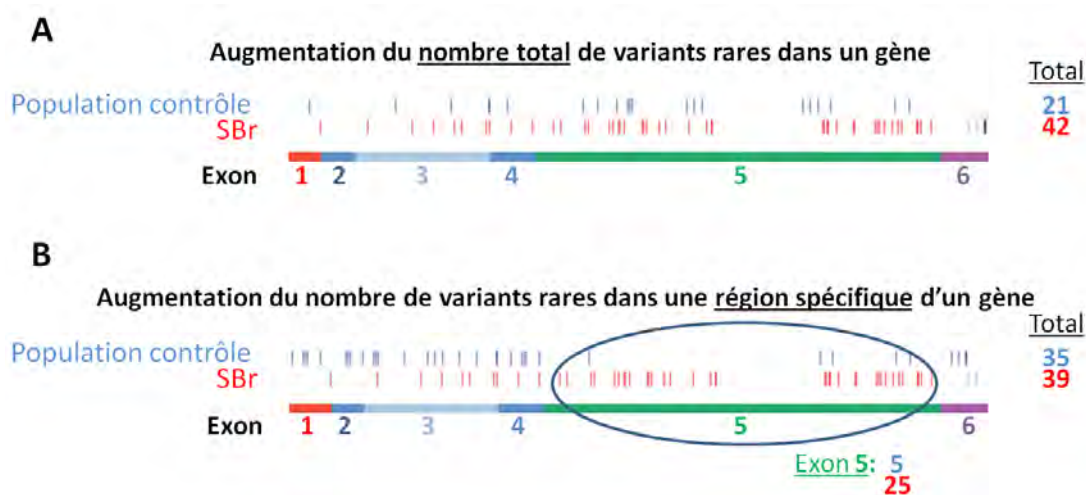


Figure 39 – Différentes configurations d'enrichissement de variants rares

A- Représentation d'un enrichissement de variants rares à l'échelle du gène entier dans la population atteinte du SBr par rapport à la population générale. **B** – Représentation d'un enrichissement en variants rares dans une région spécifique du gène sans différence significative du nombre total de variants rares à l'échelle du gène dans la population atteinte du SBr par rapport à la population générale.

III. PROJET 3 : Approche génétique familiale du syndrome de Brugada

III.1. Approche « interfamiliale »

La première approche, initiée en collaboration avec N Carter au Sanger Institute, a consisté à séquencer de manière systématique tous les exons codants du génome (sur Illumina GAIIX/HiSeq) après enrichissement par capture (système Agilent SureSelect) pour des patients atteints de formes familiales de mort subite cardiaque associée au SBr.

Les mutations (ou SNV pour *Single Nucleotide Variants*) les plus probablement associées au syndrome de Brugada ont dans un premier temps été sélectionnées selon les critères suivants: (i) absence des bases de données SNP ; (ii) impact fonctionnel sur la protéine (prédiction par l'algorithme SIFT). Les SNV sélectionnés ont été confirmés par séquençage capillaire puis testés chez les apparentés afin de vérifier leur co-ségrégation avec le phénotype observé. Seuls les gènes présentant au moins 4 variants privés chez différents patients ont été sélectionnés. Cette approche, appliquée à 20 premières familles recrutées en Europe dont 13 de Nantes, n'a pas permis d'identifier de nouveaux gènes associés de manière récurrente aux formes familiales de SBr. Les gènes sélectionnés par cette approche se sont avérés être de grands gènes qui présentent dans la population générale un nombre important de variants rares. Cet élément pourrait être une des raisons de l'échec de cette stratégie.

Compte-tenu de la baisse des coûts conjointe à l'évolution rapide des technologies de séquençage et des bases de données génomiques, il est envisageable qu'une extension du projet de séquençage d'exome sur des cas index de formes familiales du SBr puisse voir le jour d'ici quelques années. Il serait alors possible d'étudier un enrichissement en variants rares dans la population SBr en prenant en compte l'ensemble des parties codantes du génome. Cette stratégie 'interfamiliale' reste donc une alternative intéressante mais nécessitera un nombre bien plus important de cas index.

Sample	SNVs	Novel	Stop	Stop.Unique	Non.Syn.	SIFT.Damaging	Damaging.Unique
Brs1	35058	2520	31	11	929	250	118
Brs2	35078	2555	29	10	955	243	119
Brs3	35673	2534	27	13	888	241	114
Brs4	35986	2439	29	8	841	184	85
Brs5	35047	2591	23	7	932	241	116
Brs6	35473	2546	19	6	910	211	95
Brs7	33710	2449	23	9	830	187	101
Brs8	34822	2396	26	7	847	210	100
Brs9	34535	2484	20	7	830	177	88
Brs10	35474	3121	28	12	997	244	159
Brs11	35738	2196	21	4	775	158	97
Brs12	35368	2193	19	2	776	163	88
Brs13	35947	2324	16	3	802	150	83
Brs14	36622	2469	31	10	888	174	75
Brs15	37426	2550	20	5	925	199	93
Brs16	36951	2526	29	12	903	201	104
Brs17	36123	2482	30	8	898	191	91
Brs18	35904	2489	25	4	904	202	93
Brs19	36977	2472	24	7	918	206	118
Brs20	37626	2801	27	11	969	224	131

#Genes	In 1 patient	In 2 patients	In 3 patients	In 4 patients	In 5 patients
1795	1591	169	30	4	1

Tableau 9 - Représentation des filtres successifs réalisés dans le cadre de l’approche «interfamiliale»

Ce tableau présente le nombre de variants après chaque filtre. En rouge sont encadrés pour l’ensemble des patients, les variants privés prédits comme altérant la fonction de la protéine par l’algorithme SIFT. Le tableau inférieur encadré en rouge décompte le nombre de gènes présentant ces variants privé/SIFT+ et le nombre de patients présentant une altération de ces gènes.

III.2. Approche intrafamiliale et méthodologie –Exome –IBD

La seconde approche, ‘intrafamiliale’, est de combiner séquençage d’exome complet et analyse d’identité par descendance (IBD). Nous avons sélectionné tous les membres atteints de SBr ainsi que certains non atteints pour aider à la reconstruction des haplotypes. Les ADN de ces individus ont été analysés sur puces *Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1* puis les génotypes traités à l’aide de programmes dédiés (développés par C.Dina et P.Lindenbaum), et combinés aux variants rares détectés par séquençage d’exome. Nous avons par cette approche, identifié 3 gènes candidats.

Une des hypothèses plausibles concernant le fait que les analyses de liaison paramétriques aient le plus souvent échoué dans les études familiales du SBr est qu’on ne connaît pas précisément le mode de transmission de la pathologie, ni la fréquence allélique de l’allèle délétère et encore moins les pénétrances. Tout ces paramètres infèrent la probabilité de liaison statistique et peuvent conduire à une incapacité à identifier la liaison lorsqu’elle existe (Clerget-Darpoux et al., 1986).

L’identification des haplotypes partagés entre individus atteints par la stratégie d’identité par descendance constitue donc dans cette approche la première étape (Figure 32).

Une fois les haplotypes intrafamiliaux déterminés, il est possible grâce à l’outil Knime4Bio de ne sélectionner que les variants présents dans ces régions.

Les variants nucléotidiques simples (SNV) détectés par les algorithmes GATK, Samtools et mPileup sont dans un premier temps regroupés et seuls les variants retrouvés par au moins 2 des 3 algorithmes sont conservés. Les algorithmes DinDel et Mpileup ont permis la détection des insertions et les délétions de courtes séquences nucléotidiques (InDel). Seules les InDels détectées par les deux algorithmes sont conservées. L’ensemble des InDels et SNVs sont ensuite regroupés. Les variants présents en dehors des régions chromosomiques partagées entre individus atteints sont ensuite écartés de l’analyse. Une étape d’annotation des variants conservés par les bases de données génomiques (EVS, 1000 genome et dbSNP138) est ensuite réalisée permettant d’écarter les variant fréquents dans la population générale. Les variants prédisant un effet fonctionnel (variant faux sens, apparition d’un codon stop, décalage du code de lecture, site d’épissage) sont ensuite sélectionnés. En raison de la prévalence du SBr dans la population générale et compte-tenu du caractère symptomatique des cas familiaux sélectionnés, l’analyse est focalisée dans un premier temps sur les variants privés, qui ne sont pas retrouvés dans les bases de données. La représentation graphique de l’analyse réalisée avec l’outil Knime4Bio est décrite en figure 39.

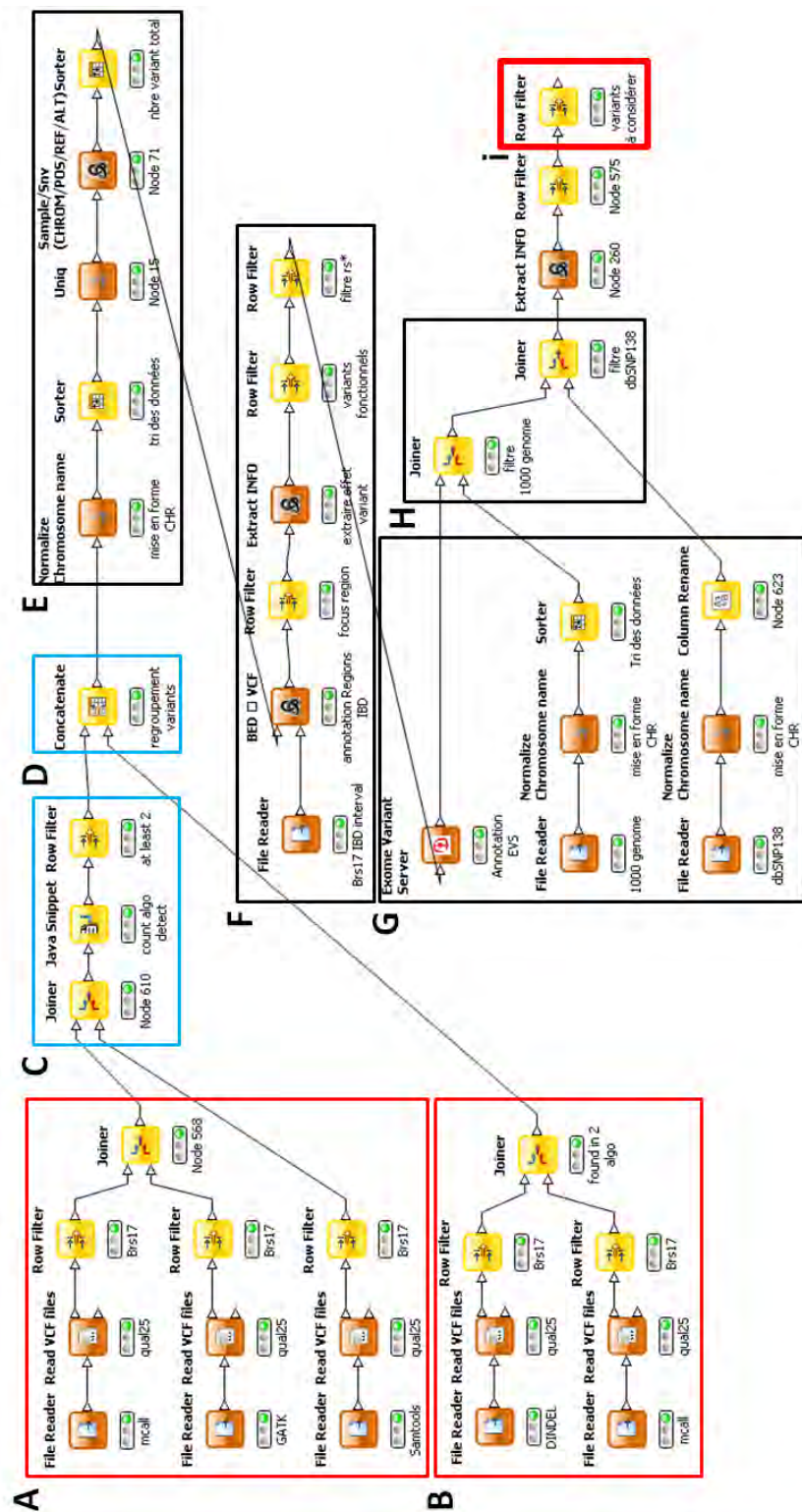


Figure 40 – Traitement des fichiers VCF par Knime4bio dans le cadre des analyses familiales du SBr

A- Regroupement des variants nucléotidiques simples (SNV) détectés par les algorithmes Mpileup, Samtools et GATK. **B** - Regroupement des insertions et délétions de petites tailles détectés (InDel) par les algorithmes Mpileup et Dindel. **C** - Seuls les variants retrouvés par au moins 2 algorithmes sont conservés. **D** - Les SNV et InDel conservés sont regroupés. **E** - Mise en forme des données. **F** - Sélections des variants présents uniquement dans les haplotypes partagés entre individus atteints et prédisant un effet fonctionnel (variant faux sens, apparition d'un codon stop, décalage du code de lecture, site d'épissage). **G** - Annotation des variants retrouvés dans les bases de données EVS, 1000 genome et dbSNP138. **H** - Filtre des variants retrouvés dans les bases de données. **i** - Variants fonctionnels privés (NOVEL) retrouvés dans haplotypes partagés entre individus atteints.

III.3. Identification du gène *KCNAB2*

➤ *Introduction de la découverte du gène *KCNAB2**

Nous avons identifié dans la famille SBr17, un variant privé faux sens sur le gène *KCNAB2* qui ségrège avec la pathologie dans une petite famille atteinte du SBr. Le gène *KCNAB2* code pour la protéine Kv β 2, sous-unité β des canaux potassiques voltage dépendants. La protéine Kv β 2 sauvage, augmente la densité de courant générée par la protéine Kv4.3 (Yang et al., 2001b), déjà identifiée dans le SBr (John R Giudicessi et al., 2011).

L'analyse fonctionnelle réalisée sur des cellules COS-ATCC montre que le variant Kv β 2-R12Q provoque une augmentation significative de la densité de courant générée par Kv4.3 par rapport à la forme Kv β 2-sauvage. Par co-immunoprécipitation, nous avons montré que l'interaction de Kv β 2 et Kv4.3 n'est pas altérée en présence de la mutation. L'étude de la fraction protéique membranaire a montré que la présence de la protéine Kv4.3 à la membrane était inchangée en présence de la forme WT ou R12Q de la protéine Kv β 2. En revanche, la fraction biotinylée de la protéine Kv β 2 mutée est augmentée, suggérant une plus grande présence sous-membranaire de la protéine Kv β 2 en présence de la mutation. La modélisation de l'effet de la mutation Kv β 2-R12Q, a été réalisée grâce au modèle de Luo-Rudy et concorde avec le phénotype du SBr observé dans la famille.

Article 2: A gain-of-function mutation in the voltage-gated K^+ channel beta-2 subunit is associated with Brugada syndrome.

(En cours de finalisation)

A gain-of-function mutation in the voltage-gated K⁺ channel beta-2 subunit is associated with Brugada syndrome

Vincent Portero^{1,2,3,*}, Solena Le Scouarnec^{4,*}, Zeineb Ess-Salah-Lamoureux^{1,2,3*}, Sophie Burel^{1,2,3}, Jean-Baptiste Gourraud^{1,2,3,5}, Stéphanie Bonnaud^{1,2,3,5}, Pierre Lindenbaum^{1,2,3,5}, Floriane Simonet^{1,2,3}, Jade Violleau^{1,2,3,5}, Juan-Eugenio Sandoval-Tortosa^{1,2,3}, Carol Scott⁴, Stéphanie Chatel⁵, Gildas Loussouarn^{1,2,3}, Thomas O'Hara⁶, Philippe Mabo⁷, Christian Dina¹, Hervé Le Marec^{1,2,3,5}, Nigel Carter⁴, Jean-Jacques Schott^{1,2,3,5}, Vincent Probst^{1,2,3,5}, Isabelle Baró^{1,2,3}, Céline Marionneau^{1,2,3}, Flavien Charpentier^{1,2,3,5,#}, Richard Redon^{1,2,3,5,#}

¹ Inserm, UMR 1087, l'institut du thorax, Nantes, France

² CNRS, UMR 6291, Nantes, France

³ Université de Nantes, Nantes, France

⁴ The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK

⁵ CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de Cardiologie, Nantes, France

⁶ Johns Hopkins University, Baltimore, USA

⁷ University Hospital of Rennes, France

* These authors contributed equally to this work.

These authors jointly directed this work.

Correspondence should be addressed to R.R. (richard.redon@inserm.fr).

Keywords: Brugada syndrome, cardiac arrhythmia, genetics, Kvβ2, Kv4.3

Abstract

Brugada Syndrome (BrS) is an inherited cardiac arrhythmia disorder characterized by ST-segment elevation on the electrocardiogram and associated with high risk of sudden cardiac death. While mutations in the *SCN5A* gene have been causally related to BrS for around 20% of patients, its genetic basis is still largely unknown in the large majority of cases. Here we combined whole exome sequencing, array-CGH and familial linkage analysis to identify the genetic variant likely causing BrS in a pedigree for which *SCN5A* mutations had been excluded. By this approach, we isolated one private non-synonymous variant in the *KCNAB2* gene co-segregating perfectly with cardiac rhythm anomalies within the pedigree. *KCNAB2*, which encodes the voltage-dependent K⁺ channel β 2-subunit (Kv β 2). Kv β 2 is widely expressed in human cardiac tissue and has been shown to interact with the transient outward K⁺ channel pore-forming subunit Kv4.3, increasing its current density. Patch-clamp experiments performed on Cos-7 cells expressing both Kv4.3 and Kv β 2 revealed a significant increase of the Kv4.3 current density in presence of the mutant form of Kv β 2. Although biotinylation experiments showed no difference in the Kv4.3 cell surface expression, the biotinylated fraction of Kv β 2 was significantly increased in the presence of mutant versus wild-type protein. By testing the whole coding region of *KCNAB2* in 190 unrelated patients with BrS, we found rare missense substitutions in 3 cases. Altogether, our results indicate that gain-of-function mutation in *KCNAB2* is causally related to Brugada syndrome.

Introduction

Sudden cardiac death (SCD) is a major health burden in industrialized countries, with more than 300,000 events recorded every year in the USA alone¹. Although coronary artery disease remains the first underlying cause of SCD, 5 to 10% of events occur in the absence of detectable structural abnormalities^{2,3}. A large proportion of these autopsy-negative cases are likely consequence of inherited cardiac arrhythmia disorders⁴. Among such disorders, the Brugada syndrome is characterized by an ST-segment elevation and a negative T-wave in the right precordial leads on the electrocardiogram.

In around 20% of cases, the Brugada syndrome has been causally related to loss of function mutations in the *SCN5A* gene⁵, which encodes the pore-forming subunit of the cardiac voltage-gated Na^+ channel (Nav1.5). Despite this condition usually being described as a monogenic disease with autosomal dominant transmission, family-based linkage analysis has most frequently failed to identify disease-causing genes. Mutations in eleven other genes have already been identified in patients with Brugada syndrome, but they altogether explain only less than 5% of cases: around 70% of cases still remain genetically unexplained⁶.

While common genetic polymorphisms have been recently associated with the risk of Brugada Syndrome⁷, familial cases studies remain extremely useful to highlight rare variants with large effect and discover new genes involved in disease susceptibility. In this study, by combining genetic investigations based on whole-exome sequencing and functional explorations in a familial form of Brugada syndrome, we identified the *KCNAB2* gene as a new susceptibility gene for this cardiac arrhythmia disorder.

Methods

Clinical recruitment

Patients with Brugada syndrome as well as unaffected relatives were recruited following the French ethical guidelines for genetic research, and under approval from the local ethical committee. Written informed consents were obtained from all patients and family members. Electrocardiograms (ECG) were systematically recorded at baseline and under drug challenge tests, according to consensus criteria⁸. A Brugada type I ECG pattern was defined on the basis of a coved type ST elevation at baseline or after a drug challenge test, in one or more leads in the right precordial leads, including the third and fourth intercostal space⁸. Holter recording, echocardiography and electrophysiological investigations were performed in every patient

diagnosed with Brugada syndrome. Every ECG was double reviewed by expert physicians blinded to both clinical and genetic status.

Linkage analysis

SNP genotyping was performed on population-optimized Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1 array plates following the standard manufacturer's protocol. Fluorescence intensities were quantified using the Affymetrix GeneTitan Multi-Channel Instrument, and primary analysis was conducted with Affymetrix Power Tools following the manufacturer's recommendations. After genotype calling using the 'apt' program, individuals with a genotype call rate lower than 97% were removed. SNPs with a minor allele frequency (MAF) <10%, a call rate of <95% or with $P < 1 \times 10^{-4}$ when testing for Hardy-Weinberg equilibrium were excluded. We used the MERLIN algorithm⁹ to detect chromosomal fragments co-segregating with the BrS phenotype, by testing a model of autosomal dominant pattern of inheritance with incomplete penetrance (80%) and deleterious allele frequency of 1/1000. We used a LOD score of 0.7 as threshold to select the haplotypes of interest, given that the maximal theoretical LOD score was 0.82 for this family.

Array-CGH

Array-CGH was performed on Agilent whole-genome 1M microarrays following the manufacturer's recommendations. Variant calling was performed as previously described¹⁰, after exclusion of probes located within known copy-number variable intervals¹¹.

Sequencing

Enrichment in coding sequences was performed using the Agilent SureSelect in-solution capture protocol, which targeted 39.3 Mb of exonic sequences (GENCODE custom design as previously described¹²). The enriched library was sequenced on three lanes of Illumina Genome Analyzer IIx machine, producing 54-bp paired-end reads and 13.3 Gb of sequence for the patient. Reads were aligned to the human genome assembly GRCh37 (BWA), which led to a mean coverage of 117x for all targeted exons +/- 10 bp. Coverage of 10x or more was obtained for 89.8% of the targeted positions, considering only read with a mapping quality score above 10. Single Nucleotide Variants (SNVs) were called using Samtools v0.1.16, Samtools v0.1.7, GATK Unified Genotyper v1.1-20, and Dindel v1.01. Variants called with a read depth below 4x or above 1200x were excluded, as well as those with a mapping quality below 25 or detected by only one out of the four algorithms. Functional consequences were

annotated using Ensembl VEP (Variant Effect Predictor). Known variants were filtered out using data from dbSNP138, the 1000 Genomes Project phase 1, the NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP6500SI), and UK10K control datasets. Knime4Bio, a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME¹³, was used for all merging and filtering steps. Validation experiments for each selected variant, familial segregation analyses and further screening for *KCNAB2* mutations were performed by capillary sequencing on Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer, using standard procedures.

Site-directed mutagenesis

After checking which *KCNAB2* transcript is predominantly expressed in human heart by RT-PCR experiments, we cloned the cardiac isoform, NM_003636, in a pCMV6 expression plasmid to perform functional experiments. The human WT-*KCNAB2*, R12Q-*KCNAB2*, L13F-*KCNAB2* and V114I-*KCNAB2* genes were purchased from the company ORIGEN. The constructs were sequenced to ensure that there was no other mutation.

Cellular electrophysiology

The African green monkey kidney fibroblast-like cell line (COS-7) was obtained from the American Type Culture Collection and cultured as previously described¹⁴. Cells were transfected with 2 µg of DNA complexed to JetPEI (Polyplus-transfection) according to the manufacturer's instructions. DNA amounts were 100 ng of pCMV6-*KCND3* (NM_004983.3), 500 ng of wildtype (WT) or mutant pCMV6-*KCNAB2* (NM_003636.2; 250 ng of WT and mutant in the heterozygous condition) and 1.4 µg of pEGFP (Clontech). At 8 hours post-transfection, the cells were isolated and seeded in plastic Petri dishes at low density. At 48 hours post-transfection, whole-cell currents were recorded at room temperature using the patch-clamp technique. The cells were continuously superfused with Tyrode solution (145M NaCl, 4mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 5mM HEPES, 5mM glucose, pH 7.4). Wax-coated pipettes (tip resistance: 1.8 to 3 MΩ) were filled with an intracellular medium (150mM KCl; 1mM MgCl₂, 5mM EGTA, 10mM HEPES, pH 7.2). All products were purchased from Sigma. Stimulation, data recording through an A/D converter (Tecmar TM100 Labmaster, Scientific Solutions; 5 kHz filtering), and analysis were performed with Acquis1 software (Bio-Logic). All current measurements were normalized using the cell capacitance. Capacitance and series resistances were compensated (60-70% compensation) to obtain minimal contribution of capacitive transients using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Inc).

Simulations of Action Potentials at the Right Ventricular Outflow Tract and resulting ECG patterns were performed using the Luo-Rudy model ¹⁵.

Biochemical studies

For biochemical experiments, to enable protein detection on western blots, we increased the amount of transfected DNA to 666 ng for *KCND3* and 1333 ng for *KCNAB2*. No GFP was used.

Coimmunoprecipitation of heterologously expressed proteins

Forty-eight hours after transfection, COS-7 cells were washed twice with PBS and lysed in ice-cold lysis buffer containing 1X PBS, 1% Triton X-100 and complete mini EDTA-free protease inhibitor mixture tablet (Roche). Cell lysates were used in immunoprecipitation experiments with 5 µg of anti-Kvβ3 rabbit polyclonal antibody (RbαKv4.3; Alomone Labs). Prior to immunoprecipitation, antibodies were bound to 12.5 µl of protein-A-magnetic beads (Invitrogen). Cell lysates and antibody-coupled beads were mixed for 2 h at 4°C. Magnetic beads were then collected and washed four times with ice-cold lysis buffer, and isolated protein complexes were eluted with 1X SDS sample buffer at 60°C for 5 min. Immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot as described ¹⁶ previously. The RbαKv4.3 antibody used for Western blot was purchased from Alomone Labs, and the mouse monoclonal anti-Kvβ2 and anti-transferrin receptor (TransR) antibodies were purchased from Origene and Invitrogen, respectively. Goat anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

Cell surface biotinylation assays

Surface biotinylation of transfected COS-7 cells was completed as described previously ¹⁶. Briefly, cells were incubated with 0.25 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce) in PBS, pH 7.4, for 30 min on ice. The biotinylation reaction was quenched with Tris-saline solution (10 mM Tris, 120 mM NaCl, pH 7.4), and detergent-soluble cell lysates were prepared. Biotinylated cell surface proteins were affinity-purified using NeutrAvidin-conjugated agarose beads (Pierce), and purified cell surface proteins were analyzed by western blot as described above. Bands corresponding to Kv4.3 and Kvβ2 were normalized to bands corresponding to TransR from the same sample. Kv4.3 and Kvβ2 protein expression (total or biotinylated fraction) in cells transfected with Kvβ2-R12Q alone or with Kvβ2-WT

(HET condition) is expressed relative to Kv4.3 or Kv β 2 protein expression (total or biotinylated fraction) in cells transfected with Kv β 2-WT alone.

Statistics of functional studies

All data are presented as mean $\pm$ SEM. The statistical significance of the observed effects was assessed by the Student t-test (or a test of Mann-Whitney when needed), or 2-way ANOVA followed by a Tukey's test for multiple comparisons when needed. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Clinical report

The proband (individual II.3, figure 1 A) was diagnosed with Brugada syndrome after he had experienced unexplained syncope. His ECG shows a permanent type I BrS electrocardiographic pattern without conduction disturbance (figure 2A). Electrophysiological studies confirmed normal conduction (AH: 96 ms, HV: 57 ms), no arrhythmia being observed during programmed ventricular stimulation with a ventricular refractory period of 210 ms. Holter monitoring revealed a non-sustained polymorphic ventricular tachycardia (figure 2B). No recurrence of syncope or arrhythmia was observed after ICD implantation.

By family screening, two asymptomatic first-degree relatives (individuals II.1 and II.4) were diagnosed with the same disease after drug induction (figure 2A). Individuals I.2 and II.2 did not present with the ECG pattern typical of Brugada syndrome, even after ajmaline test. As the individual I.1 was diagnosed with a complete left-bundle branch block associated with a dilated cardiomyopathy (figure 2A), he could not be tested by drug challenge.

Genetic investigations

We first checked whether any genetic defect involving *SCN5A* could explain this familial case of Brugada syndrome, but didn't detect any *SCN5A* mutation by capillary sequencing for the proband. Moreover, no rare copy-number variant could be identified by microarray-based CGH. We then combined whole exome sequencing (WES) and linkage analysis to identify any novel genetic defect likely to explain this familial case. Whole exome sequencing led to the detection of 40,346 simple nucleotide variants (SNVs) in the proband compared to the human reference genome assembly (GRCh37). Only 104 of these SNVs were annotated as functional and novel (i.e. absent from the databases dbSNP138, 1000 genomes phase 1 data,

the NHLBI Exome Sequencing Project and UK10K). In parallel to WES, linkage analysis on the complete pedigree allowed us to determine which chromosomal intervals contain those haplotypes that are shared only between the affected siblings. By this strategy, we could exclude 83% of the genome, for which haplotype sharing is not compatible with autosomal dominant inheritance (Figure 1B). We finally obtained a list of 18 variants, for which we performed systematic segregation analysis by capillary sequencing (Figure 1C). We found that only five non-synonymous (or splicing) variants co-segregate with the BrS phenotype. Interestingly, among these 5 variants, one was found in the *KCNAB2* gene (NM_003636: c.35 G>A; NP_003627: p.R12Q; Figure 1D), which encode the β 2-subunit of the voltage-dependent K⁺ channel (Kv β 2). Kv β 2 has been shown to interact with the Kv4.3 channel, which has itself been involved in the pathogenesis of BrS^{17,18}. The variant was not carried by any of the 400 healthy blood donors that we tested by RFLP.

By screening for additional rare variants in *KCNAB2* among 190 unrelated BrS patients, we detected one additional missense substitution (NM_003636: c.37 C>T; NP_003627: p.L13F), which is absent from public databases. A third non-synonymous variant (NM_003636: c.298 G>A; NP_003627: p.V114I) was found in 2 patients, but has been reported with a minor allele frequency of less than 0.02% (rs140319610; MAF=0.0154% in the ESP database; MAF=0.0186% in the Exome Variant Server).

Electrophysiological analyses

The *KCNAB2* gene, which encodes Kv β 2, is expressed in heart with no difference in transcript levels between the subendocardium and the subepicardium¹⁹. Three transcripts are described in the RefSeq database for *KCNAB2*. By RT-PCR experiments on a panel of human tissue types, we could identify NM_003636 as the main cardiac isoform. Interestingly, Kv β 2 was shown to interact with Kv4.3 in brain and to increase Kv4.3-encoded Kv current densities²⁰. Since Kv4.3, which generates the cardiac $I_{to,f}$ current, has already been shown to be involved in Brugada syndrome^{21,17}, we hypothesized that the R12Q mutation in Kv β 2 could lead to a dysfunction of Kv4.3 channels. Whole-cell voltage-clamp investigations were performed in COS-7 cells co-expressing Kv4.3 and Kv β 2 with or without the R12Q substitution. As shown in figure 3, the current generated by Kv4.3 in the presence of R12Q Kv β 2 was larger than in the presence of WT Kv β 2. At a voltage of +60 mV, the current density was increased from 32.7 ± 7.8 pA/pF in control conditions to 185.1 ± 63.1 pA/pF in the presence of the mutation at the homozygous state ($p < 0.001$). At the heterozygous state, the increase was less pronounced with a current density at +60 mV of 124.7 ± 34.6 pA/pF

($p < 0.01$). Other biophysical properties, activation parameters, steady-state inactivation, kinetics of inactivation and recovery from inactivation were not significantly modified by the amino-acid change (data not shown).

Biochemical analyses

To gain insight into cell and membrane expression of the Kv4.3-K β 2 complexes, biochemical experiments were performed in COS-7 cells. Our results show that heterologous Kv β 2 co-immunoprecipitates with Kv4.3 channels and that the R12Q mutation does not prevent the interaction (figure 4A). No significant differences in Kv4.3 and Kv β 2 total expression levels were observed in presence of the mutation ($n = 5$). Cell surface biotinylation assays showed no differences in Kv4.3 channel cell surface expression whether co-expressed with Kv β 2-R12Q or with Kv β 2-WT. However, the biotinylated fraction of Kv β 2 expressed together with Kv4.3 was significantly increased in presence of the R12Q mutation ($p = 0.011$; figure 4B). It should be noted that this pattern was still observed in absence of Kv4.3 (figure 4C).

Action Potential modeling

Using the Luo-Rudy right ventricular outflow tract (RVOT) wedge model, we performed the simulation of RVOT electrical activity taking into account the gain of function of the R12Q-Kv β 2 variant on the Kv4.3 current densities in the heterozygous condition (Figure 5). The control ECG displayed no ST segment elevation and an upright T-wave. The 2-fold $I_{to,f}$ increase corresponds to the difference between the upper value of the WT condition and the lower value of the heterozygous condition while the 4-fold increase corresponds to the difference observed between the mean values (panel 5A). With a 2-fold increase in Kv4.3 current density, a shortening and a reactivation of the subepicardial AP was observed. As shown in panel 4D, the subepicardial AP fails to produce a plateau initially. There is a plateau in the mid-myocardium due to slightly lower I_{to} . The I_{to} increase exaggerates phase-1 repolarization, delaying the plateau, which causes a re-excitation (arrow) of the resting subepicardial tissue, so called phase-2 reentry. Reactivation is driven by the L-type Ca^{2+} current ($I_{Ca,L}$) at negative voltages on the hyperpolarization phase of its I/V curve (data not shown). This generates an extra-systole in the pseudo-ECG whereas the loss of subepicardium plateau causes an ST segment elevation. With a 4-fold increase in Kv4.3 current density, a loss of the AP dome was observed in the subepicardium, without a reactivation event. The mid-myocardium plateau is also removed. The increased Kv4.3 current density hyperpolarizes the cell membrane and reduces $I_{Ca,L}$, avoiding subepicardial re-excitation. The pseudo-ECG

simulated by the 4-fold Kv4.3 increased current density reports an ST segment elevation and a slightly shorter QT interval, compared to control condition.

These results highlight that in the heterogeneous transmural wall, uniform I_{to} increase can cause non-uniform loss of plateau. This allows late reactivation in the resting region, driven by proximal and late appearing plateaus. The severe 4-fold I_{to} increase removes the plateau from every cell in which I_{to} is present and does not allow $I_{Ca,L}$ -based AP reactivation.

Discussion

In this study, by combining whole-exome sequencing and familial linkage analysis, we have identified a novel variant in the *KCNAB2* gene carried by three siblings presenting with Brugada syndrome. *KCNAB2* encodes Kv β 2, the voltage-dependent K⁺ channel β 2-subunit. *KCNAB2* transcripts have been shown to be expressed in the human RV and LV without expression gradient between subepi- and subendocardium²². Kv β 2 is related to the aldo-keto reductase superfamily²³ and was shown to increase the $I_{to,f}$ current density generated by the Kv4.3 channel, without affecting measurably the time and/or voltage-dependent properties of the current²⁰. $I_{to,f}$ is mainly present in subepicardium, and its increase has been shown to be involved in the Brugada-type ECG pattern²⁴. Recent studies have indeed reported that mutations in the *KCND3* gene (which encode the Kv4.3 channel) and in the *KCNE3* gene (which encodes a β -subunit of potassium channels interacting with Kv4.3) result in an increase of I_{to} and are associated with Brugada syndrome^{25,18}.

The electrophysiological study performed here shows that the major effect of the R12Q substitution in the Kv β 2 protein is an increase of $I_{to,f}$ current density, without any significant change in the biophysical properties of the current. Additional biochemical experiments indicate the presence of a greater amount of Kv β 2-R12Q, without increased Kv4.3 expression, underneath the cell surface. These results suggest that membrane trafficking of Kv4.3 and Kv β 2 occurs through dissociated mechanisms. Although the increased current density of Kv4.3 in the presence of increased amounts of Kv β 2-R12Q might result from a chaperone-like effect of the β -subunit on the potassium channel, the mechanism behind this process remains to be identified.

In the Luo-Rudy RVOT wedge computer model, inducing a 2-fold increase of $I_{to,f}$ was sufficient to shorten AP markedly in the subepicardium compared to the subendocardium, and cause phase-2 reentry. This was associated to the pattern specific of BrS on the pseudo-ECG, thus confirming our hypothesis. The model also suggests that further increasing $I_{to,f}$ could

lead to even more important shortening of the subepicardial A-P but would prevent subepicardial re-excitation.

Screening of the *KCNAB2* coding sequence among 190 unrelated patients with Brugada syndrome allowed us to identify a second novel missense substitution affecting this gene in one case. A third non-synonymous variant, already reported in public databases with a minor allele frequency below 0.02%, was found in two other patients. These findings, together with the identification of a gain-of-function mutation of *KCNAB2* in three affected siblings, indicate that *KCNAB2* should be considered as a new susceptibility gene for Brugada syndrome.

The involvement of *KCNAB2* in the physiopathology of Brugada syndrome might help in better understanding I_{to} regulation. In particular, in order to decipher how higher amounts of Kv β 2 at the cell surface results in an increase in the $I_{to,f}$ current, other factors involved in Kv4.3 membrane targeting should be investigated more closely, in the context of Brugada ECG characteristics.

References

1. Kumar, P. & Paul, J. in *Cardiomyopathies* (Milei, J.) (InTech, 2013). at <<http://www.intechopen.com/books/cardiomyopathies/sudden-cardiac-death>>
2. Ellsworth, E. G. & Ackerman, M. J. The changing face of sudden cardiac death in the young. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* **2**, 1283–1285 (2005).
3. Wren, C. Sudden death in children and adolescents. *Heart Br. Card. Soc.* **88**, 426–431 (2002).
4. Tester, D. J. & Ackerman, M. J. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 240–246 (2007).
5. Chen, Q. *et al.* Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* **392**, 293–296 (1998).
6. Crotti, L. *et al.* Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1- through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for Brugada syndrome genetic testing: implications for genetic testing. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1410–1418 (2012).
7. Bezzina, C. R. *et al.* Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat. Genet.* **45**, 1044–1049 (2013).
8. Antzelevitch, C. *et al.* Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* **111**, 659–670 (2005).
9. Abecasis, G. R., Cherny, S. S., Cookson, W. O. & Cardon, L. R. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* **30**, 97–101 (2002).
10. Crooijmans, R. P. M. A. *et al.* Large scale variation in DNA copy number in chicken breeds. *BMC Genomics* **14**, 398 (2013).
11. Conrad, D. F. *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* **464**, 704–712 (2010).
12. Coffey, A. J. *et al.* The GENCODE exome: sequencing the complete human exome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **19**, 827–831 (2011).
13. Lindenbaum, P., Le Scouarnec, S., Portero, V. & Redon, R. Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **27**, 3200–3201 (2011).
14. Loussouarn, G. *et al.* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J.* **22**, 5412–5421 (2003).
15. Di Diego, J. M. *et al.* Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* **106**, 2004–2011 (2002).
16. Marionneau, C. *et al.* The sodium channel accessory subunit Navβ1 regulates neuronal excitability through modulation of repolarizing voltage-gated K⁺ channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 5716–5727 (2012).
17. Delpón, E. *et al.* Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **1**, 209–218 (2008).
18. Giudicessi, J. R. *et al.* Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* **8**, 1024–1032 (2011).
19. Gaborit, N. *et al.* Gender-related differences in ion-channel and transporter subunit expression in non-diseased human hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 639–646 (2010).

20. Yang, E. K., Alvira, M. R., Levitan, E. S. & Takimoto, K. Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J. Biol. Chem.* **276**, 4839–4844 (2001).
21. Giudicessi, J. R. *et al.* Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* **8**, 1024–1032 (2011).
22. Gaborit, N. *et al.* Gender-related differences in ion-channel and transporter subunit expression in non-diseased human hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 639–646 (2010).
23. Gulbis, J. M., Mann, S. & MacKinnon, R. Structure of a Voltage-Dependent K⁺ Channel β Subunit. *Cell* **97**, 943–952 (1999).
24. Yan, G. X. & Antzelevitch, C. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* **100**, 1660–1666 (1999).
25. Delpón, E. *et al.* Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **1**, 209–218 (2008).

Legends of figures

Figure 1: Genetic findings

(A) Pedigree of the family. (B) LOD-score profile obtained by genome-wide linkage analysis. The red line indicates the LOD-score threshold of 0.7 used to filter DNA variants of interest. (C) Numbers of DNA variants selected through successive filtering steps. (D) Capillary sequencing confirmed that all affected siblings carry a private missense variant in the *KCNAB2* gene (c.35 G>A), inherited from their father who presents with a left-bundle branch block. The variant was not found in their unaffected mother and sister (as shown in panel A).

Figure 2: Electrocardiogram records on family members

(A) Twelve-lead electrocardiograms from holter recording on the proband and his relatives. (B) Event of ventricular tachycardia recorded on the proband.

Figure 3: Effects of Kvβ2 R12Q mutation on transient outward current (I_{to}) generated by Kv4.3 channel

(A) Superimposed representative currents activated by a 1-s pulse (only the first 100 ms are shown) to various potentials (from -40mV to +60 mV, 20-mV increments; holding potential: -80 mV) obtained from COS-7 cells expressing either Kv4.3 and either wild-type (WT; top) or R12Q (bottom) Kvβ2. (B) Current density/voltage relationship of I_{to} recorded from COS-7 cells expressing Kv4.3 and WT Kvβ2 (squares; n = 10), WT + R12Q Kvβ2 (triangles; n = 9) or R12Q Kvβ2 (circles; n = 9). Inset: voltage-clamp protocol. *, **, ***: p< 0.05, p< 0.01 and p< 0.001, respectively, versus corresponding WT value.

Figure 4. The R12Q mutation increases the sub-membrane expression of heterologously expressed Kvβ2 without altering interaction with Kv4.3 and (total and cell surface) expression of Kv4.3

Forty-eight hours following transfection of COS-7 cells with cDNA constructs encoding Kv4.3, Kvβ2-WT and/or Kvβ2-R12Q, cell lysates were prepared and used in immunoprecipitation experiments with an RbαKv4.3 antibody, or in cell surface biotinylation assays. (A) Western blot analyses of lysates (left) and RbαKv4.3 immunoprecipitates (right) probed with anti-Kv4.3, anti-Kvβ2 and anti-Transferrin receptor (TransR) antibodies revealed that the R12Q mutation does not alter the coimmunoprecipitation of Kvβ2 with Kv4.3. (B)

Representative Western blots of total (left) and biotinylated (right) Kv4.3 and Kvβ2 fractions from transfected COS-7 cells. Western blot analyses of β-actin confirmed that biotinylated fractions are not contaminated by cytoplasmic proteins. **(C)** Mean ± SEM total (n=4-5) and biotinylated (n=5) Kv4.3 and Kvβ2 fractions from COS-7 cells transfected with Kv4.3 + Kvβ2-WT, Kv4.3 + Kvβ2-WT + Kvβ2-R12Q (heterozygous condition) or Kv4.3 + Kvβ2-R12Q. Expression of Kv4.3 and Kvβ2 (total and biotinylated fractions) in each sample was normalized to the TransR protein in the same blot and then expressed relative to Kv4.3 or Kvβ2 (total and biotinylated fractions) in cells expressing Kv4.3 + Kvβ2-WT. Whereas no changes in Kv4.3 (total and biotinylated) were observed, relative (mean ± SEM) Kvβ2 submembrane expression was significantly (*, $p < 0.05$) higher in cells transfected with Kv4.3 + Kvβ2-R12Q than in cells expressing Kv4.3 + Kvβ2-WT.

Figure 5: Modeling the effect of the R12Q variant at the heterozygous state

(A) The Kv4.3 current density is increased by an averaged factor of 4 at +60mV, and by a minimal factor of 2 when considering only the upper limit for the WT condition and the lower limit for the heterozygous R12Q condition. **(B)** Action potentials of the subendocardial (endo; cell), midmyocardial (mid) and subepicardial (epi), corresponding respectively to cells 15, 80 and 150 in a 165 cell fiber (thin, dashed, thick lines) in control condition (top traces) and in presence of a 2-fold (middle traces) or a 4-fold (bottom traces) increase in I_{to} . Shown is the 10th beat at 1 Hz. **(C)** Corresponding right ventricular outflow tract wedge pseudo-ECG, in arbitrary units. **(D)** Heat map of voltage in space and time (vertical and horizontal axes, respectively) in control condition, and in the presence of a 2-fold and 4-fold increase in $I_{to,f}$ conductance (G_{to}). Stimulation (stim→) was given on cell 1. In all conditions, there was zero I_{to} in subendocardium (endo), and 85% as much in midmyocardial (M) as in subepicardium (epi).

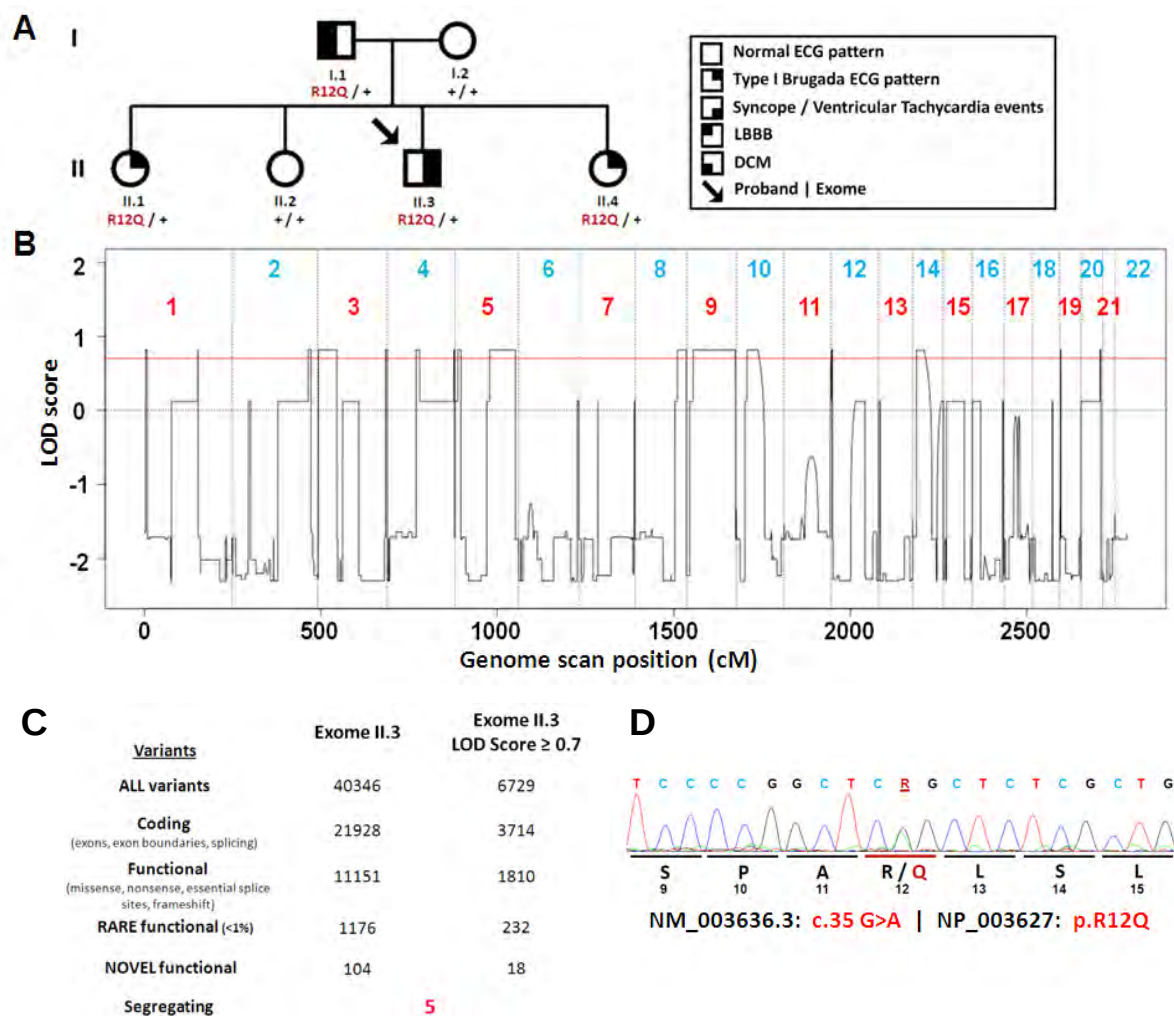


Figure 1

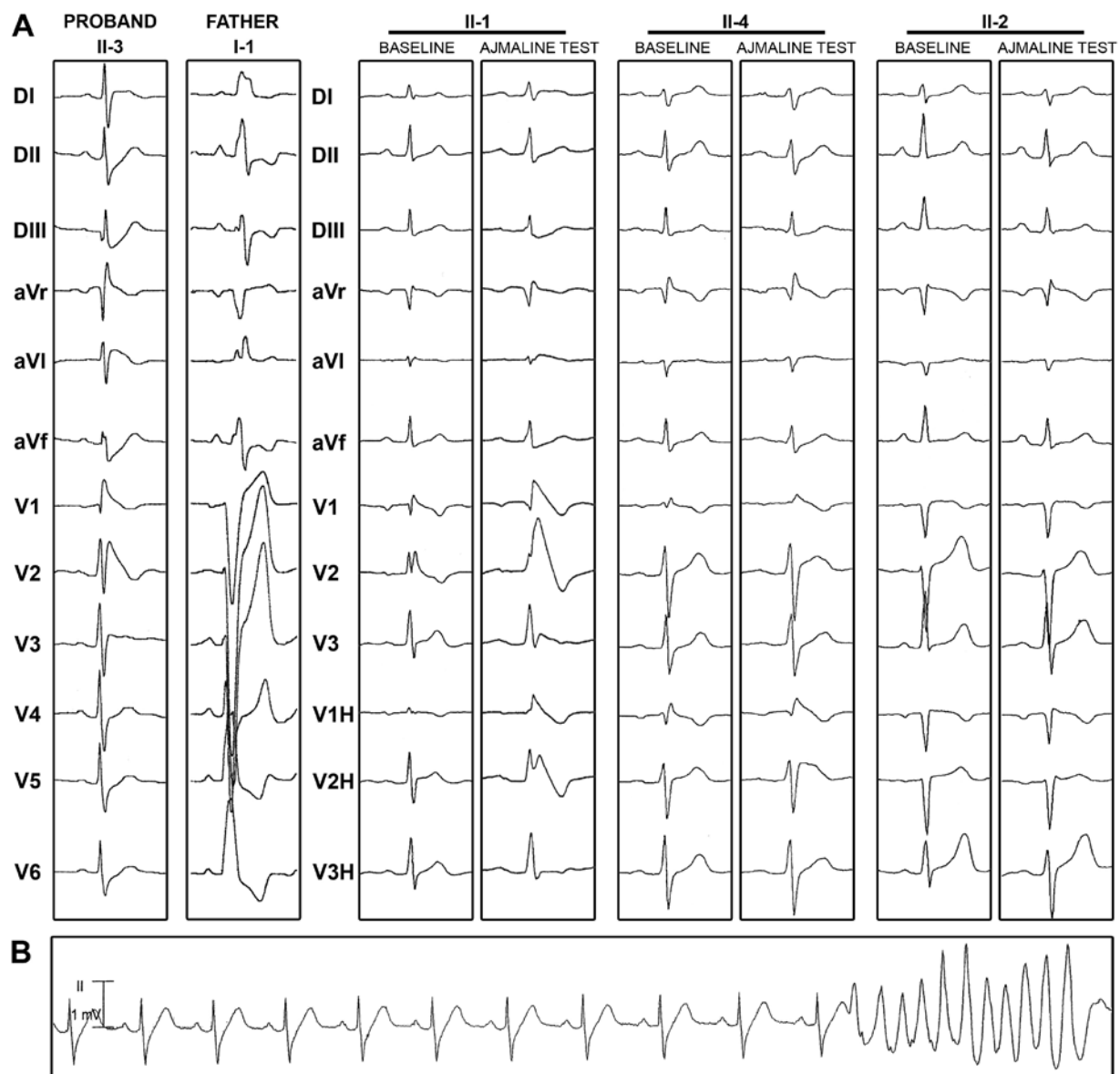


Figure 2

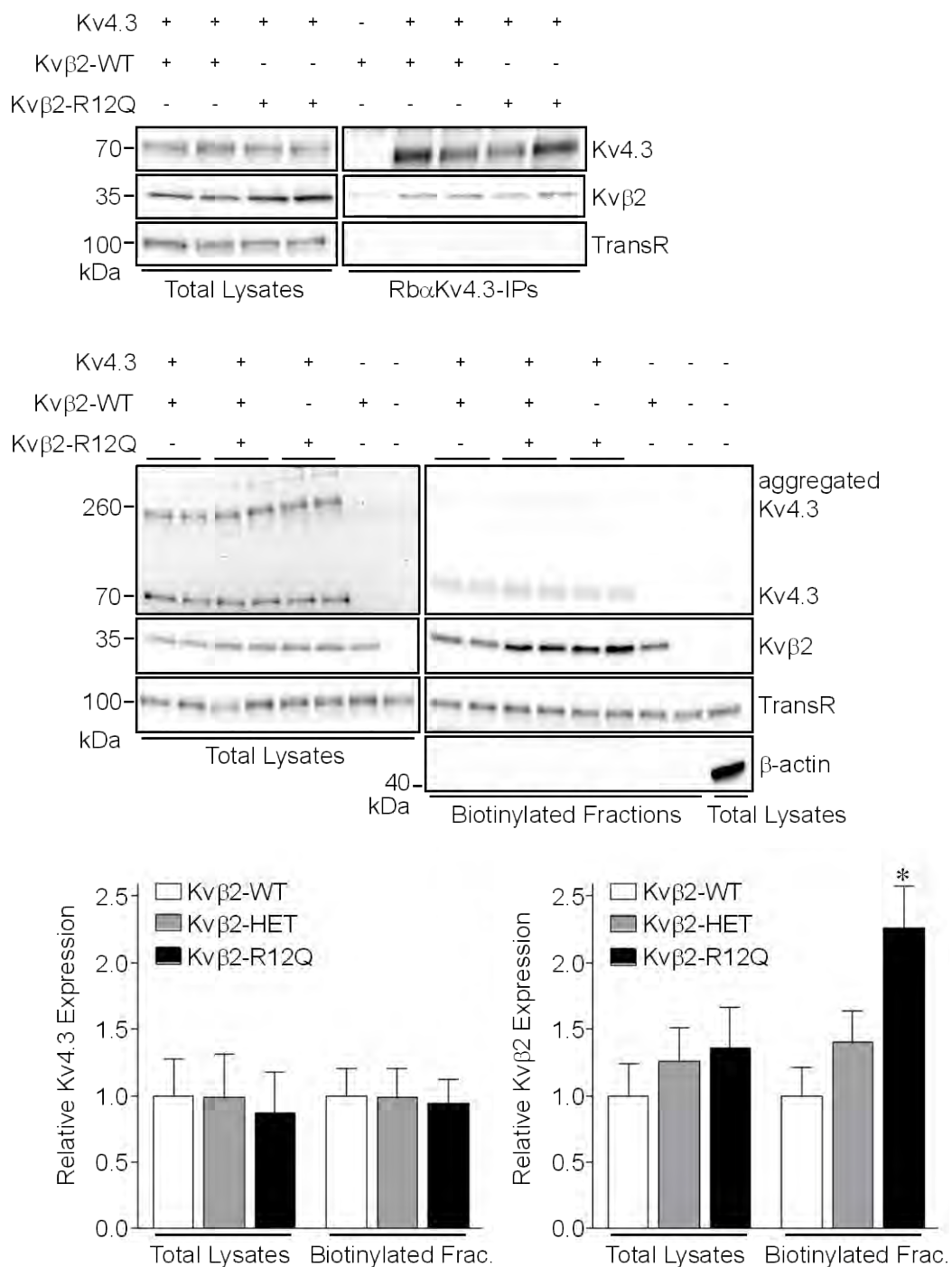


Figure 4

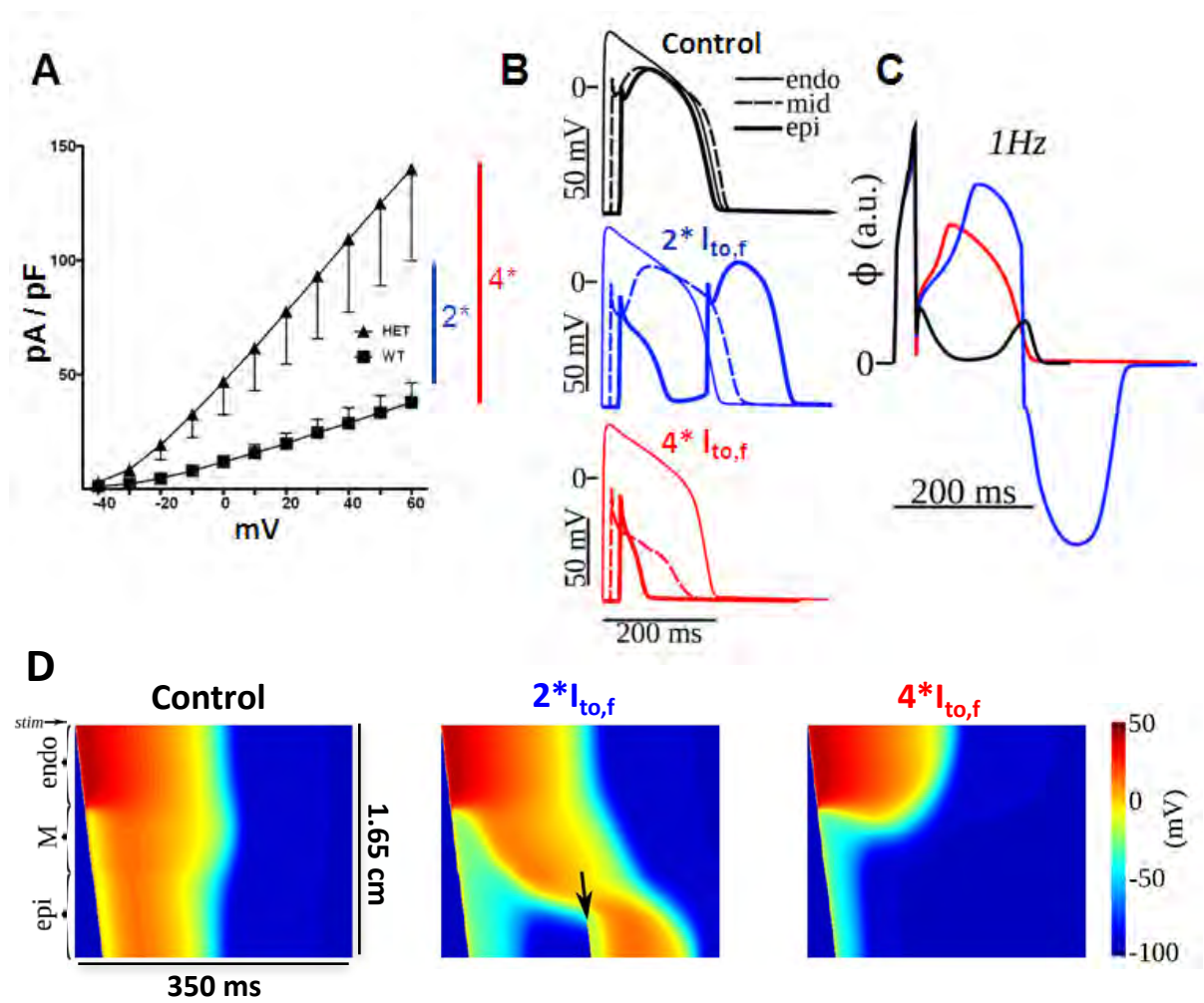


Figure 5

➤ Conclusion et Discussion de l'implication de *KCNAB2* dans le SBr

La protéine Kvβ2 fait partie de la famille des aldoketoreductases et présente différents transcrits humains (Figure 40). Compte-tenu du fait que le variant R12Q est situé dans le premier exon des transcrits CCDS55 et CCDS56 (consensus coding domain sequence), la première étape a été d'identifier le transcrit majoritaire dans le cœur humain de manière à poursuivre l'analyse de l'effet fonctionnel du variant R12Q (Figure 40).

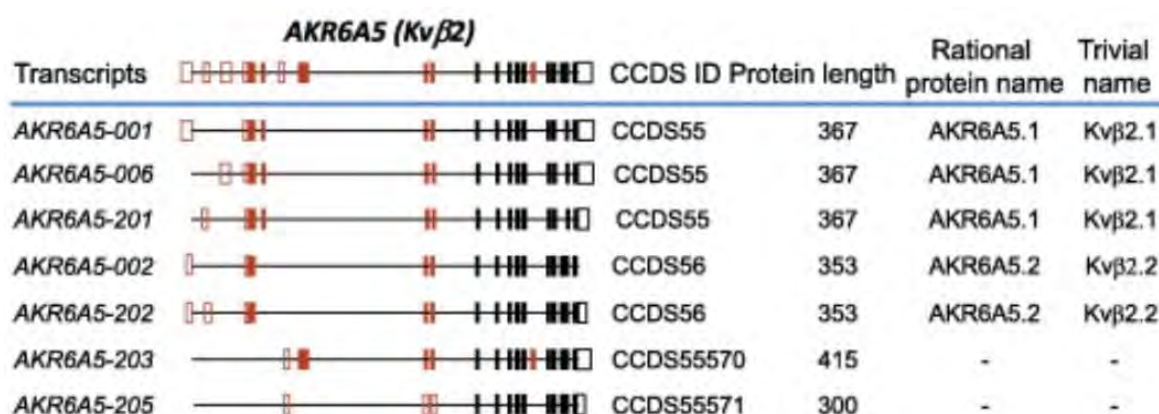


Figure 41 – Epissage alternatif du gène *KCNAB2* chez l'homme décrit dans les bases Ensembl et NCBI Genbank

Sont représentés en noir, les parties constitutives du gène, en rouge les exons alternatifs et en blanc les parties non traduites. (Barski et al., 2013).

Pour cela, une expérience de RT-PCR sur différent tissus humains a été effectuée, en plaçant les amorces dans une zone permettant d'obtenir des produits d'amplification de tailles différentes en fonction de la présence des deux sous types de transcrits. Nous avons donc identifié qu'entre les 2 formes CCDS55 et CCDS56, la plus exprimée dans le cœur humain est la forme CCDS55 codant pour une protéine de 367 acides aminés (Figure 41).

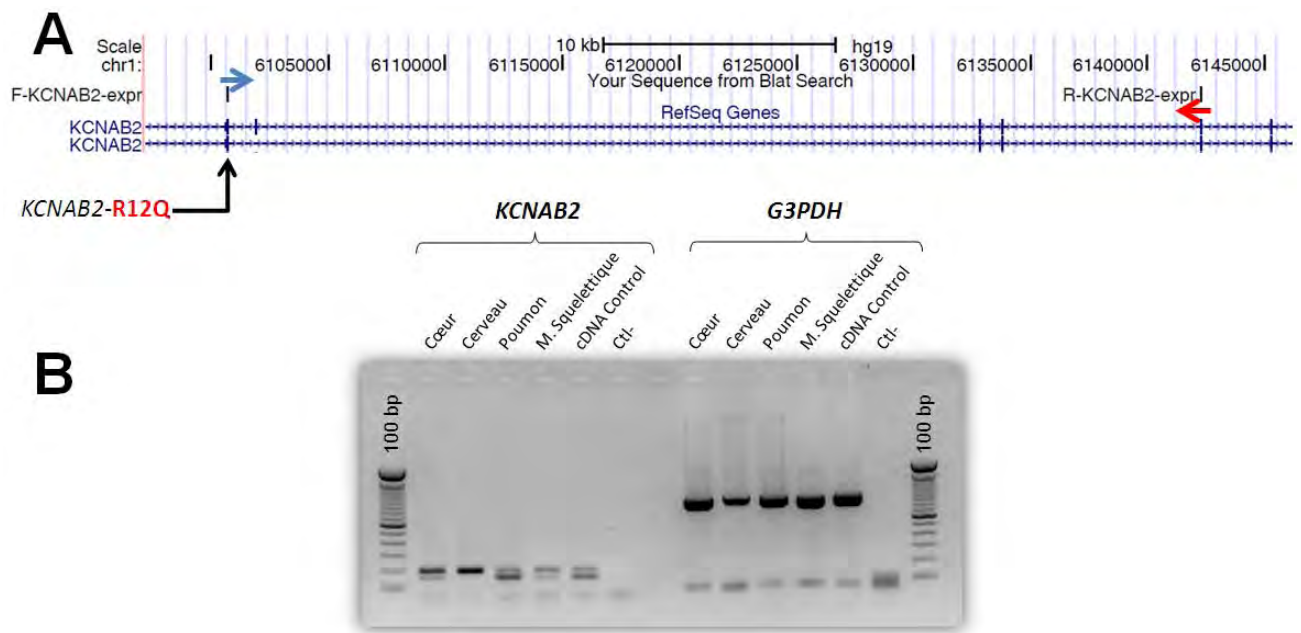


Figure 42 – Identification du transcrit *KCNAB2* majoritaire cardiaque

A- représentation du positionnement génomique des amorces de RT-PCR dans la séquence codante du gène *KCNAB2* ainsi que la localisation du variant R12Q. **B-** Profil de migration électrophorétique sur gel d'agarose des produits de RT-PCR sur tissus humain. Le CCDS55 est la forme majoritaire par rapport au CCDS56 dans le cœur humain. Dans le cerveau, seul le CCDS56 est exprimé.

Le gène *KCNAB2* est très peu polymorphe chez l'humain, on ne compte dans les bases de données qu'une seule variation faux-sens supérieure à 1% (rs11589347) dans la population générale. Ce SNP faux sens se trouve dans un exon spécifique du CCDS55570 dont nous n'avons pas testé l'expression cardiaque humaine. Dans son ensemble, d'après la base « exome variant server », le gène ne compte que 11 variants faux sens et 1 variant stop présentant tous une fréquence allélique inférieure à 1% dans la population générale.

Une étude réalisée par Vacher et coll, a identifié des sites de phosphorylation de la protéine Kvβ2 dans le cerveau de rat par spectrométrie de masse (Vacher et al., 2011). L'étude de ces sites de phosphorylation a consisté ensuite à muter les sérines en alanine (S9A, S20A, S31A, S112A, et S9A/S31A) au niveau des sites identifiés et à étudier l'effet de ces mutations sur l'activité du canal potassique neuronal voltage dépendant Kv1.2 (Figure 42-A). Comme pour Kv4.3, la protéine Kvβ2 engendre sur le canal Kv1.2 une augmentation de la densité de courant. Dans ce travail, des expériences de voltage-imposé en configuration cellule entière ont montré que la

mutation S31A provoque une incapacité de la sous unité Kv β 2 à augmenter la densité de courant générée par Kv1.2 (Figure 42-C). De plus, cette étude montre que dans les neurones, Kv β 2 semble, lorsqu'elle est présente, augmenter la localisation de la protéine Kv1.2 dans la fraction axonale par rapport à la fraction dendritique (Figure 42-B). Cet effet est abolit dans le cas des mutations des S9A et S31A suggérant une importance capitale de ces 2 sites de phosphorylation dans la régulation de la protéine Kv β 2.

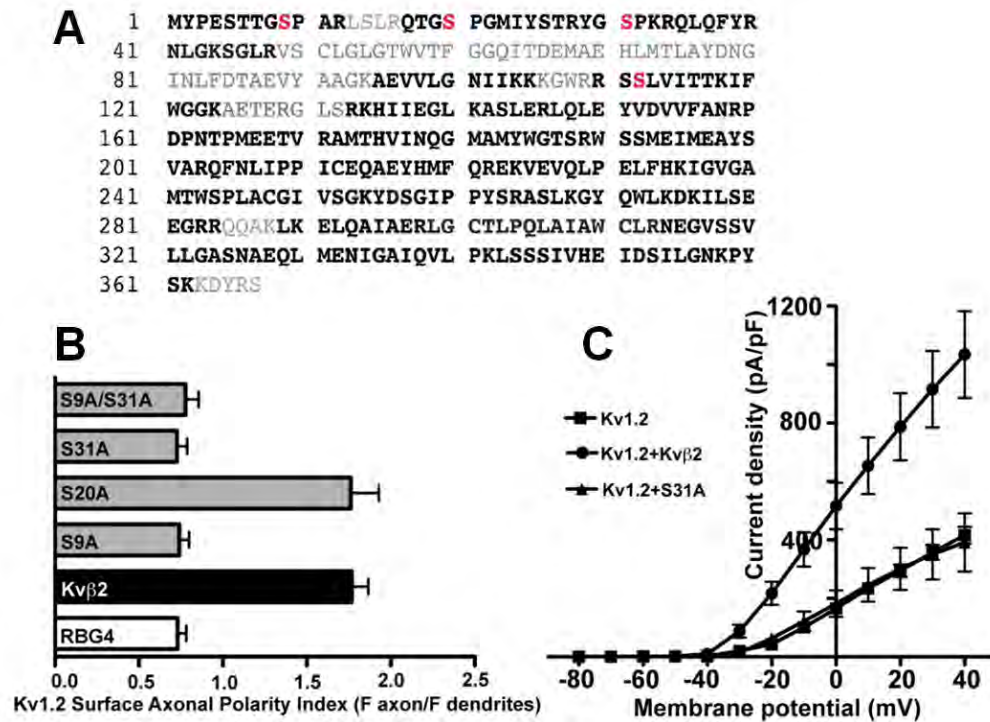


Figure 43 – Etude des sites de phosphorylation de la protéine Kv β 2 identifiés dans le cerveau de rat

A- En rouge sont représentés les positions des sérines, identifiées comme sites de phosphorylation, ayant été mutées en alanine de manière à simuler une perte de la phosphorylation. **B-** Rapport de localisation Axone / dendrite de la détection de la protéine Kv1.2 lorsque co-exprimée avec les différentes formes mutées de Kv β 2. **C-** Expériences de Voltage clamp en configuration cellule entière de l'influence de la mutation S31A sur la densité de courant de la protéine Kv1.2. (modifié selon Vacher et al., 2011)

La séquence de la protéine Kv β 2 humaine et celle du rat ne diffèrent que de quatre acides aminés en position 71, 208, 328 et 348 (Figure 43). Il est donc envisageable, compte-tenu de l'homologie de séquence de *KCNAB2* entre ces deux espèces, d'extrapoler les résultats obtenus dans cette étude.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Rat-kcnab2      MYPESTTGSPARLSLRQTGSPGMIYSTRYGSPKRQLQFYRNLGKSGLRVSCGLGLGTWVTF 60
human-KCNAB2    MYPESTTGSPARLSLRQTGSPGMIYSTRYGSPKRQLQFYRNLGKSGLRVSCGLGLGTWVTF 60
*****

Rat-kcnab2      GGQITDEMAEHLMTLAYDNGINLFDTAEVYAAGKAEVVLGNIKKKGWRRSSLVITTKIF 120
human-KCNAB2    GGQITDEMAEQMLTAYDNGINLFDTAEVYAAGKAEVVLGNIKKKGWRRSSLVITTKIF 120
*****;*****

Rat-kcnab2      WGGKAETERGLSRKHIIIEGLKASLERLQLEYVDVVFANRPDNPTEETVRAMTHVINQG 180
human-KCNAB2    WGGKAETERGLSRKHIIIEGLKASLERLQLEYVDVVFANRPDNPTEETVRAMTHVINQG 180
*****

Rat-kcnab2      MAMYWGTSRWSSMEIMEAYSVARQFNLTTPICEQAEYHMFQREKVEVQLPELFHKIGVGA 240
human-KCNAB2    MAMYWGTSRWSSMEIMEAYSVARQFNLTTPICEQAEYHMFQREKVEVQLPELFHKIGVGA 240
*****

Rat-kcnab2      MTWSPLACGIVSGKYDSGIPPYSRASLKGYQWLKDKILSEEGRRQQAQKLKELQAIAERLG 300
human-KCNAB2    MTWSPLACGIVSGKYDSGIPPYSRASLKGYQWLKDKILSEEGRRQQAQKLKELQAIAERLG 300
*****

Rat-kcnab2      CTLPQLAIAWCLRNEGVSSVLLGASNAEQLMENIGAIQVLPKLSSSIVHEIDSILGNKPY 360
human-KCNAB2    CTLPQLAIAWCLRNEGVSSVLLGASNADQLMENIGAIQVLPKLSSSIHEIDSILGNKPY 360
*****;*****;*****

Rat-kcnab2      SKKDYRS 367
human-KCNAB2    SKKDYRS 367
*****

```

Figure 44 - comparaison entre la séquence de référence de la protéine Kvβ2 de rat (NP_05900) par rapport à la séquence humaine (NP_00362)

L'alignement a été réalisé grâce au site Clustalw.

La mutation identifiée dans l'analyse familiale de la famille SBr17 (*KCNAB2*-R12Q) se trouve 3 acides aminés après la S9. Il se trouve que le changement d'aminé de la mutation R12Q est prédit par le site NetPhos (Blom et al., 1999) comme altérant le site de phosphorylation en S9 (Figure 44). Ce résultat *in silico* suggère l'intervention d'un mécanisme de phosphorylation dans l'effet observé de la mutation R12Q sur le canal Kv4.3. Les 2 meilleurs scores de prédiction de phosphorylation de ce site sont attribués par l'algorithme de prédiction aux protéines kinases Cdk5 (score 0.71) et GSK3 (score 0.5).

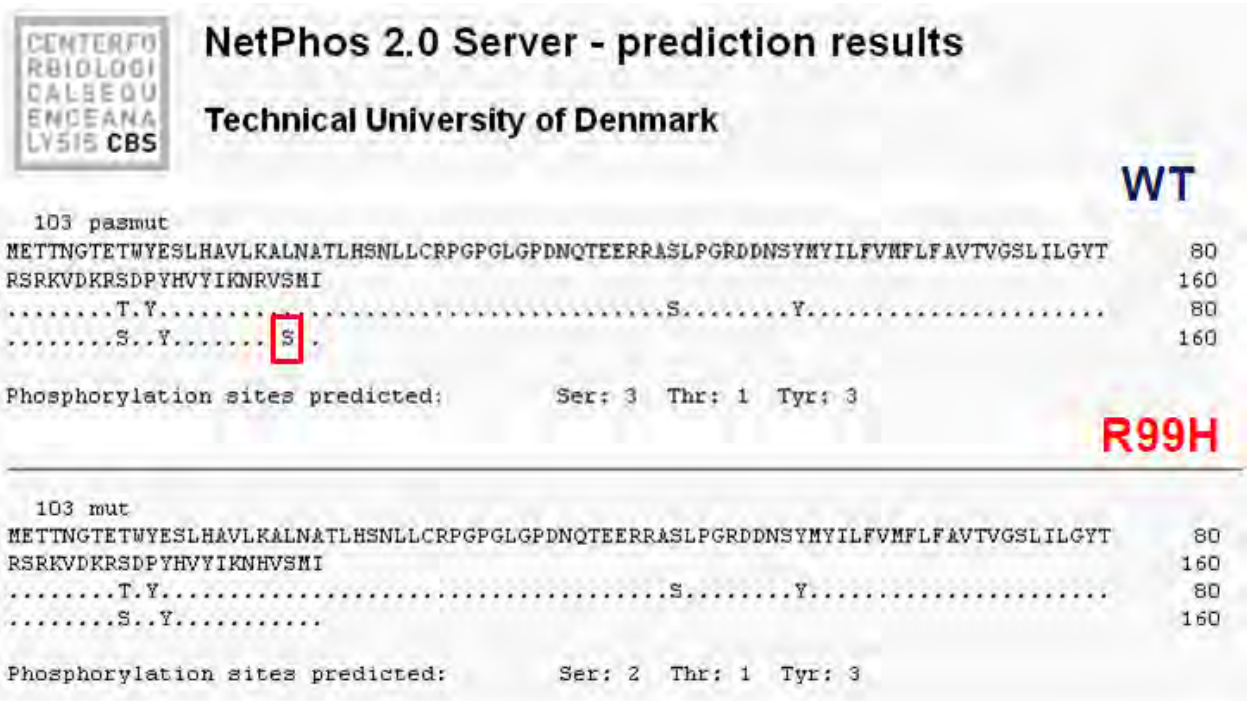


Figure 46 - prédiction de la modification de site de phosphorylation par NetPhos pour la mutation R99H du gène *KCNE3*.

La sérine en position 101 de la protéine MiRP2 est prédite comme étant phosphorylée par la PKA (score 0.69).

En conclusion, l'identification du gène *KCNAB2* dans le SBr et la mise en évidence de ses mécanismes de régulation ouvre une nouvelle voie permettant d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques dans le SBr. D'autre part, cette étude, bien que réalisée sur une petite famille, montre que grâce aux nouvelles technologies et l'incrémentation des bases de données génomiques, il est désormais possible d'identifier une cause génétique dans des analyses familiales nucléaires.

III.4. Identification du gène *CLASP2*

➤ *Description clinique de la famille SBr3*

En 2002, un homme de 23 ans a été hospitalisé au CHU de Nantes pour l'exploration d'une syncope à l'emporte-pièce. Le diagnostic du SBr a été posé devant un aspect électrocardiographique de type I dans les dérivations précordiales droites au 3^{ème} espace intercostal alors que les examens cliniques, biologiques et échocardiographiques étaient normaux. Un test provocatif à la flécaïnide est venu confirmer le diagnostic de SBr (Figure 46-A). Le patient avait refusé l'implantation d'un défibrillateur et la réalisation d'un dépistage familial.

Un an plus tard, un homme de 44 ans a été hospitalisé pour une syncope conduisant au diagnostic de SBr (Figure 46B). Il portait le même nom de famille que le premier patient et il s'est avéré après réalisation d'un arbre généalogique qu'ils étaient cousins par un second mariage de leur grand-père. L'arbre généalogique de la famille SBr3 est représenté en Figure 47.

Le dépistage familial a finalement été accepté aboutissant à une famille de 34 individus apparentés dont 8 étaient atteints du SBr, 11 présentent un ECG normal après test pharmacologique, 9 individus présentent un ECG normal mais n'ont pas subi de test pharmacologique, 2 sont considérés comme transmetteurs obligatoires. Entre temps, le père (II.8) du premier propositus (III.14) est décédé d'une mort subite possiblement liée à un trouble du rythme ventriculaire. Parmi les 8 atteints, on note une nette prédominance masculine avec 6 hommes pour 2 femmes. Le test à la flécaïnide a permis de démasquer un tracé électrocardiographique SBr de type 1 chez 7 individus et de confirmer celui du premier propositus (III.14). La durée moyenne des intervalles QRS, PR et QTc des 9 individus atteints est de, respectivement 98, 163 et 408 ms.

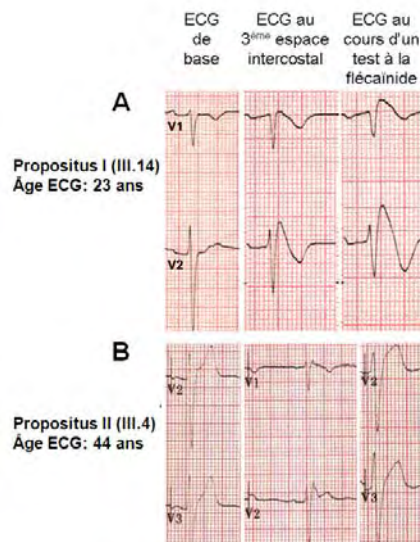


Figure 47 – Electrocardiogrammes de base, au 3ème espace intercostal et au cours d’un test à la flécaïnide A du premier propositus et B du deuxième propositus de la famille SBr3

ECGs des dérivation précordiales V1 et V2 des individus III.14 (A) et III.4 (B)

➤ *Analyse génétique de la famille SBr3,*

Pour l’analyse de la famille SBr3, nous avons procédé à une analyse d’identité par descendance de manière à identifier les haplotypes partagées par les individus atteints. Les génotypes de chaque patient ont été comparés deux à deux grâce à l’algorithme IBDLD. Les régions présentant une forte probabilité de ne pas être partagées entre paires ont été exclues et nous avons ainsi pu obtenir un score de partage des régions chromosomiques par paires d’individus partageant une même région chromosomique. Le statut génotypique de 5 individus (entourés d’un cercle rouge dans la Figure 47-A) a été comparé. Ainsi, le nombre maximal de paires obtenu lorsqu’un haplotype est partagé parmi tous les individus atteints est de 10 paires (Figure 47-B*). La première région de 19 Mb située sur le chromosome 3 en 3p24, inclut le gène *GPD1L* identifié dans le SBr. Cependant, Le criblage du gène *GPD1L* dans cette famille n’a révélé aucun variant potentiellement causal. Le deuxième haplotype partagé entre les individus atteints se trouve sur le chromosome 4 locus en 4q32 et représente un intervalle de 25 Mb. Aucun remaniement chromosomique n’a été détecté par CGH-array chez l’individu II.16.

Le séquençage d’exome de l’individu II.16 a révélé un variant faux-sens privé sur le gène *FNIP2* dans l’intervalle du chromosome 3. Cependant ce variant n’est pas porté par l’haplotype morbide et ne ségrège donc pas avec la pathologie (voir Figure 47-C*). Compte-tenu des données de la

littérature reportant les défauts de ségrégation des variants portés par *SCN5A* dans des études familiales du SBr, nous avons considéré qu'accepter qu'un individu atteint puisse potentiellement présenter le même phénotype sans porter le déterminisme génétique commun à la majorité des individus atteints de la famille était acceptable. Nous avons donc élargi l'analyse IBD en autorisant la présence d'une phénocopie dans la famille SBr3. Si l'on considère une phénocopie, cela revient à s'intéresser aux haplotypes présentant un score de 6 paires d'individus en considérant la valeur maximale à 10 (Figure 47-B**).

L'analyse des données d'exome dans les régions partagées en considérant une phénocopie potentielle a révélé la présence de 6 variants faux-sens privés (Figure 47-C**).

Seul un variant faux-sens CLASP2-R658Q, ségrège avec le phénotype SBr en considérant une phénocopie. Ce variant n'est pas retrouvé dans les bases de données et présente un score GERP de conservation inter espèce élevé (5,68). Le variant CLASP2-R658Q est prédit comme altérant la fonction protéique par les algorithmes de prédiction SIFT et PolyPhen2 (Figure 49).

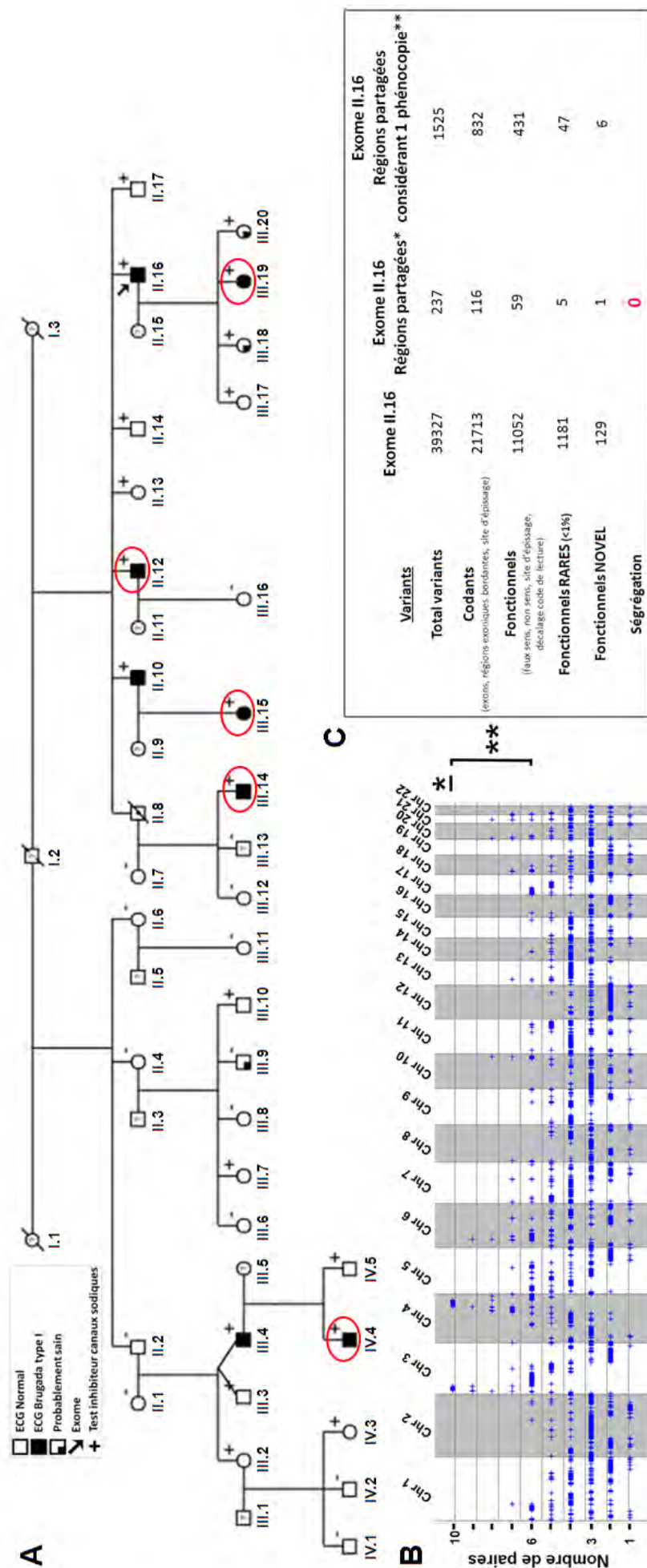


Figure 48 - Identification des régions chromosomiques partagées entre individus atteints – famille SBr3.

A - Arbre généalogique de la famille SBr3. Les génotypes des individus entourés par un cercle rouge ont été comparés deux à deux grâce à IBDLD. **B** - Représentation pour chaque autosome du degré de partage des régions chromosomiques. Les régions chromosomiques atteignant un score de partage de 10 paires d'individus correspondent aux zones partagées entre tous les individus sélectionnés. Les régions atteignant 6 paires d'individus correspondent à un non partage d'un des individus sélectionnés **D** - Tableau représentatif des filtres successifs des données de séquençage de l'individu II.16.

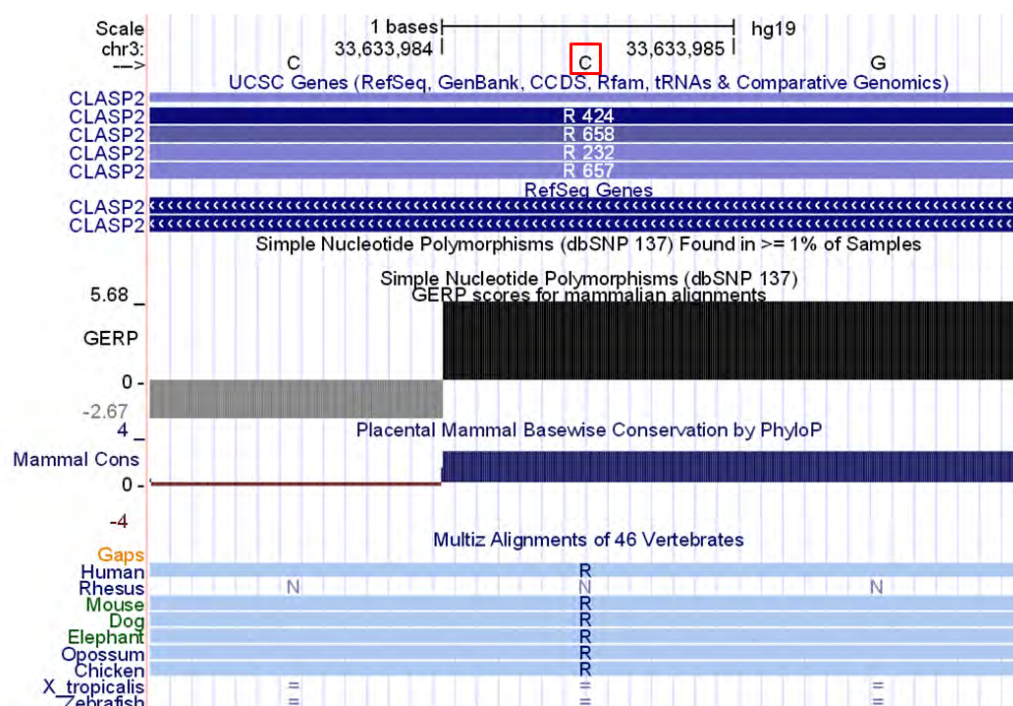


Figure 49 – Représentation du codon du gène *CLASP2* dans lequel se trouve le variant R658Q

La base nucléotidique substituée (C>T) est encadrée en rouge. L'acide aminé retrouvé à cette position chez différentes espèces est précisé ainsi que les scores de conservation GERP et PhyloP.

La représentation de la relation génotype / phénotype considérant le variant *CLASP2*-R658 est décrite dans la Figure 50. L'individu atteint IV.4 délimite l'intervalle du chromosome 3 (Hg19: chr3:12861608-32413126) en centromérique et de manière prévisible n'est pas porteur du variant. Cet individu présente cependant un tracé SBr de type 1 après test pharmacologique (Figure 51).

PPH2	NM_015097: c.1973 G>A	NOVEL
	NP_055912: p.R658Q	
	Possibly Damaging	
SIFT	AFFECT PROTEIN FUNCTION	

Figure 50- résultat des prédictions d'effet du variant pR658Q par les algorithmes SIFT et Polyphen2

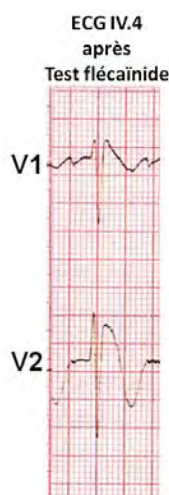


Figure 52 – ECG de l'individu IV.4 dans les dérivation V1 et V2 après test à la flécaïnide

Le tracé ECG révèle un SBr de type I chez l'individu IV.4 après test pharmacologique.

L'intervalle du chromosome 4 partagé entre les individus atteints est quant à lui délimité à son extrémité télomérique par l'individu II.16 dont nous avons les données d'exome. Si un deuxième variant impliqué dans le phénotype SBr dans cette famille se trouve dans cette région, il ne pourra pas être détecté par le séquençage de l'individu II.16. Nous avons donc entrepris le séquençage de l'individu IV.4 (en cours de réalisation) de manière à visualiser les variants potentiels présents sur cet intervalle du chromosome 4, non portés par l'individu II.16, dont l'exome a été séquencé précédemment.

Le séquençage de l'individu IV.4 va également permettre de vérifier si certains variants n'auraient pas été détectés dans les intervalles chromosomiques d'intérêt chez le patient II.16. Cette hypothèse est peu probable compte-tenu du fait que nous avons séquencé par séquençage capillaire l'ensemble des exons présentant une faible couverture dans haplotypes partagés entre individus atteints.

➤ *Criblage du gène CLASP2 sur une cohorte de 357 patients SBr*

L'ensemble des parties codantes du gène *CLASP2* ont été criblées par séquençage capillaire dans un premier temps sur 190 individus atteints du SBr et non reliés entre eux. Le séquençage a révélé la présence de 3 autres variants faux sens privés ainsi que d'un variant R625Q retrouvé à une fréquence allélique de 0,14% dans la population générale (Exome Variant Server). Le variant

CLASP2-R625Q est présent chez le fils du patient séquencé atteint du syndrome de Brugada et absent chez sa fille saine.

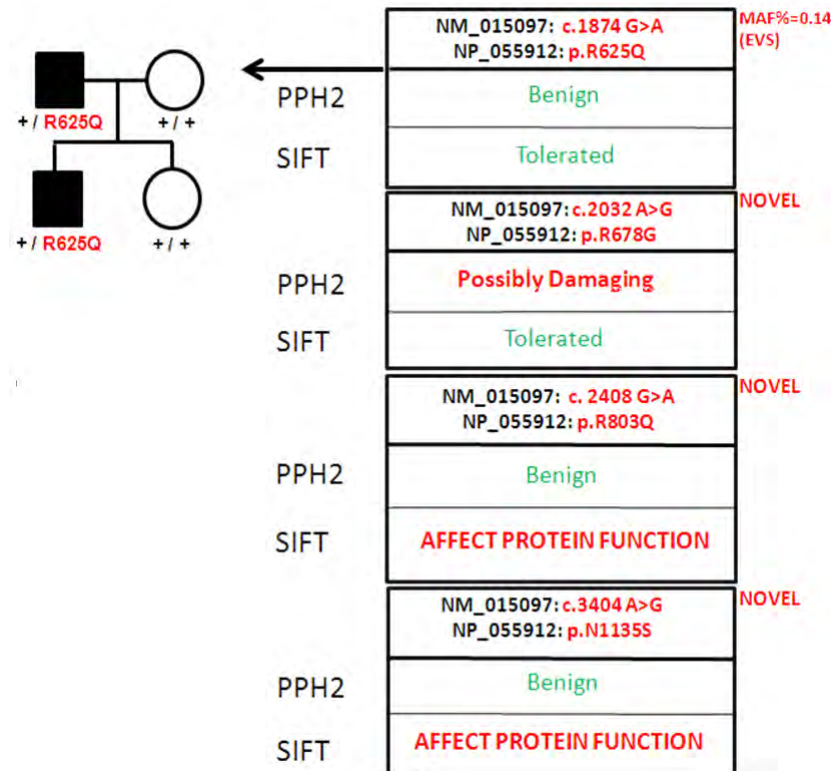


Figure 53 – Résultats du criblage des parties codantes du gène *CLASP2* par séquençage capillaire sur une cohorte de 190 individus.

La prédiction du caractère délétère par les algorithmes SIFT et Polyphen2 est précisée pour chaque variant.

Le gène *CLASP2* ayant été inclus dans le système de capture Haloplex, 167 patients additionnels ont été séquencés pour ce gène. Un autre variant rare (EVS ; MAF(%)=0,52%), faux sens, a été détecté chez un patient SBr ainsi que chez un patient atteint de Bloc auriculo ventriculaire. Ce variant, validé par séquençage capillaire, change une Thréonine en Isoleucine en position 1116 de la protéine CLASP2 (NP_055912 : p.T1116I). Le nucléotide changé (NM_015097 : c.3347 G>A) présente un score de conservation nucléotidique élevé (GERP score= 5.73) et est prédit comme altérant la fonction du gène par PPH2.

Un autre variant faux sens parmi les 167 patients SBr a été détecté et deux autres variants faux sens, dont un privé, ont été détectés parmi les 86 patients souffrant de bloc auriculo ventriculaire. Ces variants n'ont pas encore été validés par séquençage capillaire.

Aucun variant n'a été détecté ni dans la population contrôle (167 individus) séquencée par cette technologie ni dans les patients souffrant du syndrome de repolarisation précoce (88 patients). Le fait que des variant rares soient retrouvés uniquement dans le SBr et les blocs de conduction auriculo ventriculaire renforce notre hypothèse d'implication du gène *CLASP2* dans la pathologie, d'autant plus que ces deux syndromes sont considérés comme des syndromes chevauchants.

➤ Détermination du transcrit majoritaire cardiaque du gène *CLASP2*

Le gène *CLASP2* présentant 2 transcrits RefSeq, nous avons réalisé une expérience de RT-PCR sur différents tissus humains en plaçant les amorces dans une zone permettant d'obtenir des produits d'amplification de tailles différentes en fonction de la présence des deux transcrits (Figure 53). Nous avons ainsi identifié que seul le transcrit cardiaque NM_015097 est exprimé dans le cœur humain. Le transcrit NM_015097 code pour l'isoforme longue du gène *CLASP2*.

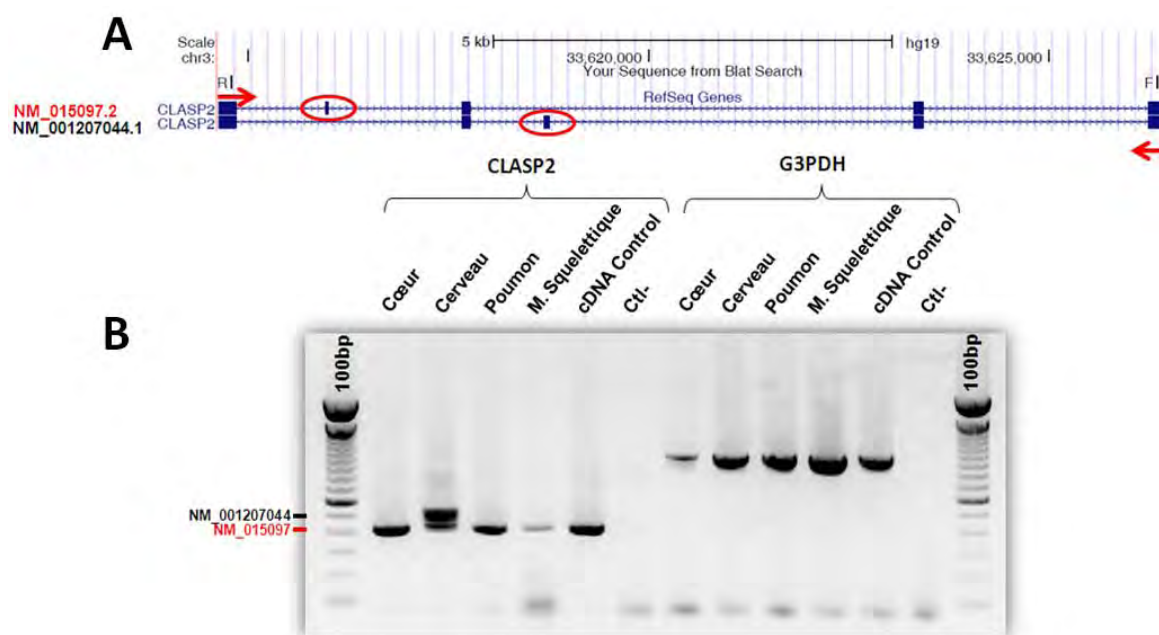


Figure 54 – Identification du transcrit *CLASP2* RefSeq majoritaire cardiaque

A- représentation du positionnement génomique des amorces de RT-PCR. **B-** Profil de migration électrophorétique sur gel d'agarose des produits de RT-PCR sur tissus humains. Seul le transcrit NM_015097 est présent dans le cœur humain. Dans le cerveau, les deux transcrits sont présent mais c'est l'isoforme NM_001207044 qui est la plus majoritaire.

➤ *Rôle du gène CLASP2*

Le gène *CLASP2* codant pour la protéine « cytoplasmic lynker associated 2 » a initialement été décrite pour son rôle dans la stabilisation des microtubules à leur extrémité positive et son implication dans les processus de division cellulaires (Drabek et al., 2006 ; Pereira et al., 2006). L'importance de ce gène dans la régulation de la fonction synaptique dans les neurones a également été démontrée (Beffert et al., 2012).

La protéine CLASP2 interagit avec la protéine EB1 dans des motifs spécifiques SXIP présents dans la plus part des protéines se fixant aux extrémités positives des microtubules (Honnappa et al., 2009). Cette interaction entre CLASP2 et EB1 se produit grâce à des ponts salins entre arginine et acide glutamique spécifiquement dans ces régions et est régulée par la phosphorylation (Kumar et al., 2012).

Parmi les traitements anti cancéreux, le TAXOL a pour mécanisme d'action d'augmenter la polymérisation des microtubules afin de diminuer le processus de migration des cellules tumorales. Ce traitement provoque chez les patients traités des troubles de la conduction similaires à ceux observés dans les arythmies impliquant une perte de fonction du canal sodique Nav1.5 (Rowinsky et al., 1991). Une étude a montré qu'une augmentation de la polymérisation des microtubules aux extrémités positives produisait une diminution du courant I_{Na} (Casini et al., 2010).

D'autre part, une interaction des protéines EB1 et EB3 avec l'ankyrine G a été démontrée récemment dans les neurones (Leterrier et al., 2011). L'ankyrin G est connue dans le cœur pour stabiliser le canal Nav1.5 à la membrane et une étude a montré qu'une des mutations perte de fonction du gène *SCN5A* retrouvée dans le SBr pouvait provoquer une diminution d'interaction entre Nav1.5 et l'ankyrin G (Mohler et al., 2004). L'étude montrant le lien entre EB1, EB3 et l'ankyrin G met également en évidence qu'une diminution d'expression des protéines EB3 et EB1 diminue le recrutement de l'ankyrin G et également des canaux sodiques voltage dépendants dans les segments initiaux des neurones (Figure 54).

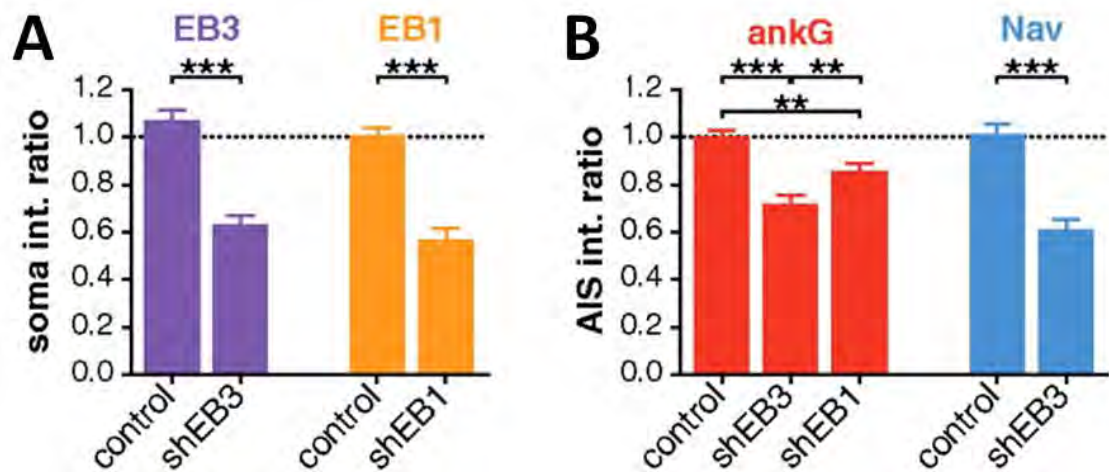


Figure 55 – Effet dans les neurones d’une diminution de l’expression des protéines EB1 et EB3 sur la localisation des canaux sodiques voltage-dépendants

A- Diminution d’expression dans les neurones des protéines EB1 et EB3 par l’utilisation de sh-RNA. B- étude de la localisation de l’ankyrin G et des canaux sodiques suite à la diminution d’expression des protéines EB1 et EB3 (modifié d’après Leterrier et al., 2011).

Ces résultats bien qu’obtenus dans un autre modèle cellulaire suggèrent l’implication de la protéine CLASP2 dans l’adressage des canaux sodiques voltage-dépendants par l’intermédiaire de la protéine ankyrin G.

➤ *Lien entre les protéines CLASP2 et Kvβ2*

D’autre part l’étude ayant décrit certains sites de phosphorylation de la protéine Kvβ2 dans le cerveau de rat, a également soulevé le fait que la perte de ces sites de phosphorylation conduisait à une perte d’adressage de la protéine Kvβ2 (Vacher et al., 2011). Il se trouve que cette étude met également en évidence le fait que les formes mutées pour les sites de phosphorylation de Kvβ2 interagissent moins avec la protéine EB1, suggérant une implication du réseau des microtubules dans la localisation cellulaire de la protéine Kvβ2.

De plus, il a été mis en évidence que la protéine kinase GSK3, prédite comme phosphorylant la sérine en position 9 de la protéine Kvβ2 (Figure 44), perturbe l’interaction des protéines CLASP2 et EB1 et contrôle la croissance des axones des neurones par une stabilisation des microtubules à leur extrémité positive (Hur et al., 2011). Une hypothèse pourrait donc consister à penser que la

protéine kinase GSK3 jouerait un rôle de régulation de l'adressage de Kv β 2, par phosphorylation directe de Kv β 2 ou par l'intermédiaire de la protéine CLASP2.

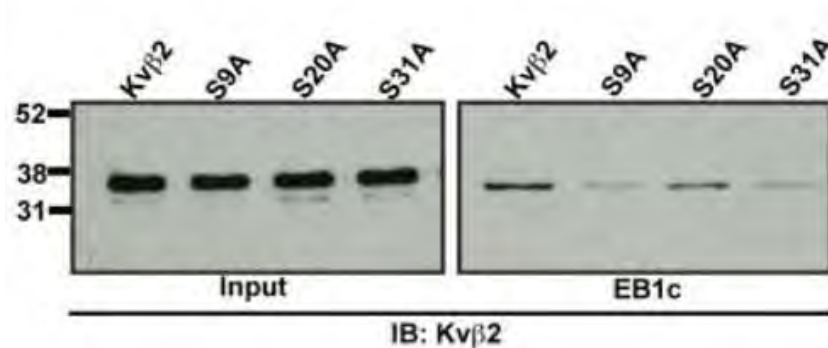


Figure 56 – Représentation de l'interaction de la protéine EB1 avec Kv β 2 WT ou mutée pour les sites de phosphorylation (S9, S20, S31)

La figure représente une expérience de co-immunoprécipitation réalisée sur des cellules neuronales de rat transfectées par la forme sauvage ou par les formes mutées au niveau des S9, S20, S31. On constate que la perte des sites de phosphorylation provoque perte d'interaction entre la protéine Kv β 2 et la protéine EB1 (modifié d'après Vacher et al., 2011).

La protéine CLASP2, d'après la littérature est donc impliquée dans l'adressage et la localisation des canaux sodiques et potassiques par l'intermédiaire de leurs sous-unités régulatrices et constitue un sujet d'étude intéressant de par son rôle central dans la régulation des canaux.

➤ **Perspectives fonctionnelles du projet CLASP2**

Après l'identification du variant CLASP2 dans la famille SBr3, nous avons contacté une équipe Hollandaise dirigée par N.GALJART possédant une souris invalidée pour le gène CLASP2. La caractérisation électrocardiographique des souris hétérozygotes n'a révélé aucune anomalie avec ou sans test pharmacologique à la flécaïnide. Une étude approfondie des mécanismes électrophysiologiques cardiaques de ces souris est envisagée en collaboration avec le groupe de C.BEZZINA.

Le variant CLASP2-R658Q (Par le transcrit *CLASP2* NM_015097) est en cours de caractérisation en système d'expression hétérologue. L'effet de ce variant sur l'activité et la localisation des canaux Nav1.5 ainsi que Kv4.3 pourra ainsi être étudié. Le lien entre CLASP2 et l'ankyrine-G ayant été mis en évidence ainsi que celui avec CLASP2 et Kv β 2, en fonction des résultats, nous envisageons de co-transfecter ces protéines partenaires des canaux impliqués dans le SBr.

La technologie des cellules iPS, maîtrisée au laboratoire, va permettre de confronter les résultats obtenus en système d'expression hétérologue par rapport à l'étude des cardiomyocytes dérivés des cellules iPS de patient. Dans ce but, des cellules iPS ont déjà été générées à partir de fibroblastes prélevés chez le patient III.4. Il va donc être possible d'évaluer un certain nombre de paramètres comme par exemple l'adressage membranaire des différents canaux impliqué dans le SBr (Nav1.5, Kv4.3 ou encore Cav1.2) ainsi que leurs sous-unités associées.

➤ ***Limites et Perspectives génétiques du projet CLASP2 de la famille SBr3***

La principale limite de l'étude familiale ayant permis d'identifier le gène *CLASP2* est la présence d'une phénocopie. Le locus du chromosome 3 inclue le gène *GPD1L* (identifié dans le SBr) et se trouve à 6 Mb du gène *SCN5A*. L'hypothèse d'une variation dans une région « Enhancer » ne peut donc pas être écartée et l'utilisation de cardiomyocytes différenciés à partir de cellules iPS de patients peut donc être d'une aide précieuse pour la vérification du taux de transcrit de ces deux gènes par rapport à des cellules iPS d'individus contrôles.

III.5. Identification du gène *RRAD*

➤ *Description clinique de la famille SBr9*

Le propositus (III.2) de la famille SBr-9, âgé de 50 ans, a bénéficié d'un ECG systématique, sur lequel on note un aspect de retard droit avec sus-décalage du segment ST définissant le tracé ECG du SBr. L'interrogatoire a révélé que le patient souffrait de réveils nocturnes avec palpitations et sensation de mort imminente mais sans perte de connaissance. Le test à la flécaïnide, réalisé dans le cadre du bilan de SBr, a entraîné une majoration du sus-décalage du segment ST (Figure 57-A) alors qu'une perfusion à l'isoprénaline rétablit un profil ECG normal dans les dérivations précordiales droites (Figure 56). La stimulation ventriculaire lors de l'exploration électrophysiologique a induit une tachycardie ventriculaire. Un défibrillateur automatique a été implanté chez ce patient.

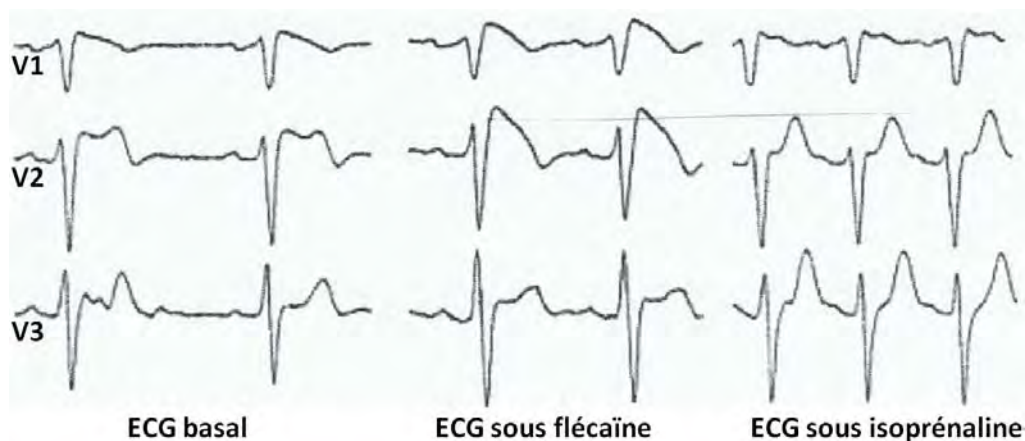


Figure 57 – Electrocardiogramme dans les dérivations précordiales droites du propositus (III.2) de la famille SBr9.

Cette figure illustre de gauche à droite, respectivement l'ECG basal, après test à la flécaïnide et sous isoprénaline, du propositus III.2 de la famille SBr9, dans les dérivations précordiales droites (V1, V2, V3).

Un des oncles maternels du propositus (individu II.3) est décédé subitement à l'âge de 41 ans, ce qui a entraîné le dépistage familial. Quatre autres membres de la famille présentent un test à la flécaïnide positif révélant un tracé SBr de type 1 et un individu présente un tracé de type 2 (III.9).

L'individu II.2 n'a pas subi de test pharmacologique compte-tenu de son âge avancé mais est considéré comme transmetteur obligatoire. L'individu III.4 présente à l'état basal un ECG normal et n'a pas souhaité recevoir le test à la flécaïnide, ce qui ne permet pas de confirmer le phénotype sain. L'enquête familiale n'a pu être poursuivie.

La fréquence cardiaque moyenne et la durée moyenne des intervalles PR, QRS et QTc des 5 individus atteints sont respectivement de 75 battements par minute et de 147, 102, 424 ms. Chez les 13 individus sains ces valeurs sont respectivement de 77 battements par minute et de 154, 91, 431 ms. Il ne semble pas exister de différence significative dans ces paramètres ECG standards entre les membres atteints et les membres sains de la famille.

➤ *Résultats génétiques de la famille SBr9*

Les haplotypes partagés entre les individus atteints IV.4, III.6, III.7 et III.8 ont été identifiés grâce à une analyse d'identité par descendance en utilisant l'algorithme IBDLD. Lorsque les quatre individus sélectionnés partagent un même locus, on obtient un score de 6 paires. La somme des intervalles identifiés représente 85,6 Mb soit approximativement 2,7% du génome total. Le nombre de variants détectés dans les zones partagées entre individus atteints représente 2,4% du total de variants détectés par séquençage d'exome de l'individu III.2.

Le nombre de variants obtenus lors des filtres successifs de l'individu III.2 sont représentés dans la Figure 57-C. Parmi les 5 variants privés, détectés par séquençage d'exome dans les régions partagées entre individus atteints, seul un variant faux sens changeant une Arginine en Histidine en position 211 sur le gène *RRAD* ségrège avec la pathologie (Figure 58 et Figure 59).

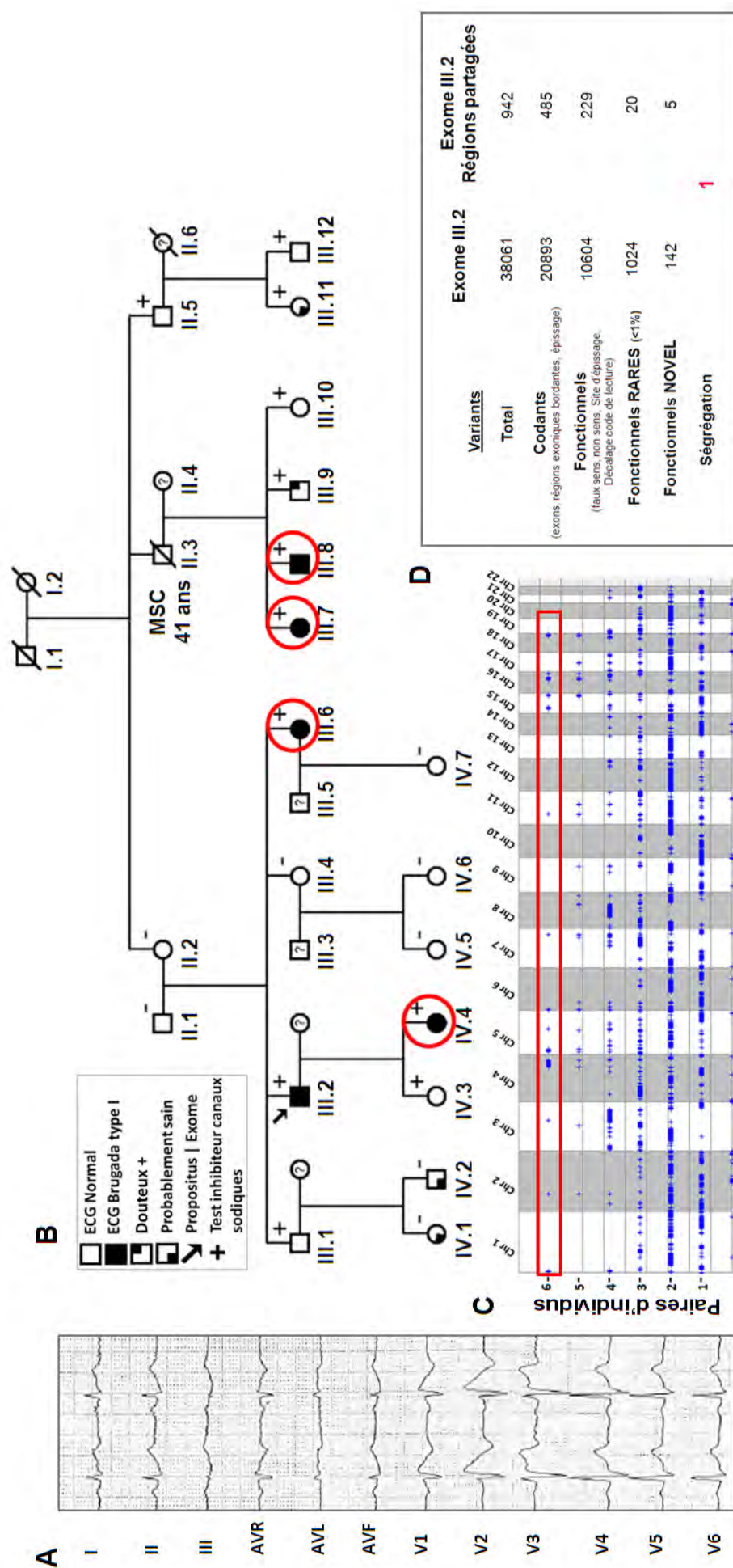


Figure 58 - Identification des régions chromosomiques partagées entre individus atteints – famille SBr9.

A - Représentation de l'ECG du propositus III.2 après test pharmacologique à la flécaïnide dans les 12 dérivations. **B** - Arbre généalogique de la famille SBr9. Les génotypes des individus entourés par un cercle rouge ont été comparés deux à deux grâce à IBDLD. **C** - Représentation pour chaque autosome du degré de partage des régions chromosomiques. Les zones partagées entre 6 paires d'individus correspondent aux zones partagées entre tous les individus sélectionnés. **D** - Tableau représentatif des filtres successifs des données de séquençage de l'individu III.

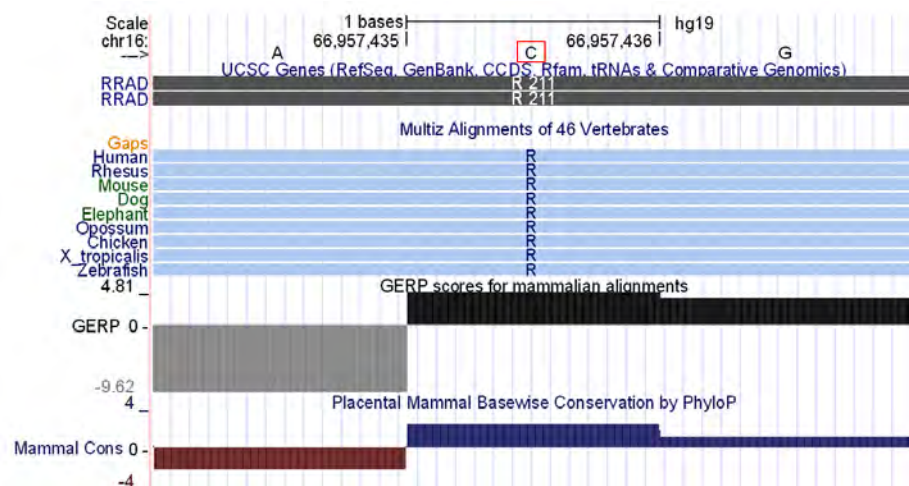


Figure 59 – Représentation des caractéristiques de conservation du variant RRAD – R211H retrouvé dans la famille SBr9

La base nucléotidique substituée (C>T) est encadrée en rouge. L'acide aminé retrouvé à cette position chez différentes espèces est précisé ainsi que les scores de conservation GERP et PhyloP.

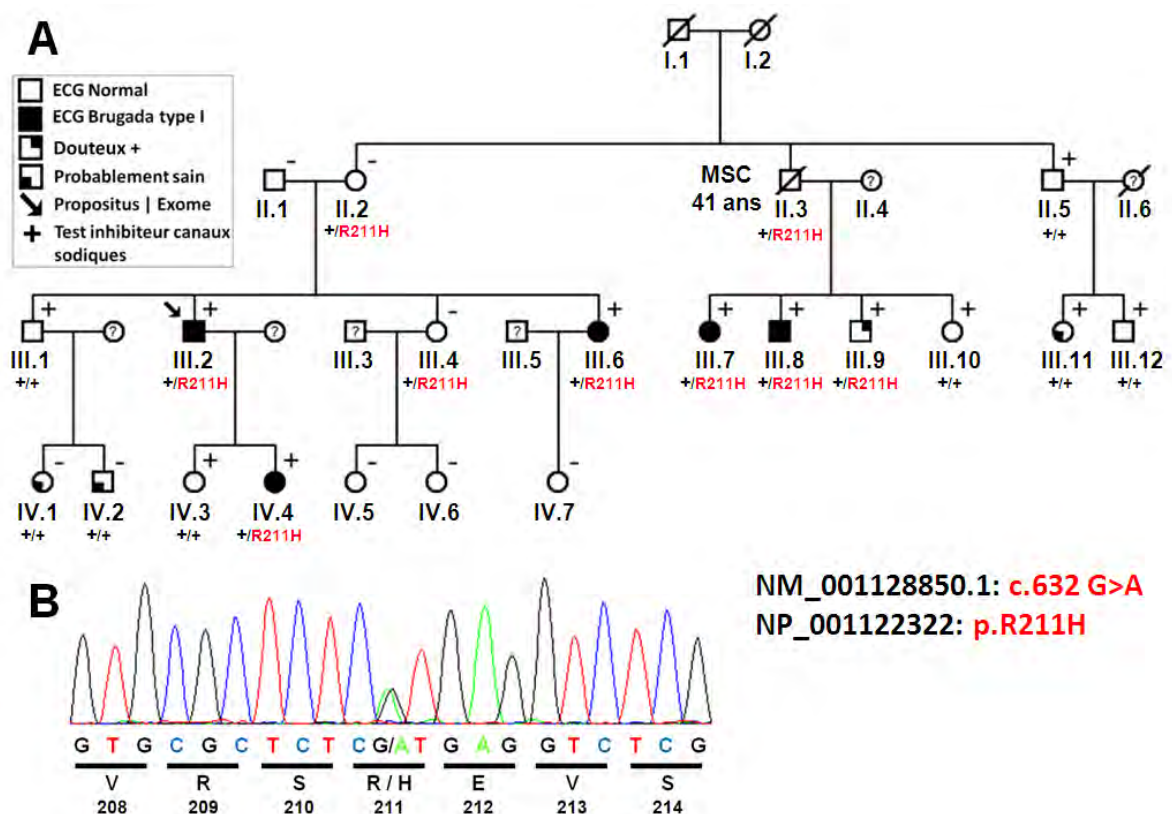


Figure 60 – Représentation de la ségrégation du variant RRAD-R211H –famille SBr9

A- représentation de la relation génotype-phénotype du variant RRAD-R211H dans la famille SBr9. Le génotype pour ce variant est spécifié sous l'icône de chaque individu (+ : allèle sauvage ; R211H : variant)
B- électrophoregramme obtenu après séquençage capillaire montrant le variant hétérozygote RRAD-R211H. La position du variant sur la séquence nucléotidique et protéique est spécifiée.

➤ Criblage du gène *RRAD* sur une cohorte de 187 patients SBr

Le séquençage capillaire des régions codantes du gène *RRAD* chez 187 patients SBr non reliés a révélé la présence d'un variant non synonyme *RRAD*-Q186R (NM_004165 : c.557 C>T) non retrouvé dans les bases de données publiques. Ce variant présente un score GERP élevé et la glutamine présente à cette position est également conservée chez un grand nombre d'espèces (Figure 60).

Le variant *RRAD*-R211H a été découvert après l'initiation du projet de séquençage de gènes candidats et n'a donc pas été inclus dans le système de capture Haloplex.

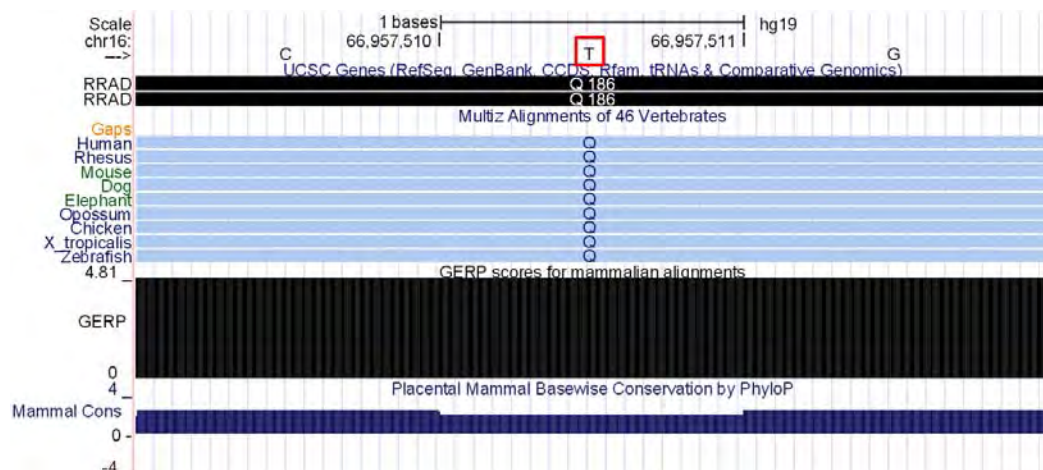


Figure 61 – Représentation des caractéristiques de conservation du variant *RRAD* – Q186R retrouvé chez un cas sporadique de SBr par criblage du gène

La base nucléotidique substituée (T>C) est encadrée en rouge. L'acide aminé retrouvé à cette position chez différentes espèces est précisé ainsi que les scores de conservation GERP et PhyloP.

➤ Rôle du gène *RRAD*

Le gène *RRAD* code pour la protéine *RRAD* (Ras related associated with diabetes), encore appelée *Rad* (Ras associated with diabetes), une petite protéine G monomérique, membre de la famille des protéines RGK (Rem, Gem et Kir). Ce gène a été identifié par des expériences de

Northern-blot, comme surexprimé dans les muscles squelettiques de patients atteints d'un diabète de type II et est également fortement exprimé dans le cœur (Reynet and Kahn, 1993).

La protéine RRAD présente différents domaines fonctionnels incluant des sites d'interaction avec la Calmoduline et la protéine 14-3-3 (Béguin et al., 2006; Moyers et al., 1997). La présence de sites de phosphorylation a également été mise en évidence dans ces études.

Le variant RRAD-S105N, a été identifié comme ayant un effet dominant négatif sur la formation néo-intimale dans les vaisseaux par la diminution de l'activité GTPase (Fu et al., 2005). L'impact de ce variant sur des cardiomyocytes de cobaye a été étudié en transduisant le gène en utilisant l'adénovirus comme vecteur. Les auteurs ont mis en évidence que le variant S105N conduit à une augmentation de la densité du courant I_{CaL} (Yada et al., 2007). Cet effet serait lié au fait que la forme sauvage de RRAD interagit avec la sous-unité $Cav\beta_2$, empêchant l'action chaperonne de cette protéine sur $Cav1.2$. La forme S105N, perdant son interaction pour la protéine $Cav\beta_2$ provoquerait une augmentation de l'adressage membranaire de la sous unité $Cav1.2$ (Figure 61-A). Les auteurs constatent un raccourcissement de la durée du potentiel d'action lorsque la forme sauvage du gène *RRAD* est surexprimée et un allongement du potentiel d'action dans le cas d'une surexpression de la forme RRAD-S105N (Figure 61-B).

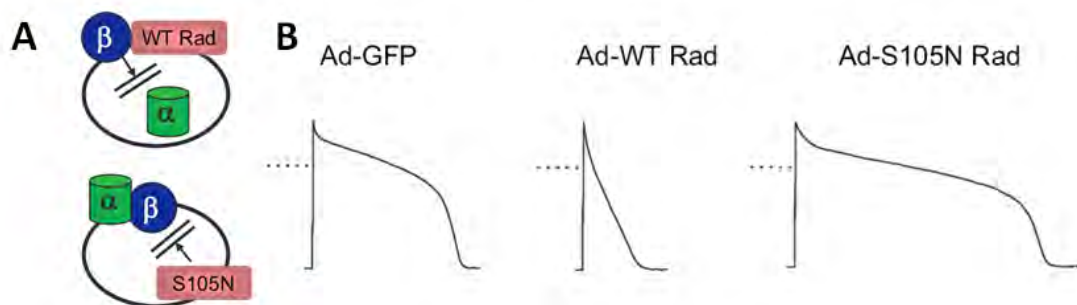


Figure 62 – Effet du variant RRAD-S105N après transduction par adenovirus sur des cardiomyocytes de cobaye.

A- Schéma du mécanisme de RRAD dans le cas de la forme sauvage et du variant S105N. B- représentation des PA obtenus sur cardiomyocytes de cobaye transduit par les formes sauvage et S105N du gène *RRAD*. Les pointillés indiquent la valeur de 0mV du potentiel de membrane (modifié d'après Yada et al., 2007).

La même étude a caractérisé le profil électrocardiographique de souris RRAD-S105N. Ces souris présentent un allongement du segment QT lié à un gain de fonction du courant I_{CaL} (Figure 62-A). Un enregistrement par télémétrie a démontré l'apparition d'extrasystoles ventriculaires (Figure 62-B). Le tracé transitoire de bloc auriculo ventriculaire montre également qu'une perte

de fonction du gène *RRAD* peut conduire à des troubles de conduction (Figure 62-C). D'autre part, le variant S105N ne semble pas affecter les propriétés du courant Ito sur les cardiomyocytes de souris.

Dans cette étude, les auteurs mettent également en évidence que la forme *RRAD*-S105N est associée à une diminution d'expression ventriculaire de la connexine-40, impliquée lorsqu'elle est déficiente à des blocs de conduction (Makita et al., 2012). Les souris mutées par la forme dominante négative *RRAD*-S105N présentent à l'ECG un allongement de l'intervalle QT. De plus, des phénomènes de fibrose cardiaque, souvent constatés lors d'études de souris invalidées pour le gène *SCN5A* sont également observés dans les souris invalidées pour le gène *RRAD* (Zhang et al., 2011; Leoni et al., 2010).

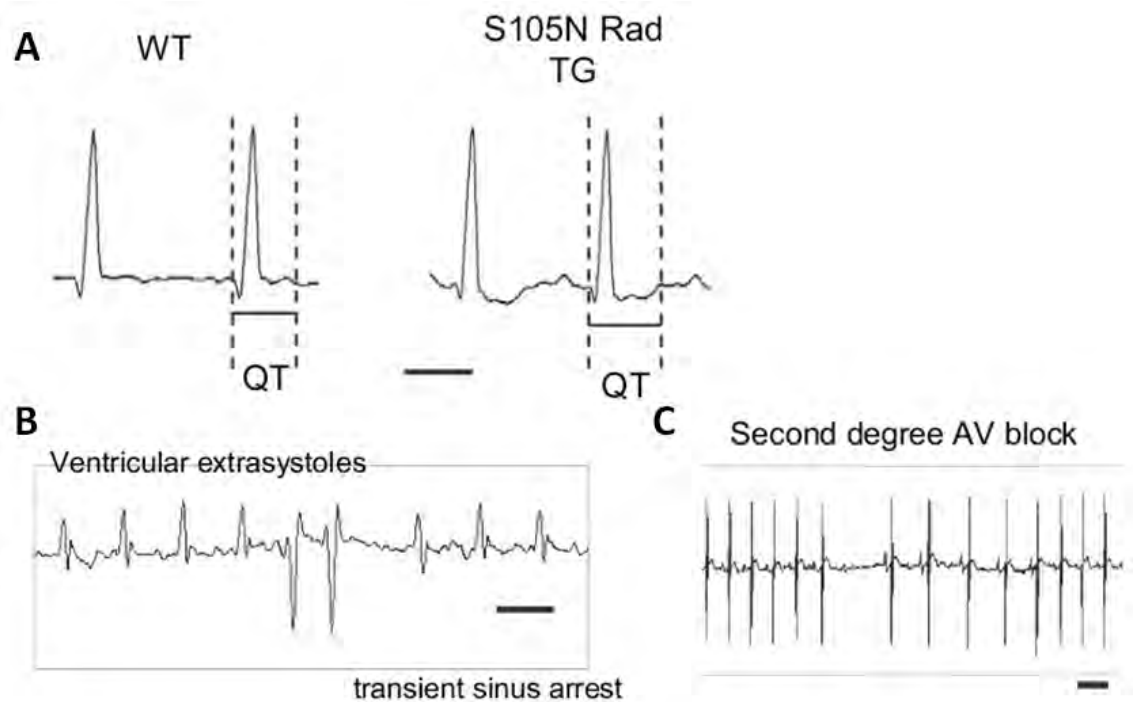


Figure 63 – caractéristiques électrocardiographiques de la souris *RRAD*-S105N

A- Représentation de l'allongement de la durée de l'intervalle QT détecté dans la souris S105N. L'échelle représente 50 ms. B-C- détection par télémétrie d'extrasystoles ventriculaires et d'un bloc Auriculo ventriculaire de second degré. L'échelle représente 100 ms (modifié d'après Yada et al., 2007).

Le gène *RRAD* semble également impliqué dans le couplage excitation contraction par l'intermédiaire du système β -adrénergique. Une surexpression du gène *RRAD* dans des cardiomyocytes de rat provoque une perte de réponse du courant I_{CaL} ainsi qu'une moindre augmentation de la concentration calcique intracellulaire suite à une stimulation du système β -adrénergique par l'isoprénaline. La même étude révèle également qu'une diminution de l'expression du gène *RRAD* n'influe pas sur la réponse β -adrénergique (Wang et al., 2010).

Une extinction du gène *RRAD* a également été reliée à une augmentation du remodelage observé lors de l'insuffisance cardiaque. Le mécanisme suggéré dans cette étude implique la voie de la CaMKIID (Chang et al., 2007).

➤ *Hypothèse fonctionnelles et suite du projet*

Lorsqu'il est surexprimé, le gène *RRAD* provoque une diminution du courant I_{CaL} ainsi qu'une diminution du couplage excitation lié au système β -adrénergique. Les mutations des gènes codant pour les canaux calciques jusqu'alors identifiées dans le SBr conduisent à une diminution du courant I_{CaL}. Pour correspondre à l'hypothèse physiopathologique jusqu'ici soutenue, un gain de fonction du variant *RRAD*-R211H serait attendu.

Le fait que la protéine *RRAD* soit liée au système β -adrénergique peut être mis en corrélation avec le fait que les événements de mort subite enregistré dans le SBr se produisent le plus souvent pendant le sommeil ou au réveil lors d'un tonus vagal soutenu.

La prédiction d'affinité des protéines kinases à l'emplacement des sites de phosphorylation change lorsqu'on introduit le variant R211H dans la séquence de la protéine *RRAD* (Figure 63).

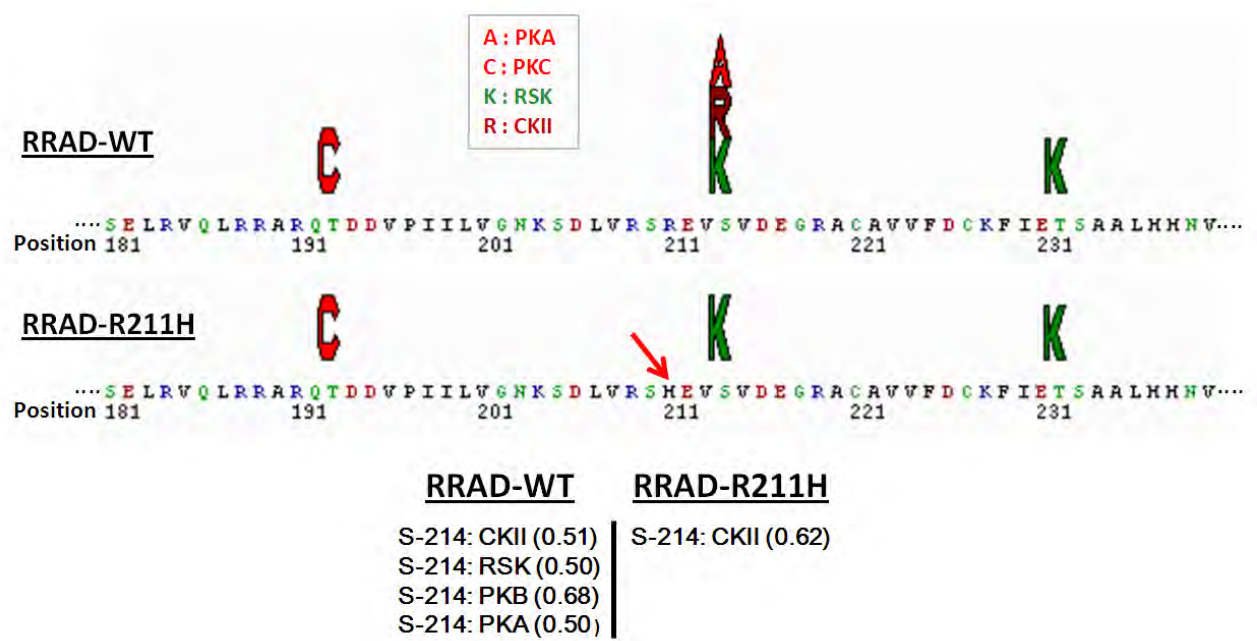


Figure 64 – prédiction par NetPhos des sites de phosphorylation spécifiques des protéines kinases dans la région de la protéine RRAD contenant le variant R211H

Dans la séquence d'acides aminés 181-240 de la protéine RRAD, 3 sites de phosphorylation sont prédits. La sérine en position 214 de la forme sauvage de RRAD est prédite comme site potentiel de phosphorylation par les protéines kinases CKII, RSK, PKB et PKA. Lorsqu'on effectue cette même simulation en introduisant le variant R211H (signalé par la flèche rouge), seule la CKII (Caséine Kinase II) est prédite comme phosphorylant la S-214.

Ce résultat est à prendre avec précaution compte-tenu du fait que l'outil NetPhos prédit les sites de phosphorylation dans un contexte neuronal. Néanmoins, il est envisageable que le variant R211H influe sur le site de phosphorylation de la sérine en position 214 de la protéine.

Compte tenu de la complexité du réseau protéique dans lequel la protéine est incluse, il serait peu judicieux de caractériser l'effet du variant dans un modèle d'expression hétérologue. En effet, l'absence d'expression d'un des partenaires protéiques impliqués dans la régulation de la protéine RRAD pourrait générer des résultats difficilement exportables au contexte arythmique cardiaque.

Une première étape relativement rapide pourrait consister à caractériser l'effet de cette mutation en transduisant le gène sauvage ou le gène muté dans des cardiomyocytes néonataux de rat. Les adénovirus constituent un vecteur intéressant pour ce genre d'approche par leur grande capacité d'infection des cardiomyocytes en culture primaire. Une étude électrophysiologique serait alors envisageable de manière à caractériser la modulation de l'activité des courants par la protéine

RRAD en présence ou en l'absence de la mutation. Dans le contexte d'étude électrophysiologique, l'utilisation de molécules permettant la stimulation du système β -adrénergique pourrait se révéler d'un grand intérêt compte-tenu du fait que l'injection d'isoprénaline chez le propositus provoque le retour à un ECG normal (Figure 56). Un rétablissement des caractéristiques électrophysiologiques basales des cardiomyocytes de rat transduit par la forme RRAD-R211H constituerait une preuve de concept de l'implication de la mutation dans le SBr. L'adressage membranaire des canaux Cav1.2 et la localisation des sous-unités Cav β pourraient également être étudiés par biotinylation et immunofluorescence. L'influence du variant sur les canaux sodiques et potassiques impliqués dans le SBr devront également être étudiés compte-tenu de la place centrale que la protéine RRAD occupe.

Après caractérisation de l'effet du variant par transduction sur cardiomyocytes néonataux de rat, les mécanismes d'action identifiés pourront alors être également étudiés sur des cardiomyocytes issus de cellules pluripotentes induites d'un patient atteint de la famille SBr9.

Enfin, la génération d'un modèle murin portant le variant R210H (correspondant à la position R211 humaine) est envisageable, de manière à caractériser à l'échelle intégrée les mécanismes d'action du variant. L'utilisation d'un modèle animal pourrait également permettre l'enregistrement par télémétrie d'évènements arythmiques rares tels que des extrasystoles ou des évènements de fibrillation ventriculaire.

IV. PROJET 4 : Etude d'association du syndrome de Brugada

Bien que le SBr soit toujours décrit comme une maladie mendélienne, les problèmes de pénétrance et les phénocopies dans les cas familiaux ainsi que les polymorphismes communs associés à des modulations de paramètres électrocardiographiques suggèrent une détermination génétique plus complexe. Un consortium international incluant l'Europe, les Etats-Unis et le Japon a été créé de manière à rassembler un nombre maximal de cas-index dans le but de réaliser une étude d'association sur génome entier. Au total, plus de 1000 patients ont été inclus. L'ADN et les enregistrements ECG sont disponibles pour chaque patient, ainsi que leur statut pour *SCN5A* (porteurs comme non-porteurs d'une mutation *SCN5A* étant inclus) et leur consentement éclairé validé par le comité d'éthique local. Chaque patient présente un ECG typique du SBr (ECG SBr de type 1), validé par deux cliniciens selon les critères consensuels internationaux. Enfin, les antécédents familiaux de SBr sont connus pour chaque cas index, aucun apparenté n'étant inclus

dans la base de données.

Dans cette étude, chaque SNP montrant une association significative à la première étape (découverte) est testé sur des populations indépendantes de cas et de contrôles (réplications). L'étape de découverte a été réalisée à Nantes sur puces Affymetrix Axiom CEU1. L'analyse statistique a été prise en charge par C.Dina. Après filtrage des données, l'étude d'association sur génome entier a porté sur 360 149 SNP pour 383 cas et 898 contrôles. Deux signaux d'association significative ont été détectés: l'un au locus SCN10A en 3p22 ($P=6.79 \times 10^{-26}$), l'autre pour un intervalle incluant le gène HEY2 en 6q22 ($P=8.85 \times 10^{-10}$). Deux réplications indépendantes entreprises sur populations européennes et japonaises ont confirmé ces deux signaux (SCN10A : $P=6.4 \times 10^{-71}$; HEY2 : $P=1.6 \times 10^{-17}$) et mis en évidence un signal d'association supplémentaire dans un intron du gène SCN5A ($P=1.4 \times 10^{-15}$). L'effet cumulatif des trois polymorphismes génétiques sur la susceptibilité à la maladie est important, avec un risque relatif rapproché de 20,4 en présence de plus de 4 allèles à risque par rapport à la présence de moins de 2. La présence de 2 signaux d'association au sein du locus SCN5A/SCN10A démontre que des variations génétiques décrites précédemment comme modulant la conduction de l'impulsion électrique cardiaque peuvent aussi influencer la susceptibilité aux arythmies cardiaques. De plus, l'implication du gène codant pour le facteur de transcription HEY2, dont l'implication dans l'activité électrique cardiaque par analyse de souris KO, révèle que le SBr peut être causé par une altération du programme transcriptionnel au cours du développement cardiaque. La caractérisation du modèle KO de la souris HEY2 (effectué à Amsterdam par l'équipe de Connie Bezzina) a également montré qu'une délétion homozygote du gène HEY2 pouvait conduire chez la souris à des modifications structurelles cardiaques déjà suggérées en cliniques par l'utilisation d'imagerie par résonance magnétique chez des patients SBr. Enfin, nos résultats indiquent que les variations génétiques communes pourraient avoir un fort impact sur la prédisposition aux maladies rares.

Dans ce projet j'ai participé au génotypage des SNPs identifiés lors de l'étape de réplication. J'ai également séquencé l'ensemble des parties codantes du gène HEY2 sur 95 patients atteints du SBr. Aucune variation rare enrichie dans la population SBr par rapport à la population générale n'a été détectée par cette stratégie. Ce résultat suggère que l'implication du gène HEY2 dans le SBr résulte d'une modification d'expression fine liée à des variations de régions régulatrices. De plus, les régions identifiées comme associées au SBr par ce travail ont été incluses dans le système de capture Haloplex dont j'ai participé à l'élaboration.

Article 3: Common variants at *SCN5A-SCN10A* and *HEY2* are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death

(Nat Genet. 2013 Aug 28;45(9):1044-9.)

Common variants at *SCN5A*-*SCN10A* and *HEY2* are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death

Connie R Bezzina^{1,46}, Julien Barc^{1,2,46}, Yuka Mizusawa^{1,46}, Carol Ann Remme^{1,46}, Jean-Baptiste Gourraud^{3-6,46}, Floriane Simonet³⁻⁵, Arie O Verkerk⁷, Peter J Schwartz⁸⁻¹³, Lia Crotti^{8,9,14}, Federica Dagradi^{8,9}, Pascale Guicheney^{15,16}, Véronique Fressart¹⁵⁻¹⁷, Antoine Leenhardt¹⁸⁻²⁰, Charles Antzelevitch²¹, Susan Bartkowiak²¹, Martin Borggrefe^{22,23}, Rainer Schimpf^{22,23}, Eric Schulze-Bahr²⁴, Sven Zumhagen²⁴, Elijah R Behr²⁵, Rachel Bastiaenen²⁵, Jacob Tfelt-Hansen^{26,27}, Morten Salling Olesen^{26,27}, Stefan Käb^{28,29}, Britt M Beckmann²⁸, Peter Weeke³⁰, Hiroshi Watanabe³¹, Naoto Endo³², Tohru Minamino³¹, Minoru Horie³³, Seiko Ohno³³, Kanae Hasegawa³³, Naomasa Makita³⁴, Akihiko Nogami³⁵, Wataru Shimizu^{36,37}, Takeshi Aiba³⁷, Philippe Froguel³⁸⁻⁴⁰, Beverley Balkau^{41,42}, Olivier Lantieri⁴³, Margherita Torchio^{8,9}, Cornelia Wiese⁴⁴, David Weber⁴⁴, Rianne Wolswinkel¹, Ruben Coronel¹, Bas J Boukens^{1,7}, Stéphane Béziau⁴⁵, Eric Charpentier³⁻⁵, Stéphanie Chatel³⁻⁶, Aurore Despres³⁻⁶, Françoise Gros³⁻⁵, Florence Kyndt^{3-6,45}, Simon Lecointe³⁻⁶, Pierre Lindenbaum³⁻⁶, Vincent Portero³⁻⁵, Jade Violleau³⁻⁶, Manfred Gessler⁴⁴, Hanno L Tan¹, Dan M Roden³⁰, Vincent M Christoffels⁷, Hervé Le Marec³⁻⁶, Arthur A Wilde^{1,46}, Vincent Probst^{3-6,46}, Jean-Jacques Schott^{3-6,46}, Christian Dina^{3-6,46} & Richard Redon^{3-6,46}

Brugada syndrome is a rare cardiac arrhythmia disorder, causally related to *SCN5A* mutations in around 20% of cases¹⁻³. Through a genome-wide association study of 312 individuals with Brugada syndrome and 1,115 controls, we detected 2 significant association signals at the *SCN10A* locus (rs10428132) and near the *HEY2* gene (rs9388451). Independent replication confirmed both signals (meta-analyses: rs10428132, $P = 1.0 \times 10^{-68}$; rs9388451, $P = 5.1 \times 10^{-17}$) and identified one additional signal in *SCN5A* (at 3p21; rs11708996, $P = 1.0 \times 10^{-14}$). The cumulative effect of the three loci on disease susceptibility was unexpectedly large ($P_{\text{trend}} = 6.1 \times 10^{-81}$). The association signals at *SCN5A*-*SCN10A* demonstrate that genetic polymorphisms modulating cardiac conduction⁴⁻⁷ can also influence susceptibility to cardiac arrhythmia. The implication of association with *HEY2*, supported by new evidence that Hey2 regulates cardiac electrical activity, shows that Brugada syndrome may originate from altered transcriptional programming during cardiac development⁸. Altogether, our findings indicate that common genetic variation can have a strong impact on the predisposition to rare diseases.

Sudden cardiac death (SCD) is a leading cause of mortality in Western countries, with an incidence close to 1 per 1,000 individuals per year⁹. SCD results most frequently from ventricular fibrillation in the setting of coronary artery disease¹⁰. In 5–10% of cases, however,

SCD occurs owing to rare inherited cardiac arrhythmias, which are typically associated with a distinctive electrocardiogram (ECG) pattern in the absence of identifiable structural heart disease¹⁰. One such disorder is Brugada syndrome, characterized by ST-segment elevation in right precordial ECG leads². ST-segment elevation may be transient in nature and can be evoked by pharmacological sodium channel blockade. Loss-of-function mutations in *SCN5A*, encoding the pore-forming subunit of the cardiac sodium channel (Na_v1.5) at 3p21, have been causally related to the disease in ~20% of cases^{3,11}. However, whether arrhythmias arise as a result of abnormal conduction, repolarization or both is under debate¹². Mutations in genes other than *SCN5A* have been found in a small subset of cases, but their involvement in Brugada syndrome remains unclear¹³.

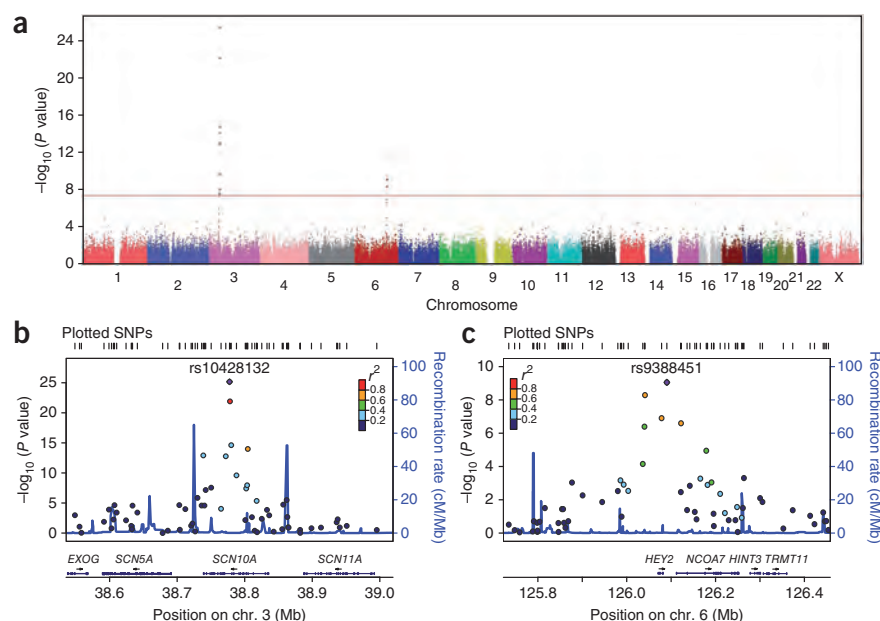
Although Brugada syndrome is commonly considered a mendelian disorder with autosomal dominant transmission, studies in families harboring *SCN5A* mutations have demonstrated low disease penetrance^{14,15} and, in some instances, absence of the familial *SCN5A* mutation in some affected family members¹⁵. Also, many cases are sporadic^{16,17}, and familial linkage analyses have largely been unsuccessful in uncovering new disease-causing genes. These observations suggest a more complex inheritance model. Identifying new genetic risk factors could assist in further diagnosis, provide new insights into underlying molecular mechanisms and yield new information relevant to the broader problem of SCD.

We conducted a genome-wide association study (GWAS) to explore the role of common genetic variants in susceptibility to

*A full list of author affiliations appears at the end of the paper.

Received 18 January; accepted 28 June; published online 21 July 2013; corrected after print 4 October 2013; doi:10.1038/ng.2712

Figure 1 Genome-wide association analysis identifies two susceptibility loci for Brugada syndrome. **(a)** Manhattan plot showing the association of SNPs with Brugada syndrome in a GWAS of 312 cases and 1,115 controls. The red horizontal line marks the threshold for genome-wide significance ($P = 5 \times 10^{-8}$). Two loci reached genome-wide significance on chromosomes 3 and 6. **(b)** Association plots for 3q22 (left) and 6q22 (right). Each SNP is plotted with respect to its chromosomal location (x axis) and its association P value (left y axis). SNPs are colored according to their degree of LD (r^2) with the leading variant represented by a purple diamond and labeled. The tall blue spikes indicate the recombination rate (right y axis) in that region of the chromosome. Coordinates are given according to NCBI Build 37.



Brugada syndrome. We established an international consortium enabling the recruitment of 1,114 unrelated, clinically well-defined cases from 13 centers in Europe, the United States and Japan (**Supplementary Table 1**). Every case had a Brugada syndrome type I ECG, as defined by consensus criteria, either at baseline or after drug challenge², and *SCN5A* mutation status was systematically assessed.

We first conducted a GWAS on 383 cases of self-reported European ancestry and 898 control individuals from western France (cohort Données Épidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance (D.E.S.I.R.)¹⁸). Cases and controls were genotyped using Axiom Genome-Wide CEU 1 arrays (Affymetrix). After stringent quality control and the exclusion of rare SNPs, a total of 360,149 markers were available for further analysis (Online Methods). Multidimensional scaling on the combined cases and controls together with reference populations from the 1000 Genomes Project excluded 42 samples of non-European descent (**Supplementary Fig. 1**). Because controls were largely French individuals, whereas cases had a broader geographic origin, we supplemented the control set with individuals from four European populations from the 1000 Genomes Project that best matched the subsets of cases (**Supplementary Fig. 2**). After the exclusion of 29 cases for whom no matching controls were available, 2 homogeneous groups were defined. GWAS analysis was conducted separately on each group, and association data were combined in a meta-analysis, which included in total 312 cases and 1,115 controls (Online Methods).

We found an excess of SNPs to be associated with Brugada syndrome compared to the number expected under the null hypothesis of no association (**Supplementary Fig. 3**). Two genomic regions showed association signals reaching genome-wide significance (**Fig. 1a**). The most significant association was obtained for rs10428132, a SNP located in the *SCN10A* gene at 3p22 ($P = 6.79 \times 10^{-26}$; **Table 1**). Nine other markers in linkage disequilibrium (LD) with rs10428132 ($r^2 = 0.20$ – 0.76) also had associations that reached genome-wide significance (**Fig. 1b** and **Supplementary Table 2**). We detected another cluster of two SNPs in high LD ($r^2 = 0.81$) at 6q22. The lead SNP at this locus was rs9388451 ($P = 8.85 \times 10^{-10}$), located downstream of the *HEY2* gene (**Fig. 1c** and **Supplementary Table 2**). Neither conditional analysis at each associated locus nor GWAS following genome-wide imputation of non-genotyped SNPs uncovered any additional independent association signals at genome-wide significance (Online Methods and **Supplementary Fig. 4**). We confirmed both associations

with similar effect sizes when the GWAS was restricted to 856 D.E.S.I.R. controls and 254 ancestry-matched cases by applying stringent exclusion criteria on the multidimensional scaling results (**Supplementary Fig. 5**).

We next considered candidate SNPs identified in previous GWAS on ECG traits^{4–7,19–23}, using both genotype and imputation data (**Supplementary Table 3**). After the removal of redundant SNPs from the same haplotype ($r^2 > 0.2$) and the exclusion of the haplotype containing rs10428132, we observed a significant enrichment in association for the remaining 54 markers ($P = 5.0 \times 10^{-8}$; **Supplementary Fig. 6**). The SNP with the lowest association P value, rs11708996 (**Supplementary Table 3**), was located in *SCN5A* and has previously been associated with variability in PR interval and QRS duration^{6,7}, two ECG parameters that reflect cardiac conduction, a process possibly affected in Brugada syndrome¹². Although residing next to the strongest association signal at the 3p22 locus, rs11708996 showed no LD with rs10428132 ($r^2 = 0.06$), and its association P value in GWAS data remained unchanged in analysis conditioning on rs10428132, thus suggesting that it represents an independent association (data not shown). Considering the established involvement of *SCN5A* in Brugada syndrome, we carried this SNP forward to the validation step of the study. We also considered SNPs at loci harboring the 11 other susceptibility genes¹³ but found no enrichment in association at statistically significant levels (genomic inflation factor (λ_{GC}) = 0.98; Online Methods and **Supplementary Fig. 7**).

We sought to replicate the two genome-wide significant signals (rs10428132 and rs9388451) as well as rs11708996 in an independent case-control set of 594 individuals of European descent with Brugada syndrome and 806 previously genotyped D.E.S.I.R. individuals²⁴ (Online Methods). All three SNPs showed robust association, with a similar direction of effect as seen in the discovery set, and the signal at rs10428132 reached genome-wide statistical significance in the replication set alone (**Table 1**). To seek additional replication and assess associations in other ancestry groups, we tested a third independent case-control set comprising 208 Japanese cases and 1,016 ancestry-matched controls. We again replicated the three associations, with rs10428132 exceeding the genome-wide significance threshold (**Table 1**). Meta-analysis of the discovery and replication sets yielded highly significant association P values for all three loci

Table 1 Discovery and replication studies confirm three alleles on chromosomes 3 and 6 are associated with Brugada syndrome

Marker		rs11708996	rs10428132	rs9388451
Genome position (Build 37)		Chr. 3: 38633923	Chr. 3: 38777554	Chr. 6: 126090377
Closest gene(s)		<i>SCN5A</i>	<i>SCN10A</i>	<i>HEY2, NCOA7</i>
Risk allele		C	T	C
Protective allele		G	G	T
GWAS (312 cases and 1,115 controls; European) ^a	RAF ^b	0.23/0.15	0.69/0.41	0.65/0.50
	<i>P</i>	2.70×10^{-5}	6.79×10^{-26}	8.85×10^{-10}
	OR (CI)	1.64 (1.30–2.07)	3.00 (2.45–3.69)	1.83 (1.51–2.22)
Replication 1 (594 cases and 806 controls; European) ^a	RAF ^b	0.23/0.15	0.65/0.42	0.59/0.50
	<i>P</i>	1.10×10^{-7}	1.66×10^{-30}	2.10×10^{-5}
	OR (CI)	1.69 (1.39–2.04)	2.35 (2.03–2.72)	1.39 (1.19–1.61)
Replication 2 (208 cases and 1,016 controls; Japanese) ^a	RAF ^b	0.09/0.04	0.44/0.23	0.72/0.61
	<i>P</i>	5.63×10^{-5}	1.56×10^{-16}	6.70×10^{-6}
	OR (CI)	2.30 (1.53–3.45)	2.56 (2.05–3.19)	1.74 (1.37–2.21)
Meta-analysis	<i>P</i>	1.02×10^{-14}	1.01×10^{-68}	5.14×10^{-17}
	OR (CI)	1.73 (1.51–1.99)	2.55 (2.30–2.84)	1.58 (1.42–1.75)
	<i>Q</i>	$Q = 2.17$	$Q = 3.68$	$Q = 5.68$
	Heterogeneity	$P = 0.338$	$P = 0.159$	$P = 0.058$
	I^2	$I^2 = 4\%$	$I^2 = 45\%$	$I^2 = 65\%$
Cases with symptoms ^c (416 cases and 2,937 controls; meta-analysis) ^a	<i>P</i>	6.88×10^{-8}	1.15×10^{-39}	5.01×10^{-8}
	OR (CI)	1.73 (1.42–2.12)	2.84 (2.43–3.32)	1.55 (1.32–1.81)

^aSize of case and control sets; sample ancestry. ^bRisk allele frequency (RAF) in cases over controls. ^cSymptoms included ventricular tachycardia, ventricular fibrillation, syncope and near syncope.

(rs10428132, $P = 1.01 \times 10^{-68}$; rs11708996, $P = 1.02 \times 10^{-14}$; rs9388451, $P = 5.14 \times 10^{-17}$), with the corresponding effect sizes ranging from 1.58 to 2.55 (Table 1). Effect sizes were similar when the meta-analysis was restricted to symptomatic individuals, with the association for rs10428132 reaching genome-wide statistical significance (Table 1).

We next assessed the cumulative effect of the three loci on susceptibility to Brugada syndrome (Fig. 2a and Supplementary Table 4). We found that disease risk increased consistently with increasing numbers of carried risk alleles ($P_{\text{trend}} = 6.1 \times 10^{-81}$), with the estimated odds ratio (OR) reaching 21.5 in the presence of more than four risk alleles versus less than 2 (Fig. 2b). Under a multiplicative model, assuming a prevalence of 0.05% for Brugada syndrome² and using the ORs and allele frequencies reported in Table 1, the sibling relative risk attributable to the three lead SNPs was estimated at $\lambda_S = 1.4$, with the three loci accounting for 7% of the variance in disease susceptibility (Online Methods). The proportion of the phenotypic variance explained by only these three loci, as well as their cumulative effect, are unexpectedly large in comparison to previously reported effects for common genetic variation on susceptibility to common disease²⁵. However, as 1.5% of the European population is expected to carry more than four risk alleles (Supplementary Table 4), these three polymorphisms are unlikely to by themselves explain the occurrence of Brugada syndrome and are only associated with a low absolute risk for this rare condition. Furthermore, the ORs reported here were calculated using data from case-control collections and thus may overestimate relative risks.

Figure 2 Cumulative effect of alleles at the three associated loci on susceptibility to Brugada syndrome. (a) Distribution of risk alleles among individuals with Brugada syndrome (white bars) and among control individuals (black bars) from Europe (top) and Japan (bottom). (b) ORs calculated according to the number of risk alleles carried. A meta-analysis was performed as described in the Online Methods, using individuals carrying no or one risk allele as the reference. Each black bar represents the log(OR) value (horizontal bar) and the 95% confidence interval (on the log scale; vertical bar).

In subsequent analyses comparing SNP allele dosages in subsets of cases, we could not detect any consistent association of risk alleles with symptoms, *SCN5A* mutation status or Brugada syndrome type I ECG at baseline compared to after drug challenge (Supplementary Table 5).

Our strongest association (rs10428132) resides in intron 14 of the *SCN10A* gene, located adjacent to *SCN5A* on chromosome 3p21–22. The particular haplotype tagged by this SNP, which also contains a nonsynonymous variant affecting *SCN10A* (rs6795970, $r^2 = 0.97$ with rs10428132), has previously been associated with variability in PR interval and QRS duration in the general population^{4–7}. *SCN10A*, which encodes the sodium channel isoform $\text{Na}_v1.8$, was originally reported to be highly expressed in nociceptive sensory neurons of the dorsal root ganglia and cranial sensory ganglia²⁶. Besides being expressed in cardiac neurons²⁷, *SCN10A* was also shown in recent studies to be expressed in the working myocardium^{4,28} and the specialized conduction system^{7,29}, indicating a possible role for $\text{Na}_v1.8$ in cardiac electrical function. An independent report implicated the rs6801957

SNP ($r^2 = 0.97$ with rs10428132) as a probable causal variant on the associated haplotype³⁰. This SNP, which alters a highly conserved nucleotide within a consensus T-box-binding site, affects TBX5- or TBX3-mediated enhancer activity³⁰ and is thus expected to affect TBX5/TBX3-regulated expression of *SCN5A* and *SCN10A* *in vivo*³¹. Further studies are required to determine whether the effects of this SNP on conduction and Brugada syndrome are mediated through regulation of *SCN5A*, *SCN10A* or both. The other independent association at 3p21–22 (rs11708996) involved another haplotype previously associated with cardiac conduction^{6,7}. For both haplotypes, the PR- and QRS-prolonging allele was associated with disease risk, providing support for the concept that the cardiomyocyte depolarization process has an important role in the pathogenesis of Brugada syndrome¹².

In contrast to both signals at the *SCN5A*-*SCN10A* locus, to our knowledge, the signal at 6q22 has never been detected by previous GWAS on ECG traits. The corresponding SNP tagged an LD block

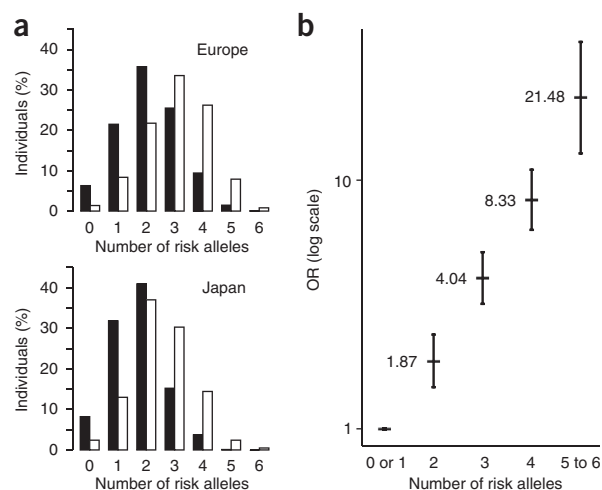
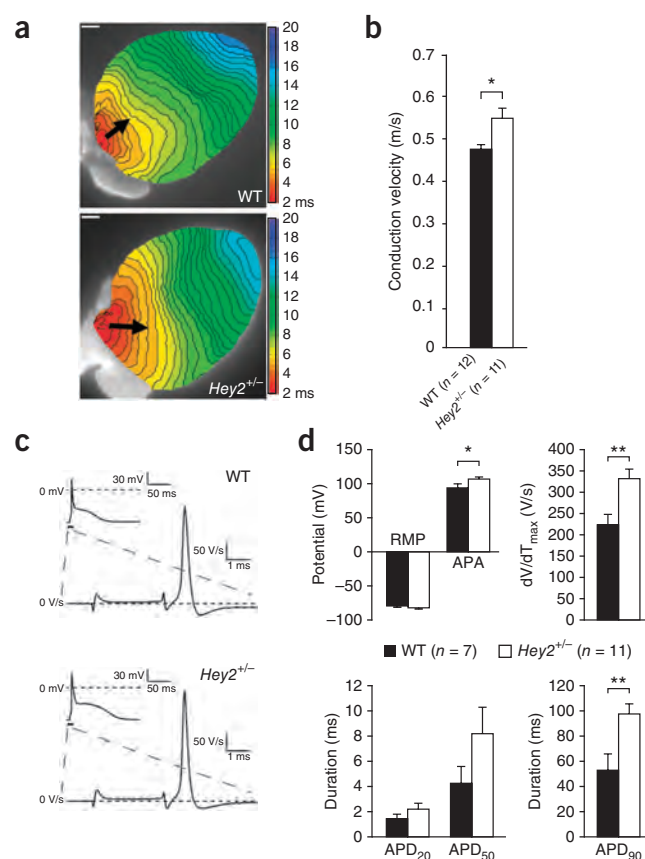


Figure 3 Increased conduction velocity and sodium channel availability in the RVOT of adult *Hey2*^{+/-} mice. (a) Representative optical activation maps from isolated wild-type (WT; *n* = 12) and *Hey2*^{+/-} (*n* = 11) hearts stimulated at the RVOT at a basic cycle length of 120 ms (scale bars, 1 mm). Arrows indicate conduction along the RVOT epicardium through the connection of similar isochrones. Isochrones (0.5-ms intervals) in the RVOT of *Hey2*^{+/-} hearts are less crowded compared to wild-type isochrones, indicating faster conduction in the RVOT of *Hey2*^{+/-} hearts (as indicated by increased arrow length). (b) On average, conduction velocity in the RVOT of *Hey2*^{+/-} hearts was significantly increased compared to that in wild-type hearts (**P* < 0.05; Student's *t* test). Error bars, s.e.m. (c) Representative action potentials measured in adult wild-type (WT; *n* = 7) and *Hey2*^{+/-} (*n* = 11) cardiomyocytes isolated from RVOT. (d) Average action potential characteristics measured at 4 Hz. RVOT cardiomyocytes from *Hey2*^{+/-} mice showed a significant increase in maximal upstroke velocity (dV/dT_{max}, a measure of sodium channel availability and a determinant of conduction velocity) and action potential amplitude (APA), indicating increased sodium channel availability (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; Student's *t* test). Resting membrane potential (RMP), action potential duration at 20% and 50% repolarization (APD₂₀ and APD₅₀, respectively) were not significantly different in wild-type and *Hey2*^{+/-} mice; action potential duration at 90% repolarization (APD₉₀) was significantly increased in RVOT cardiomyocytes from *Hey2*^{+/-} mice. Results are expressed as mean ± s.e.m.



that entirely encompasses the *HEY2* gene and extends into the first intron of *NCOA7* (also called *ERAP140*), which encodes a nuclear receptor coactivator that interacts with estrogen receptor α to modulate its activity³². *NCOA7* is predominantly expressed in the brain³² and has not been implicated in cardiovascular function. In contrast, *HEY2* (also called *HESR2*, *HRT2* and *CHF1*) encodes a basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional repressor that is expressed in the cardiovascular system⁸.

Studies we have conducted in *Hey2*-targeted mice provide strong support for the role of this gene in Brugada syndrome. In the developing mouse heart, *Hey2* expression is confined to the (subepicardial) compact myocardium of the ventricle³³. *Hey2*-null mice exhibit a spectrum of developmental anomalies, including ventricular wall thinning, abnormal right ventricular morphology and postnatal cardiomyopathic changes^{34–37}. The expression of *Gja5* (encoding Cx40), *Nppa* and *Tbx5*, normally enriched in the (subendocardial) trabecular component of the ventricle, is expanded into the compact myocardium in *Hey2*-deficient embryos^{34,38,39}. Because such transmural heterogeneity in expression is similarly well established for Na_v1.5 (high expression in subendocardium, low expression in subepicardium)⁴⁰, loss of *Hey2* might also affect the transmural expression gradient of this ion channel implicated in Brugada syndrome^{2,3}. Indeed, in hearts from homozygous *Hey2*-null embryos, we observed higher Na_v1.5 expression in the compact layer than in wild-type hearts, flattening the expression gradient of this channel (Supplementary Fig. 8a).

The functional consequences of *Hey2* loss were investigated in adult heterozygous *Hey2* mice (*Hey2*^{+/-}), which have structurally normal hearts (Supplementary Fig. 9). *In vivo* surface ECG parameters were unchanged in *Hey2*^{+/-} mice (Supplementary Fig. 10). However, conduction velocity was significantly increased in the right ventricular outflow tract (RVOT) of isolated *Hey2*^{+/-} hearts (Fig. 3a,b), whereas conduction velocity was unaffected in the right and left ventricular free wall (Supplementary Fig. 11). Action potential upstroke velocity was increased in *Hey2*^{+/-} myocytes isolated from the RVOT region (Fig. 3c,d), pointing to increased sodium channel function, despite undetectable changes in Na_v1.5 expression in adult hearts from *Hey2*^{+/-} mice in immunohistochemistry analysis (Supplementary Fig. 8b). Furthermore, the prolonged repolarization parameters observed in these cells suggest an additional regulatory

role for *Hey2* in repolarizing currents (Fig. 3d). Future work should address whether the observed alterations in action potential characteristics and conduction are mediated through ion channel correlates, subtle structural heart alterations or both. Nevertheless, the preferential involvement of the RVOT is in line with ECG manifestations in right precordial leads and concurs with the observation that the RVOT is a common site of origin of ventricular arrhythmias in individuals with Brugada syndrome⁴¹.

In conclusion, we have identified *Hey2* as a transcriptional regulator of cardiac electrical function involved in the pathogenesis of Brugada syndrome. Furthermore, we provide new evidence that common variants, previously shown to modulate ECG conduction indices, also modulate susceptibility to a rare arrhythmia disorder. Most notably, this study demonstrates that the GWAS paradigm can be successfully applied to a rare disorder, previously considered monogenic, to identify common genetic variants with unexpectedly strong modifier effects.

URLs. Affymetrix Power Tools, http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/developer/tools/powertools.affx; GTOOL, <http://www.well.ox.ac.uk/~cfreeman/software/gwas/gtool.html>; R statistical package, <http://www.r-project.org/>; 1000 Genomes Project, <http://www.1000genomes.org/>; 1000 Genomes phase I integrated variant set release, http://mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/data_download_1000G_phase1_integrated.html.

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Beekman, C. de Gier-de Vries, B. de Jonge and the Genomic Platform of Nantes (Biogenouest Genomics) for technical support. We are also grateful to the French Clinical Network against Inherited Cardiac Arrhythmias, which includes the University Hospitals of Nantes, Bordeaux, Rennes, Tours, Brest, Strasbourg, La Réunion, Angers and Montpellier. This study was funded by research grants from the Leducq Foundation (CVD-05; Alliance Against Sudden Cardiac Death), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (grant-in-aid for the Project in Sado for Total Health, PROST), the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (research grant for cardiovascular diseases, H24-033), the French Ministry of Health (PHRC AOR04070, P040411 and PHRCI DGS2001/0248), INSERM (ATIP-Avenir program to R.R.) and the French Regional Council of Pays-de-la-Loire. This research was also supported by the Netherlands Heart Institute (grant 061.02 to C.A.R. and C.R.B.) and the Division for Earth and Life Sciences (ALW; project 836.09.003 to C.A.R.) with financial aid from the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO). C.R.B. acknowledges support from the Netherlands Heart Foundation (NHS 2007B202 and 2009B066). J.B. was supported by a research grant from the European Society of Cardiology and the Netherlands Heart Institute (ICIN) and by the French-Dutch Academy through the Van Gogh program. E.S.-B. was supported by the Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) of the University of Münster and the Collaborative Research Center SFB656. M.G. acknowledges support from the German Research Foundation (DFG-SFB 688 and TP A16). This manuscript is dedicated to the memory of Denis Escande, who founded the Leducq Foundation Network Alliance Against Sudden Cardiac Death.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.R.B., J.-J.S. and R.R. designed the study. Y.M. and J.-B.G. evaluated all ECGs. C.D. coordinated the statistical analyses, which C.D., F.S., P.L. and E.C. carried out. F.G., A.D., S.L. and E.C. performed genotyping for the GWAS. J.B., J.V., V. Portero and K.H. carried out genotyping in the validation sets. A.A.W., H.L.T., H.L.M., V. Probst, F.K., S. Bézieau, S.C., S.K., B.M.B., E.S.-B., S.Z., L.C., P.J.S., F.D., M.T., C.A., S. Bartkowiak, M.B., R.S., P.G., V.F., A.L., D.M.R., P.W., E.R.B., R.B., J.T.-H., M.S.O., N.M., A.N., M.H., S.O., K.H., W.S. and T.A. recruited subjects and participated in clinical and molecular diagnostics. P.F., B.B., O.L., H.W., T.M. and N.E. provided controls. M.G., D.W. and C.W. provided the mice. C.A.R., A.O.V., B.J.B. and R.W. acquired and analyzed electrophysiological data. V.M.C., C.A.R. and R.W. acquired and analyzed protein expression data. C.R.B., J.B., C.A.R., C.D., J.-J.S., V.M.C., R.C. and R.R. interpreted the data. C.R.B., J.-J.S., V. Probst, D.M.R., A.A.W., S.K., E.S.-B., A.L. and R.R. obtained funding. C.R.B., J.B., C.D. and R.R. drafted the manuscript. All coauthors critically revised the manuscript for intellectual content. C.R.B. and R.R. led the study together.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Brugada, P. & Brugada, J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J. Am. Coll. Cardiol.* **20**, 1391–1396 (1992).
- Antzelevitch, C. *et al.* Brugada syndrome: Report of the Second Consensus Conference Endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* **111**, 659–670 (2005).
- Kapplinger, J.D. *et al.* An international compendium of mutations in the *SCN5A*-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* **7**, 33–46 (2010).
- Chambers, J.C. *et al.* Genetic variation in *SCN10A* influences cardiac conduction. *Nat. Genet.* **42**, 149–152 (2010).
- Holm, H. *et al.* Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nat. Genet.* **42**, 117–122 (2010).
- Pfeuffer, A. *et al.* Genome-wide association study of PR interval. *Nat. Genet.* **42**, 153–159 (2010).
- Sotoodehnia, N. *et al.* Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nat. Genet.* **42**, 1068–1076 (2010).
- Leimeister, C., Externbrink, A., Klamt, B. & Gessler, M. *Hey* genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* **85**, 173–177 (1999).
- Straus, S.M.J.M. *et al.* The incidence of sudden cardiac death in the general population. *J. Clin. Epidemiol.* **57**, 98–102 (2004).

- Priori, S.G. *et al.* Task Force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology, Summary of Recommendations. *Europace* **4**, 3–18 (2002).
- Chen, Q. *et al.* Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* **392**, 293–296 (1998).
- Wilde, A.A.M. *et al.* The pathophysiological mechanism underlying Brugada syndrome: depolarization versus repolarization. *J. Mol. Cell Cardiol.* **49**, 543–553 (2010).
- Crotti, L. *et al.* Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1-through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for Brugada syndrome genetic testing: implications for genetic testing. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1410–1418 (2012).
- Priori, S.G. *et al.* Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: a prospective evaluation of 52 families. *Circulation* **102**, 2509–2515 (2000).
- Probst, V. *et al.* *SCN5A* mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome (clinical perspective). *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 552–557 (2009).
- Schulze-Bahr, E. *et al.* Sodium channel gene (*SCN5A*) mutations in 44 index patients with Brugada syndrome: different incidences in familial and sporadic disease. *Hum. Mutat.* **21**, 651–652 (2003).
- Hermida, J.-S. *et al.* Prospective evaluation of the familial prevalence of the Brugada syndrome. *Am. J. Cardiol.* **106**, 1758–1762 (2010).
- Balkau, B. An epidemiologic survey from a network of French Health Examination Centres, (D.E.S.I.R.): epidemiologic data on the insulin resistance syndrome. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* **44**, 373–375 (1996).
- Arking, D.E. *et al.* A common genetic variant in the *NOS1* regulator *NOS1AP* modulates cardiac repolarization. *Nat. Genet.* **38**, 644–651 (2006).
- Newton-Cheh, C. *et al.* Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study. *Nat. Genet.* **41**, 399–406 (2009).
- Pfeuffer, A. *et al.* Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study. *Nat. Genet.* **41**, 407–414 (2009).
- Eijgelsheim, M. *et al.* Genome-wide association analysis identifies multiple loci related to resting heart rate. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3885–3894 (2010).
- Marroni, F. *et al.* A genome-wide association scan of RR and QT interval duration in 3 European genetically isolated populations: the EUROSPAN project. *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 322–328 (2009).
- Sladek, R. *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* **445**, 881–885 (2007).
- Manolio, T.A. *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **461**, 747–753 (2009).
- Akopian, A.N., Sivillotti, L. & Wood, J.N. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* **379**, 257–262 (1996).
- Verkerk, A.O. *et al.* Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between *SCN10A* and cardiac electrophysiology. *Circ. Res.* **111**, 333–343 (2012).
- Yang, T. *et al.* Blocking *Scn10a* channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ. Res.* **111**, 322–332 (2012).
- Pallante, B.A. *et al.* Contactin-2 expression in the cardiac Purkinje fiber network. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **3**, 186–194 (2010).
- van den Boogaard, M. *et al.* Genetic variation in T-box binding element functionally affects *SCN5A/SCN10A* enhancer. *J. Clin. Invest.* **122**, 2519–2530 (2012).
- Arnolds, D.E. *et al.* *TBX5* drives *Scn5a* expression to regulate cardiac conduction system function. *J. Clin. Invest.* **122**, 2509–2518 (2012).
- Shao, W., Halachmi, S. & Brown, M. ERAP140, a conserved tissue-specific nuclear receptor coactivator. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3358–3372 (2002).
- Fischer, A. & Gessler, M. *Hey* genes in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**, 221–226 (2003).
- Xin, M. *et al.* Essential roles of the bHLH transcription factor Hrt2 in repression of atrial gene expression and maintenance of postnatal cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7975–7980 (2007).
- Kokubo, H. *et al.* Targeted disruption of *hesr2* results in atrioventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. *Circ. Res.* **95**, 540–547 (2004).
- Gessler, M. *et al.* Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in *Hey2*^{-/-} mice. *Curr. Biol.* **12**, 1601–1604 (2002).
- Sakata, Y. *et al.* Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16197–16202 (2002).
- Koibuchi, N. & Chin, M.T. CHF1/Hey2 plays a pivotal role in left ventricular maturation through suppression of ectopic atrial gene expression. *Circ. Res.* **100**, 850–855 (2007).
- Fischer, A. *et al.* Hey basic helix-loop-helix transcription factors are repressors of GATA4 and GATA6 and restrict expression of the GATA target gene *ANF* in fetal hearts. *Mol. Cell Biol.* **25**, 8960–8970 (2005).
- Remme, C.A. *et al.* The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. *Basic Res. Cardiol.* **104**, 511–522 (2009).
- Nademanee, K. *et al.* Prevention of ventricular fibrillation episodes in Brugada syndrome by catheter ablation over the anterior right ventricular outflow tract epicardium. *Circulation* **123**, 1270–1279 (2011).

¹Department of Clinical and Experimental Cardiology, Heart Failure Research Center, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. ²CIN (Netherlands Heart Institute), Utrecht, The Netherlands. ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche (UMR) 1087, L'Institut du Thorax, Nantes, France. ⁴Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 6291, Nantes, France. ⁵Université de Nantes, Nantes, France. ⁶Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Nantes, L'Institut du Thorax, Service de Cardiologie, Nantes, France. ⁷Department of Anatomy, Embryology and Physiology, Heart Failure Research Center, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. ⁸Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy. ⁹Center for Cardiac Arrhythmias of Genetic Origin, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy. ¹⁰Cardiovascular Genetics Laboratory, Hatter Institute for Cardiovascular Research in Africa, Cape Town, South Africa. ¹¹Department of Medicine, University of Cape Town, Cape Town, South Africa. ¹²Department of Medicine, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa. ¹³Chair of Sudden Death, Department of Family and Community Medicine, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia. ¹⁴Institute of Human Genetics, Helmholtz Center Munich, Neuherberg, Germany. ¹⁵INSERM U956, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, Paris, France. ¹⁶Université Pierre et Marie Curie Université Paris 06, Unité de Mixte Recherche Scientifique (UMRS) 956, Institut Fédératif de Recherche 14, Paris, France. ¹⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Biochimie Métabolique, Unité Fonctionnelle Cardiogénétique et Myogénétique Moléculaire et Cellulaire, Paris, France. ¹⁸Service de Cardiologie, Centre de Référence des Maladies Cardiaques Héritaires, Hôpital Bichat, AP-HP, Paris, France. ¹⁹INSERM U698, Paris, France. ²⁰Université Paris Diderot, Paris, France. ²¹Department of Experimental Cardiology, Masonic Medical Research Laboratory, Utica, New York, USA. ²²First Department of Medicine (Cardiology), University Medical Center, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany. ²³DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Heidelberg/Mannheim, Mannheim, Germany. ²⁴Institute for Genetics of Heart Diseases (IfGH), Department of Cardiovascular Medicine, University Hospital, Münster, Germany. ²⁵Cardiovascular Sciences Research Centre, St George's University of London, London, UK. ²⁶Danish National Research Foundation Centre for Cardiac Arrhythmia (DARC), Laboratory of Molecular Cardiology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. ²⁷Department of Cardiology, The Heart Centre, Copenhagen University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark. ²⁸Department of Medicine I, University Hospital Munich, Campus Grosshadern, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany. ²⁹DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Munich Heart Alliance, Munich, Germany. ³⁰Department of Medicine and Pharmacology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA. ³¹Department of Cardiovascular Biology and Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan. ³²Department of Regenerative and Transplant Medicine, Division of Orthopaedic Surgery, Niigata University Graduate School of Medicine and Dental Science, Niigata, Japan. ³³Department of Cardiovascular and Respiratory Medicine, Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan. ³⁴Department of Molecular Physiology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, Japan. ³⁵Division of Heart Rhythm Management, Yokohama Rosai Hospital, Yokohama, Japan. ³⁶Department of Cardiovascular Medicine, Nippon Medical School, Tokyo, Japan. ³⁷Department of Cardiovascular Medicine, National Cerebral and Cardiovascular Center, Division of Arrhythmia and Electrophysiology, Suita, Japan. ³⁸CNRS UMR 8199, Lille Pasteur Institute, Lille, France. ³⁹Lille Nord de France University, Lille, France. ⁴⁰Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, UK. ⁴¹INSERM U1018, Centre de Recherche en Épidémiologie et Santé des Populations (CESP), Villejuif, France. ⁴²Université Paris Sud, UMR 1018, Villejuif, France. ⁴³Institut Inter-Régional pour la Santé (IRSA), La Riche, France. ⁴⁴Developmental Biochemistry, Theodor-Boveri-Institute, Biocenter, University of Würzburg, Würzburg, Germany. ⁴⁵CHU Nantes, Service de Génétique Médicale, Nantes, France. ⁴⁶These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to C.R.B. (c.r.bezzina@amc.uva.nl) or R.R. (richard.redon@inserm.fr).

ONLINE METHODS

Case and control samples. Individuals with Brugada syndrome, defined by the presence of a type 1 ECG², were recruited from 13 centers in Europe (Nantes, Paris, Amsterdam, Pavia, Copenhagen, Munich, Münster and London), the United States (Utica and Nashville) and Japan (Nagasaki, Shiga and Osaka). Only index cases were included from extended pedigrees. Appropriate medical ethical committee approval was obtained at each participating clinical center. Informed consent was available from all subjects. Clinical data (age at diagnostic ECG, *SCN5A* mutation status, symptoms and family history of sudden cardiac death) and ECGs were collected centrally and reviewed. A Brugada syndrome type I ECG pattern was defined on the basis of the criteria drawn out at the Second Consensus Conference on Brugada Syndrome², namely, a coved type ST elevation at baseline or after a drug challenge test, in one or more leads in the right precordial leads, including the third and fourth intercostal space. Drug challenge tests were performed according to consensus criteria². Control subjects were drawn from the D.E.S.I.R. cohort¹⁸ for the GWAS and the European replication set and were drawn from the Sado study⁴² for the Japanese replication set. No statistical method was used to predetermine sample size.

GWAS genotyping. SNP genotyping was performed on population-optimized Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1 array plates following the standard manufacturer's protocol. Each array contains 567,097 SNPs. Fluorescence intensities were quantified using the Affymetrix GeneTitan Multi-Channel Instrument, and primary analysis was conducted with Affymetrix Power Tools following the manufacturer's recommendations (see URLs). Genotype calling, a two-dimensional clustering analysis, was performed using the 'apt' program. Individuals with genotype call rate of lower than 97% were removed, as were those with fewer than 10,000 markers reporting a heterozygous state (the threshold was determined after visual inspection). Monomorphic SNPs were excluded, as were those with minor allele frequency (MAF) of <10% ($n = 175,153$), a call rate of <95% ($n = 19,986$) or Hardy-Weinberg disequilibrium in controls ($n = 2,054$ with $P < 1 \times 10^{-4}$ when testing for Hardy-Weinberg equilibrium). Note that Hardy-Weinberg disequilibrium was also tested in demographically homogenous cases to identify very large deviations ($P < 1 \times 10^{-7}$). Additional SNPs were excluded for batch effect: such SNPs were defined as those with significant differences in allele frequency in one plate versus all others within cases and within controls only ($n = 68$) or with unexplained large differences observed in controls versus the 1000 Genomes Project European (non-Finnish) population ($n = 9,686$).

Demographic analyses. The ancestry of individuals was assessed using a multi-dimensional scaling technique, as implemented in PLINK⁴³. SNPs were selected for short-range LD independence. Pruning was performed using a two-step procedure to accommodate longer range LD (this is particularly important, as the Axiom Human array is enriched in SNPs in the human leukocyte antigen (HLA) region). In a first step, we applied the threshold $r^2 < 0.2$ within a 20-kb LD block or within 50 SNPs. In a second step, we applied the same threshold within a 10-Mb distance or within 100 SNPs on the pruned data set. We then created an identity-by-state (IBS) matrix including all individuals and applied the multidimensional scaling method (–mds option in PLINK) to retrieve the first five components. Three matrices were estimated using our cases and controls together with all 1000 Genomes Project populations (IC) and all European (except Finnish) populations (E). At each level, we excluded outliers on the first two components using an expectation-maximization-fitted Gaussian mixture clustering method⁴⁴ implemented in the R package M-CLUST, assuming either three (for IC) or two (for E) clusters and noise. Outlier position was assigned using nearest-neighbor-based classification⁴⁵ (NNclust in R package PradClus). Outliers were excluded from the analysis, as previously done in GWAS⁴⁶.

GWAS. Using the clustering algorithm described above, we defined two homogenous groups (A and B). To carry out the genome-wide analysis, each SNP was tested within groups A and B separately, using logistic regression and assuming an additive genetic model with adjustment for the first five components retrieved. No additional covariates were added, as advised⁴⁷. Instead, the results from groups A and B were combined into a meta-analysis using an inverse normal strategy⁴⁸, whereby the summary P values for each

test (and effect direction) are combined into a signed z score that, properly weighted, yields N ($\mu = 0$, $\sigma^2 = 1$). Because the number of controls exceeded by far the number of cases in all studies, we used the effective sample size (weighting studies A and B) using METAL software as advised⁴⁹. In addition, we performed a second genome-wide analysis on a homogenous sample of 254 cases and 806 controls of apparent French origin (largest geographically homogenous sample; **Supplementary Fig. 5**).

Concordance rate between Axiom and 1000 Genomes Project data.

We genotyped 95 HapMap individuals on Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1 arrays using the same process as described above. We could retrieve the genotypes of 58 of these 95 individuals from the 1000 Genomes Project database. The concordance rate was tested using PLINK (merging mode 7, which compares the common non-missing genotypes). The concordance rate was 99.4% over a total of 20,853,552 genotypes and 100% over the 174 genotypes corresponding to the 3 associated SNPs.

Genome-wide imputation analysis. Genotyped SNPs in cases and controls were phased using the SHAPE-IT (v.1) program⁵⁰. Imputation of 6.1 million frequent SNPs (MAF > 0.05 in Europeans) was carried out using IMPUTE v2 (ref. 51). Chromosome regions were split in chunks of approximately 7 Mb. The reference panel was Phase I integrated variant set release (v3) in NCBI Build 37 (hg19) coordinates (see URLs). For each chromosomal chunk, a set of genetically matched panel individuals was selected, according to the last strategy used by IMPUTE⁵². Imputed SNPs were combined with SNPs extracted from the 1000 Genomes Project data set under the IMPUTE format. We merged both data sets using GTOOL. We applied a logistic regression (additive model) as implemented in SNPTTEST⁴⁵ (options -frequentist 1 and -score), using the first five components as covariates. Individuals from the 1000 Genomes Project data set were added for all SNPs either genotyped or imputed.

Post-analysis quality control. For each significantly associated SNP in a region (called here lead SNP), we visually inspected the cluster graph (**Supplementary Fig. 12a**) and the association results of SNPs in LD (locus plot).

Enrichment analysis. We tested enrichment in moderately associated SNPs grouped by distinctive properties. The first group included SNPs that have been reported to be associated with ECG traits in previous GWAS. We used the list published in ref. 53 after removal of redundant SNPs (one SNP was selected randomly for each group of SNPs with $r^2 > 0.2$) and exclusion of SNPs located in the same haplotype block as rs10428132. The second list comprised every SNP located within 1-Mb intervals (500 kb upstream and 500 kb downstream) centered on the susceptibility genes for Brugada syndrome listed in ref. 13. We removed the *SCN5A* gene, as it would have disproportionately inflated the overall statistics. Quantile-quantile plots were first visually inspected to check for enrichment. The significance of enrichment suggested by the quantile-quantile plot for the first group (ECG-associated SNPs) was formally tested by a simple Fisher combination test.

Replication genotyping. The three significantly associated SNPs from the GWAS stage (rs10428132, rs9388451 and rs11708996) were typed for the replication steps by TaqMan SNP Genotyping assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol on a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) or an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Assays C__26860683_10, C__2824356_10 and C__44417794_10 were functionally tested by Applied Biosystems for the SNPs rs10428132, rs9388451 and rs11708996, respectively. Reaction conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing at 60 °C for 30 s. Data were analyzed with LightCycler 480 software (release 1.5.0 SP4; **Supplementary Fig. 12b**) or by ABI 7900HT Sequence Detection Systems software (**Supplementary Fig. 12c**). Outliers were excluded from the analysis. After the first round of genotyping, two samples per SNP genotype cluster were sequenced to verify genotype (**Supplementary Fig. 12b**). Furthermore, 15 samples that were previously genotyped on Affymetrix Axiom Genome-Wide CEU 1 arrays were used as control samples: the genotypes obtained by TaqMan assays were perfectly concordant with those generated with Axiom array technology.

SNP imputation for the control population used in the European replication. The genotypes of the three SNPs tested in replication were imputed using IMPUTE software for 806 D.E.S.I.R. individuals on the basis of genotype data sets previously generated on Illumina Human CNV370-Duo arrays^{24,54}. We selected a threshold of 0.9 for genotype calling, meaning that the genotypes whose posterior probability exceeded this threshold were called, whereas those where this probability was below the threshold were set as unknown. We genotyped 49 individuals on both Affymetrix and Illumina arrays. Once hard calls were obtained using GTOOL (see URLs) with -Gen mode and -threshold option set to 0.9, concordance rates were calculated using PLINK (merging mode 7). Perfect concordance was observed between genotyped and imputed SNPs (100% concordance rate for 144 genotypes).

Replications and meta-analyses. The case-control replication study was performed using a logistic regression method that accounts for genotype calling uncertainty. This method, based on missing data theory, allows the unbiased estimation of ORs and confidence intervals and is implemented in SNPTEST (options—method ml). Pooled ORs were obtained by averaging the ORs from all stages (GWAS and European and Japanese replications) and weighted by the inverse of the variance. Heterogeneity was tested using the Cochran's Q test and was also measured using Higgins' index⁵⁵. We generated genetic scores for individuals on the basis of an allelic scoring system involving our three SNPs. These scores were created either through the number of at-risk alleles for the European discovery and Japanese replication populations or the risk allele dosage in the European replication population. Risk allele dosages from the European replication population were collapsed using dosage. The distribution of imputed dosage is shown in **Supplementary Figure 13a**. Results were similar between imputed dosage ($\beta = 0.62921$, $\sigma = 0.05427$, $P = 4.43 \times 10^{-31}$) and collapsed imputed dosage ($\beta = 0.61778$, $\sigma = 0.05386$, $P = 1.88 \times 10^{-30}$). Moreover, we compared the genetic scores obtained with genotyped versus imputed SNPs for 49 individuals who were genotyped on Axiom Genome-Wide CEU 1 arrays and imputed with the European replication population and observed high correlation between methods (**Supplementary Fig. 13b**). Finally, we tested whether a non-additive model (recessive or dominant) might be a better fit for each genome-wide significant SNP. A heterozygote effect was added to the logistic regression analysis along with the linear effect (effect of the number of alternative alleles) in each study and in a meta-analysis. We did not detect any consistent deviation from the additive model (**Supplementary Table 6**).

Estimation of the genetic score effect by multiple imputation. Despite this high concordance, we chose to estimate genotype score risk within the Multiple Imputation framework⁵⁶. Ten data sets were created where each uncertain genotype was replaced by a value simulated under the probability distribution obtained through genetic imputation (IMPUTE output consisting of $P(AA)$, $P(AB)$ and $P(BB)$). The β value and variance were obtained using standard procedures⁵⁷. We let m be the number of simulations (called replicates). For each simulation, we carried out a logistic regression (either on score as an ordinal value or on each score versus baseline). The Multiple Imputation effect estimation was calculated as follows:

$$\bar{\beta}_{MI} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \beta_j$$

The variance was calculated as the sum of within-replicate and between-replicate variances

$$\sigma_{MI}^2 = \frac{1}{m} \hat{\sigma}_j^2 + \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (\bar{\beta}_{MI} - \beta_j)^2$$

Confidence intervals were retrieved using the 95% quantile of a Student distribution with a number of degrees of freedom, which is a function of the two components of the variance. We used the 'glm' function of the R statistical package (see URLs) to perform logistic regression. R was used to create complete data sets from IMPUTE output.

Calculation of sibling relative risk and liability-scale variance. Assuming a multiplicative model (within and between variants), the contribution to the sibling relative risk of a set of N SNPs was calculated using the following formula

$$\lambda_s = \prod_{j=1}^N \left[1 + \frac{p_j(1-p_j)(OR_j-1)^2}{2[(1-p_j) + p_j OR_j]^2} \right]$$

where p_j and OR_j denote the RAF and corresponding allelic OR at the j th SNP⁵⁸. Assuming disease prevalence K , the liability-scale variance⁵⁹ explained by these SNPs was calculated as follows:

$$h_L^2 = \frac{2[T - T_1 \sqrt{1 - (T^2 - T_1^2)(1 - T/\omega)}]}{\omega + T_1^2(\omega - T)}$$

In the expression, $T = \varphi^{-1}(1 - K)$, $T_1 = \varphi^{-1}(1 - \lambda_s K)$ and $\omega = z/K$, where z is the height of the standard Gaussian density at T .

Surface ECG analysis. Mice (male and female, aged 3–5 months) were anesthetized using isoflurane inhalation (0.8–1.0 volume percentage in oxygen), and surface ECGs were recorded from subcutaneous 23-gauge needle electrodes attached to each limb using the Powerlab acquisition system (ADInstruments). ECG traces were signal averaged and analyzed for heart rate (RR interval) and for PR-interval, QRS-interval and QT-interval duration using LabChart7Pro software (ADInstruments). QT intervals were corrected for heart rate using the formula $QTc = QT/\sqrt{RR/100}$ (RR in ms).

Optical mapping in isolated hearts. Mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of pentobarbital, after which the heart was excised, cannulated, incubated in 10 ml Tyrode's solution containing 15 μ M Di-4 ANEPs and subsequently placed in an optical mapping setup. Hearts were perfused at 37 °C with Tyrode's solution (128 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.45 mM CaCl₂, 0.6 mM MgCl₂, 27 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄ and 11 mM glucose (pH maintained at 7.4 by equilibration with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂)) containing blebbistatin to prevent movement artifacts. Excitation light was provided by a 5-W power LED (filtered 510 $\pm$ 20 nm). Fluorescence (filtered for >610 nm) was transmitted through a tandem lens system on a CMOS sensor (100 $\times$ 100 elements; MICAM Ultima). Hearts were paced at a basic cycle length (BCL) of 120 ms (twice the diastolic stimulation threshold) from the center of the right or left ventricle epicardial surface or from the RVOT epicardial surface. Optical action potentials were analyzed with custom software. Local activation was defined as the maximum positive slope of the action potential, and local activation times were used to construct ventricular activation maps. To calculate conduction velocity in longitudinal and transversal directions in the right and left ventricles, the difference in activation time between at least three consecutive electrode terminals separated by a known distance located parallel (longitudinal) or perpendicular (transversal) to the direction of propagation was measured. The direction of propagation was determined using isochronal maps. For c velocity measurements in the RVOT, transverse fiber direction was defined as the slowest conduction velocity.

Action potential measurements in isolated cardiomyocytes. Cardiomyocytes were isolated by enzymatic dissociation as previously described⁶⁰. After perfusion of the heart with enzyme solution, the RVOT area at the base of the right ventricle just below the truncus pulmonalis was excised and used during the subsequent isolation process⁴³. Quiescent rod-shaped cross-striated cells with a smooth surface were selected for measurements. Action potentials were recorded with the amphotericin-B-perforated patch-clamp using an Axopatch 200B Clamp amplifier (Molecular Devices Corporation). Signals were filtered (low pass, 10 kHz) and digitized (40 kHz), and action potentials were corrected for the estimated change in liquid junction potential. Action potentials were measured at 36 $\pm$ 0.2 °C using a modified Tyrode's solution containing 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose and 5.0 mM HEPES, pH 7.4 (NaOH). Pipettes (1.5–2.5 M Ω) were filled with solution containing 125 mM potassium gluconate, 20 mM KCl, 10 mM NaCl, 0.22 mM amphotericin-B and 10 mM HEPES, pH 7.2 (KOH). Action potentials were elicited at 4 Hz by 3 ms, 1.2 $\times$ threshold current pulses



through the patch pipette. We analyzed resting membrane potential (RMP), action potential amplitude (APA), maximal upstroke velocity ($dV/dt_{\max}$) and action potential duration at 20, 50 and 90% repolarization (APD_{20} , APD_{50} and APD_{90} , respectively). Data from ten consecutive action potentials were averaged. Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m. Two sets of data were considered significantly different if the P value of the unpaired Student's t test with Bonferroni correction was <0.05 .

Other methods. Procedures for immunohistochemistry hybridization on mouse heart sections were performed as described previously⁴⁰.

42. Sakuma, M. *et al.* Incidence and outcome of osteoporotic fractures in 2004 in Sado City, Niigata Prefecture, Japan. *J. Bone Miner. Metab.* **26**, 373–378 (2008).
43. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
44. Frayley, C. & Raftery, A.E. *MCLUST Version 3 for R: Normal Mixture Modeling and Model-Based Clustering* (Department of Statistics, University of Washington, Seattle, 2006).
45. Byers, S. & Raftery, A.E. Nearest-neighbor clutter removal for estimating features in spatial point processes. *J. Am. Stat. Assoc.* **93**, 577–584 (1998).
46. Postel-Vinay, S. *et al.* Common variants near *TARDBP* and *EGR2* are associated with susceptibility to Ewing sarcoma. *Nat. Genet.* **44**, 323–327 (2012).
47. Pirinen, M., Donnelly, P. & Spencer, C.C.A. Including known covariates can reduce power to detect genetic effects in case-control studies. *Nat. Genet.* **44**, 848–851 (2012).
48. Stouffer, S.A., Suchman, E.A., Devinney, L.C., Star, S.A. & Williams, R.M. Jr. *The American Soldier: Adjustment During Army Life (Studies in Social Psychology in World War II, Vol. 1)* (Princeton University Press, Princeton, NJ, 1949).
49. Willer, C.J., Li, Y. & Abecasis, G.R. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics* **26**, 2190–2191 (2010).
50. Delaneau, O., Marchini, J. & Zagury, J.-F. A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nat. Methods* **9**, 179–181 (2012).
51. Marchini, J., Howie, B., Myers, S., McVean, G. & Donnelly, P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat. Genet.* **39**, 906–913 (2007).
52. Howie, B., Marchini, J. & Stephens, M. Genotype imputation with thousands of genomes. *G3* **1**, 457–470 (2011).
53. Kolder, I.C.R.M., Tanck, M.W.T. & Bezzina, C.R. Common genetic variation modulating cardiac ECG parameters and susceptibility to sudden cardiac death. *J. Mol. Cell Cardiol.* **52**, 620–629 (2012).
54. Meyre, D. *et al.* Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat. Genet.* **41**, 157–159 (2009).
55. Higgins, J.P.T. & Thompson, S.G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* **21**, 1539–1558 (2002).
56. Little, R.J.A. & Rubin, D.B. *Statistical Analysis with Missing Data* (Wiley and Sons, New York, 1987).
57. Rubin, D.B. *Multiple Imputation for Nonresponse in Surveys* (2008) <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470316696>.
58. Lin, S., Chakravarti, A. & Cutler, D.J. Exhaustive allelic transmission disequilibrium tests as a new approach to genome-wide association studies. *Nat. Genet.* **36**, 1181–1188 (2004).
59. Wray, N.R., Yang, J., Goddard, M.E. & Visscher, P.M. The genetic interpretation of area under the ROC curve in genomic profiling. *PLoS Genet.* **6**, e1000864 (2010).
60. Remme, C.A. *et al.* Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human *SCN5A*-1795insD. *Circulation* **114**, 2584–2594 (2006).

Corrigendum: Common variants at *SCN5A-SCN10A* and *HEY2* are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death

Connie R Bezzina, Julien Barc, Yuka Mizusawa, Carol Ann Remme, Jean-Baptiste Gourraud, Floriane Simonet, Arie O Verkerk, Peter J Schwartz, Lia Crotti, Federica Dagradi, Pascale Guicheney, Véronique Fressart, Antoine Leenhardt, Charles Antzelevitch, Susan Bartkowiak, Eric Schulze-Bahr, Sven Zumhagen, Elijah R Behr, Rachel Bastiaenen, Jacob Tfelt-Hansen, Morten Salling Olesen, Stefan Käb, Britt M Beckmann, Peter Weeke, Hiroshi Watanabe, Naoto Endo, Tohru Minamino, Minoru Horie, Seiko Ohno, Kanae Hasegawa, Naomasa Makita, Akihiko Nogami, Wataru Shimizu, Takeshi Aiba, Philippe Froguel, Beverley Balkau, Olivier Lantieri, Margherita Torchio, Cornelia Wiese, David Weber, Rianne Wolswinkel, Ruben Coronel, Bas J Boukens, Stéphane Béziau, Eric Charpentier, Stéphanie Chatel, Aurore Despres, Françoise Gros, Florence Kyndt, Simon Lecointe, Pierre Lindenbaum, Vincent Portero, Jade Violleau, Manfred Gessler, Hanno L Tan, Dan M Roden, Vincent M Christoffels, Hervé Le Marec, Arthur A Wilde, Vincent Probst, Jean-Jacques Schott, Christian Dina & Richard Redon

Nat. Genet. 45, 1044–1049 (2013); published online 21 July 2013; corrected after print 4 October 2013

In the version of this article initially published, Martin Borggrefe and Rainer Schimpf were inadvertently omitted from the author list. Both are affiliated with the First Department of Medicine (Cardiology), University Medical Center, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany, and with DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Heidelberg/Mannheim, Mannheim, Germany. In addition, one of the study's funding sources (the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, research grant for cardiovascular diseases, H24-033) was omitted from the Acknowledgments section. These errors have been corrected in the HTML and PDF versions of the article.

➤ *Perspectives et discussion de l'étude d'association sur le SBr*

L'étude d'association sur génome entier n'ayant porté que sur 312 cas, Il est envisagé de poursuivre cette étude en augmentant le nombre de patients, afin de tester l'existence d'autres variants fréquents contribuant à la susceptibilité au SBr. Compte-tenu des nombreux polymorphismes mis en évidence dans la régulation des paramètres ECG dans la population générale, il est très probable que d'autres signaux génétiques puissent être détectés par cette stratégie.

Une augmentation du nombre de patients dans cette étude pourrait également permettre d'obtenir une puissance suffisante pour réaliser l'analyse en sous-groupe et ainsi amener une meilleure compréhension de la régulation du SBr. Ainsi, les patients symptomatiques, asymptomatiques, induits ou non par des tests pharmacologiques, pourraient présenter un mécanisme de régulation différent. D'autre part, au sein de la population SBr, une extension de l'étude poussée portant sur les traits quantitatifs tels que la durée du QRS, de l'intervalle PR ou encore de l'intervalle QTc pourrait permettre de confirmer l'implication des régions préalablement associées dans la régulation de ces paramètres ECG spécifiquement dans le SBr. Une différence d'implication de ces régions dans la régulation des paramètres ECG entre la population SBr et la population générale conduirait également à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques du SBr.

Le gène *SCN10A* (codant la protéine Nav1.8) a été identifié comme étant exprimé dans les neurones cardiaques de souris juxtaposant les fibres de Purkinje et participant au processus de dépolarisation cardiaque (Verkerk et al., 2012). De plus l'inhibiteur A-803467, spécifique du canal Nav1.8, provoque une diminution de la durée du potentiel d'action ventriculaire cardiaque. L'utilisation de ce même inhibiteur chez la souris provoque un élargissement du complexe QRS et de l'intervalle PR sur l'électrocardiogramme (Sotoodehnia et al., 2010).

D'autre part, le polymorphisme *SCN5A-SCN10A* identifié dans cette étude, également mis en évidence dans les GWAS PR et QRS (Pfeufer et al., 2010; Sotoodehnia et al., 2010), se trouve en déséquilibre de liaison avec le SNP rs6801957 identifié récemment comme responsable d'une diminution de transcription conjointe des gènes *SCN5A-SCN10A* (van den Boogaard et al., 2012). Le SNP rs6801957 est situé dans une région de fixation du facteur de transcription Tbx5 et, dans une moindre mesure, Tbx3. Le facteur de transcription Tbx3 est connu pour être impliqué dans la

régulation de l'expression des gènes des cellules du nœud sinusal et entre autre de diminuer l'expression du gène *SCN5A* dans ces cellules (Hoogaars et al., 2007). La présence de ce variant augmente l'affinité de Tbx3 pour cette région, induisant une diminution de l'expression de *SCN5A*. Ce travail est un bel exemple de ce qui peut être effectué après l'identification de signaux issus d'une étude d'association.

Une perspective réalisable à court terme pourrait être l'étude de l'influence du SNP rs6801957 dans des familles SBr présentant une mutation du gène *SCN5A*. On peut émettre l'hypothèse que l'impact phénotypique d'une mutation dans le gène *SCN5A* serait différent en fonction de la présence du SNP rs6801957. Compte-tenu du fait que le SNP rs6801957 est impliqué dans un mécanisme de cis-régulation des gènes *SCN5A-SCN10A*, il sera capital de déduire si la mutation et le SNP sont portés par le même allèle.

L'ensemble des polymorphismes régulateurs du SBr n'ayant probablement pas encore été identifiés, une alternative à cette étude familiale pourrait être de réaliser ce travail sur des lignées de souris consanguines dans lesquelles une mutation causale du gène *SCN5A* ainsi que le SNP rs6801957 auraient été induits. Il serait donc plus facile de caractériser l'effet de du SNP rs6801957 dans la modification phénotypique d'une mutation du gène *SCN5A*. Cette stratégie nécessite l'utilisation de souris caractérisées au préalable et présentant un phénotype arythmique précis.

L'identification du gène *HEY2* montre pour la première fois l'implication directe d'un facteur de transcription dans le SBr. L'absence de variants rares associés au SBr dans le gène *HEY2* suggère l'implication d'une régulation fine de l'expression de ce gène dans le SBr. L'ensemble du locus identifié dans la GWAS SBr a été inclus dans le système de capture Haloplex. La prochaine étape va donc consister à identifier les variants enrichis dans cet intervalle dans la population SBr par rapport à la population contrôle. Une stratégie similaire à celle réalisée lors de l'identification du SNP régulateur de l'expression de *SCN5A-SCN10* pourra alors être envisagée en partant cette fois directement des données de séquençage.

Les souris KO homozygotes pour le gène *HEY2* présentent des malformations cardiaques. Les études utilisant la technique d'IRM ont montré une variation chez les patients SBr de la morphologie de la chambre de chasse et de la chambre de remplissage du ventricule droit alors que le SBr était jusqu'alors considéré comme une pathologie survenant sur cœurs structurellement sains (Frustaci et al., 2005; Catalano et al., 2009). Il serait donc intéressant d'étudier dans quelle

mesure le polymorphisme identifié dans le locus *HEY2* régulerait ces paramètres morphologiques cardiaques.

D. Discussion générale, discussion et perspectives

Ce projet de thèse a consisté à identifier de nouvelles bases génétiques par trois différentes approches, n'ayant encore jamais été adaptée au SBr, répondant chacune à des questions précises en termes d'influence des variants sur le phénotype SBr. Dans cette partie je discuterai la puissance de ces approches et les perspectives à moyen-long terme en découlant.

➤ Discussion de l'approche gène candidat

L'approche gène candidat consistant à séquencer un grand nombre de gènes impliqués dans les arythmies cardiaques a nécessité un long travail de mise au point de la technologie ainsi que de l'analyse.

La première approche consistant à s'intéresser à la prévalence des mutations dans les gènes connus dans le SBr corrèle avec celles déjà décrites dans la littérature. Cette première analyse a permis de confirmer la prévalence des mutations dans les gènes associés au SBr au sein de la cohorte de patients SBr étudiés. Par cette étude, nous démontrons également l'intérêt de comparer la prévalence de variants rares dans la population SBr par rapport à la population contrôle et que le criblage systématique des gènes de susceptibilité n'apporte pas nécessairement de message relevant sans cette condition.

L'équipe de génétique de l'institut du thorax évalue la puissance des différents tests statistiques existants dans le but d'identifier les gènes présentant un enrichissement en variants rares dans la population SBr par rapport à la population générale.

Ces résultats permettront d'ajouter une information statistique pour l'instant manquante dans l'ensemble des études génétiques associées au SBr.

➤ *Discussion de l'approche familiale du SBr par séquençage d'exome*

L'identification de 3 nouveaux gènes par l'approche de séquençage des parties codantes du génome, couplée à une analyse d'identité par descendance, montre que cette stratégie fonctionne lorsque les variants causaux se trouvent dans les régions codantes. Le choix de familles présentant des patients symptomatiques est crucial dans cette approche de manière à pouvoir focaliser l'analyse exclusivement sur les variants privés.

L'approche visant à identifier dans les 20 individus des mutations présentes dans le même gène ayant échoué, j'ai essayé au cours de mon travail de thèse de raisonner en termes de réseaux protéiques pour expliquer le fait que des mutations dans des gènes différents aboutissent à un même phénotype cardiaque. Pour illustrer mes propos, la Figure 64 réalisée grâce à l'interface « string », représente les relations entre les gènes identifiés au préalable comme étant impliqués dans le SBr ainsi que ceux identifiés par les approches « intrafamiliale ». Compte-tenu du fait que l'interface « string » n'est pas exhaustive, ces résultats sont à prendre en compte avec précaution mais représentent tout de même une information importante. J'ai volontairement écarté de cette représentation certains gènes identifiés dans le SBr (*SLMAP1*, *RANGRF*, *HCN4*) car la représentation du réseau protéique était difficilement visualisable et ne changeait pas le message visé.

On peut visualiser sur cette représentation les différents réseaux protéiques impliquant les canaux potassiques, sodiques, calciques ainsi que le réseau de protéines lié aux microtubules par l'intermédiaire du gène *CLASP2*. J'ai constaté avec surprise le rôle central de la calmoduline codée par le gène *CALM1* (entouré en noir) dans le réseau protéique ainsi généré.

Une mutation sur le gène *CALM1* a très récemment été identifiée par séquençage d'exome dans une famille présentant des événements de mort subite cardiaque chez le sujet jeune (Marsman et al., 2013). Il est donc envisageable que des mutations spécifiques sur ce gène puissent entièrement déréguler le fonctionnement des canaux ioniques cardiaques conduisant à la mort subite.

Le raisonnement en terme de réseau protéique pourra je l'espère, permettre à plus long terme la mise en évidence de cibles pharmacologiques potentielles.

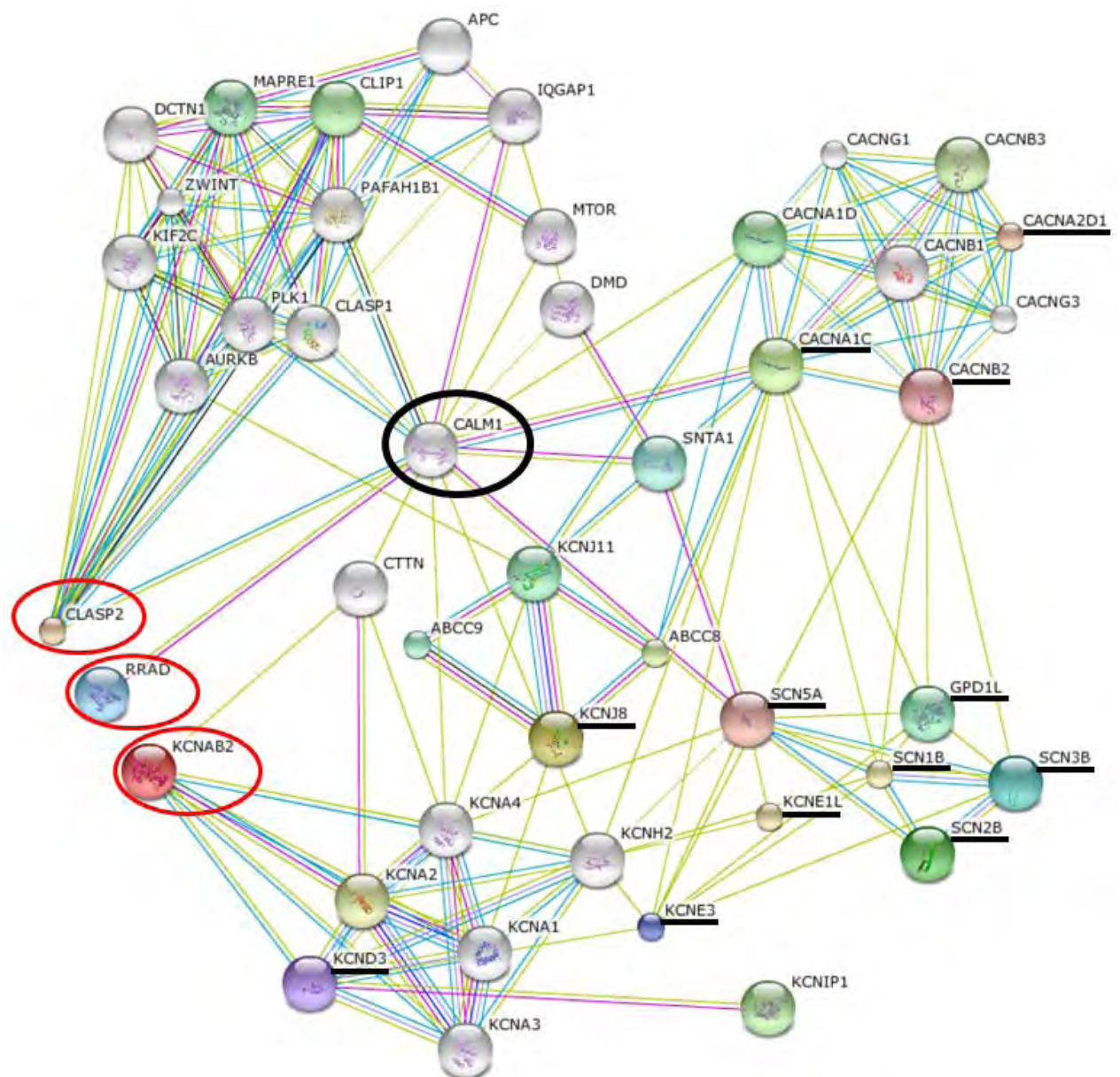


Figure 65 – Représentation de l'interaction des gènes identifiés dans le SBr

Les gènes identifiés dans le SBr sont soulignés. Les gènes identifiés dans ce travail de thèse sont entourés en rouge. Le gène CALM1 semble jouer un rôle central dans la régulation de l'ensemble des réseaux protéiques.

➤ *Perspectives de l'étude d'association*

Cette étude met pour la première fois en évidence l'implication de polymorphismes fréquents sur une pathologie rare et constitue un bouleversement dans la compréhension du SBr mais également sur la portée des études d'association dans les pathologies rares.

L'extension de la GWAS et l'analyse en sous-groupe permettront très certainement l'identification de nouveaux locus impliqués dans le développement du SBr. La création de données eQTL constituerait un outil extrêmement utile et permettrait de faciliter l'interprétation de cette étude. Il serait alors possible, au sein de chaque locus, d'adapter la stratégie d'analyse en considérant soit un élément régulateur de la transcription, soit un gène directement régulé par des variants fréquents changeant sa fonction.

Il est envisageable de créer un nouveau système de capture pour séquençage haut débit ciblant spécifiquement l'ensemble de ces futurs loci dans le but de détecter des variants enrichis dans la population SBr par rapport à la population générale.

Le mode expérimental des travaux ayant permis l'identification du SNP rs6801957 régulant l'expression des gènes *SCN5A-SCN10A* pourrait être adapté à la caractérisation de nouveaux loci conjointement à l'identification de variants enrichis dans ces régions.

A titre d'exemple, et afin de démontrer la transversalité de ces études, je souhaite prendre l'exemple du gène *KCNAB2* identifié en approche « intrafamiliale » dans ce projet. L'identification du gène *KCNAB2* dans le SBr passe par un gain de fonction de la protéine lié à une augmentation de sa localisation sous-membranaire. La protéine Kvβ2 augmente la densité de courant de Kv4.3 mais également d'autres canaux potassiques voltage-dépendants. Il serait donc possible qu'une perte de fonction de cette protéine ou qu'une diminution de son expression conduise à un ralentissement du processus de repolarisation dans les PA des cardiomyocytes. Cette perte de repolarisation pourrait conduire à un allongement de l'intervalle QT à l'échelle électrocardiographique.

Un paramètre intéressant est le fait qu'un locus incluant le gène *KCNAB2* a été retrouvé dans le cadre de la GWAS étudiant la durée de l'intervalle QT dans la population générale (Pfeufer et al., 2009). Une augmentation de la présence du SNP rs846111 est associée à une augmentation de l'intervalle QT. Ce SNP présentant la probabilité d'association la plus forte dans le locus est situé sur le gène *RNF207* (Figure 65). Néanmoins, il ne peut pas être exclu qu'une diminution de

l'expression de *KCNAB2* ne soit pas la cause de ce prolongement de l'intervalle QT. Ce paramètre met en exergue l'intérêt des études d'eQTL dans l'interprétation de ces régions.

Si l'on reprend les fréquences alléliques observées dans la GWAS SBr, on constate, à l'inverse de la GWAS QT (Pfeufer et al., 2009; supplementary table 4), que le SNP rs846111 présente une fréquence allélique inférieure dans la population SBr par rapport à la population contrôle (Bezzina et al., 2013; supplementary table 3). L'absence totale d'association de ce locus dans le SBr ne permet cependant pas d'interpréter ce résultat qui semble lié au hasard.

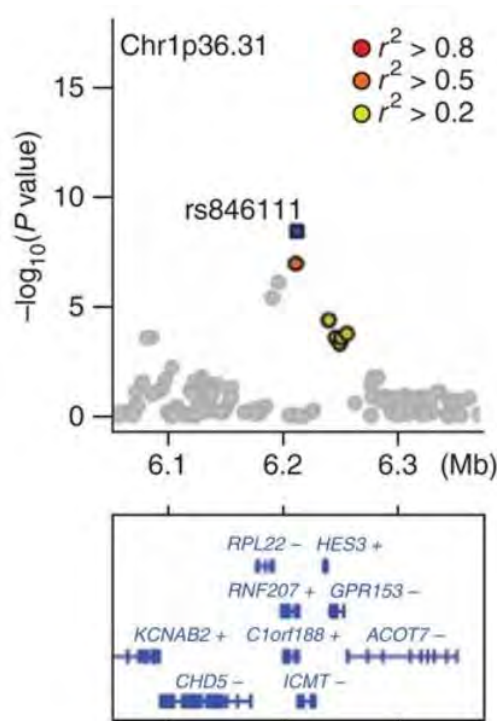


Figure 66 – association d'un loci incluant le gène *KCNAB2* en liaison avec l'allongement de l'intervalle QT

(rs2294934, $r^2=0.028$) (Pfeufer et al., 2009)

➤ Conclusion

L'ensemble des gènes identifiés jusqu'alors dans le SBr, à l'exception du gène *SCN5A*, ne contribue qu'à une faible proportion de la population atteinte de ce syndrome.

Ce travail a permis l'identification de nouveaux gènes impliqués dans des formes familiales du SBr par une approche génétique puissante. Le faible nombre de variants identifiés dans chacun de ces gènes, sur une large cohorte de patients atteints du SBr, suggère une forte hétérogénéité génétique. Cependant, l'ensemble de ces gènes semblerait jouer un rôle à différents niveaux d'une voie physiopathologique commune qui pourrait expliquer un grand nombre de cas.

Raisonnement en termes de réseau protéique en prenant en compte l'ensemble des gènes identifiés dans le SBr pourrait conduire à l'identification de cibles pharmacologiques potentielles.

L'identification de variants fréquents associés au SBr confirme la complexité génétique de ce syndrome. Il est désormais nécessaire de caractériser, par différentes approches (modèles animaux, études familiales), la relation et les conséquences de la combinaison de variants fréquents modulateurs et des variants rares à effet fort dans le SBr.

Les études permettant de caractériser le taux d'expression génique en fonction du génotype (eQTL) sont indispensables à la compréhension des mécanismes de régulation des variants fréquents. L'identification et la caractérisation des variants fréquents causaux permettront de mieux comprendre la relation génotype phénotype dans le SBr.

Il est envisageable, dans le futur, après identification certaine et caractérisation des facteurs de risques associés au syndrome, de créer un système de capture et séquençage spécifique du SBr ciblant l'ensemble des zones régulatrices ainsi que l'ensemble des gènes identifiés et de prédire et stratifier le risque de survenue du syndrome pour chaque patient.

L'ensemble de ces perspectives est également à prendre en considération pour les autres arythmies cardiaques primaires, en particulier pour le syndrome de repolarisation précoce, récemment caractérisé comme proche cliniquement du SBr (Haïssaguerre et al., 2008; Antzelevitch and Yan, 2011) et pour lequel, malgré un mode de transmission similaire, les bases génétiques restent méconnues (Gourraud et al., 2013-Article 4 placé en annexe).

E. ANNEXES

I. Liste des gènes inclus dans le système de capture Haloplex

Ci-dessous se trouve la liste des gènes inclus dans le système de capture haloplex ainsi que le motif du choix.

Gène	Motif de la sélection
CACNB2	BrS
GPD1L	BrS
HCN4	BrS
KCNE3	BrS
RANGRF	BrS
SCN1B	BrS
SCN3B	BrS
KCNJ8	BrS / ERS
KCND3	BrS / IVF
KCNE1L	BrS / IVF
GJA5	CCD
NKX2-5	CCD
TRPM4	CCD
SCN10A	CCD / BrS
DPP6	IVF
AKAP9	LQT
ANK2	LQT
CACNA1C	LQT
KCNE1	LQT
KCNE2	LQT
KCNH2	LQT
KCNJ2	LQT
KCNJ5	LQT
KCNQ1	LQT
SCN4B	LQT
SNTA1	LQT
NOS1AP	LQT ?
SCN5A	LQT / BrS / DCM / IVF
CAV3	LQT / HCM
CACNA2D1	SQTS
EMD	CCD
GJA1	CCD
GJC1	CCD
CACNA1D	sinoatrial node dysfunction and deafness
ABCC9	DCM

Gène	Motif de la sélection
HEY2	Régions GWAS
CLASP2	candidate Nantes
KCNAB2	candidate Nantes
CASQ2	CPVT
TRDN	CPVT
RYR2	ARVC / CPVT
KCNA5	AF
NPPA	AF
DSC2	ARVC
DSP	ARVC
JUP	ARVC
PKP2	ARVC
TGFB3	ARVC
TMEM43	ARVC
DSG2	ARVC / DCM
LMNA	DCM / CCD
MYBPC3	HCM / DCM
MYH7	HCM / DCM
MYL2	HCM / DCM
PLN	HCM / DCM
TNNI3	HCM / DCM
TNNT2	HCM / DCM
KLF15	candidate Amsterdam
NDUFV2	candidate Amsterdam
GPD2	candidate Amsterdam
ANKFY1	candidate Amsterdam
CCR1	candidate Amsterdam
ATXN10	candidate Amsterdam
CXADR	candidate Amsterdam
FGF12	candidate Amsterdam
FGF13	candidate Amsterdam
HOOK3	candidate Amsterdam
MYOF	candidate Amsterdam
NUP155	candidate Amsterdam
PXDNL	candidate Amsterdam
RCAN1	candidate Amsterdam
RGS3	candidate Amsterdam
SLC30A5	candidate Amsterdam
TNNI3K	candidate Amsterdam
ACTA1	candidate Nantes
CAMK2D	candidate Nantes
CLASP1	candidate Nantes

Gène	Motif de la sélection
MAPRE2	candidate Nantes
MAPRE3	candidate Nantes
PACSIN3	candidate Nantes
PTPLA	candidate Nantes
SPTBN5	candidate Nantes
TRPM1	candidate Nantes
KCNAB3	candidate Nantes
LMCD1	candidate Nantes
BMP2	CCD candidate
BMPR1A	CCD candidate
GATA4	CCD candidate
MSX2	CCD candidate
Tbx5	CCD candidate
CALR3	DCM
DES	DCM
DTNA	DCM
EYA4	DCM
NEXN	DCM
PSEN1	DCM
PSEN2	DCM
RBM20	DCM
SGCD	DCM
TAZ	DCM
IRX3	functional candidate
KCNA4	functional candidate
KCNAB1	functional candidate
KCNE4	functional candidate
KCNIP2	functional candidate
KCNJ11	functional candidate
KCNJ12	functional candidate
KCNJ4	functional candidate
IRX5	functional candidate Nantes / Amsterdam
LAMP2	HCM
MYL3	HCM
MYLK2	HCM
PRKAG2	HCM
ACTC1	HCM / DCM
ACTN2	HCM / DCM
CSRP3	HCM / DCM
JPH2	HCM / DCM
LDB3	HCM / DCM
MYH6	HCM / DCM

Gène	Motif de la sélection
TCAP	HCM / DCM
TNNC1	HCM / DCM
TPM1	HCM / DCM
TTN	HCM / DCM
VCL	HCM / DCM
ATP2A2	LQT ?
SLC8A1	LQT ?
SRL	LQT ?
ANKRD1	other cardiomyopathy
BAG3	other cardiomyopathy
CTF1	other cardiomyopathy
FXN	other cardiomyopathy
GLA	other cardiomyopathy
MYPN	other cardiomyopathy
ASPH	Amsterdam meeting candidates
IRX1	Amsterdam meeting candidates
MEF2C	Amsterdam meeting candidates
PITX2	Amsterdam meeting candidates
TBX2	Amsterdam meeting candidates
TBX3	Amsterdam meeting candidates
GJD3	Amsterdam meeting candidates
HDAC1	Amsterdam meeting candidates
HDAC2	Amsterdam meeting candidates
SMAD4	Amsterdam meeting candidates
TBX18	Amsterdam meeting candidates
SHOX2	Amsterdam meeting candidates
ID2	Amsterdam meeting candidates
NOTCH1	Amsterdam meeting candidates
TBX1	Amsterdam meeting candidates
TBX20	Amsterdam meeting candidates
NEDD4L	Amsterdam meeting candidates
DLG1	Amsterdam meeting candidates
FKBP1B	Amsterdam meeting candidates
AKAP5	Amsterdam meeting candidates
HEY1	Amsterdam meeting candidates
TJP1	Amsterdam meeting candidates
SYNPO2L	Amsterdam meeting candidates
BVES	Amsterdam meeting candidates
POPDC2	Amsterdam meeting candidates
HAND2	Amsterdam meeting candidates
NCOA7	GWAS-voisin-HEY2

Liste des abbreviations du tableau descriptif des genes inclus dans le système Haloplex:

HCM: cardiomyopathie hypertrophique

DCM: cardiomyopathie dilatée

LQT: syndrome du QT long

CCD: troubles de la conduction

IVF: fibrillation ventriculaire idiopathique

ERS: syndrome de repolarisation précoce

Brs: Syndrome de Brugada

ARVC: dysplasia

II. Données complémentaires de l'article 3

Article 3: Common variants at *SCN5A-SCN10A* and *HEY2* are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death

(Supplemental data ; Nat Genet. 2013 Aug 28;45(9):1044-9.)

Common variants at *SCN5A/SCN10A* and *HEY2* are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death

Connie R. Bezzina^{1*}, Julien Barc^{1,2*}, Yuka Mizusawa^{1*}, Carol Ann Remme^{1*}, Jean-Baptiste Gourraud^{3,4,5,6*}, Floriane Simonet^{3,4,5}, Arie O. Verkerk⁷, Peter J. Schwartz⁸⁻¹³, Lia Crotti^{8,9,14}, Federica Dagradi^{8,9}, Pascale Guicheney^{15,16}, Véronique Fressart^{15,16,17}, Antoine Leenhardt^{18,19,20}, Charles Antzelevitch²¹, Susan Bartkowiak²¹, Eric Schulze-Bahr²², Sven Zumhagen²², Elijah R. Behr²³, Rachel Bastiaenen²³, Jacob Tfelt-Hansen^{24,25}, Morten Salling Olesen^{24,25}, Stefan Käåb^{26,27}, Britt M. Beckmann^{26,27}, Peter Weeke²⁸, Hiroshi Watanabe²⁹, Naoto Endo³⁰, Tohru Minamino²⁹, Minoru Horie³¹, Seiko Ohno³¹, Kanae Hasegawa³¹, Naomasa Makita³², Akihiko Nogami³³, Wataru Shimizu^{34,35}, Takeshi Aiba³⁵, Philippe Froguel^{36,37,38}, Beverley Balkau^{39,40}, Olivier Lantieri⁴¹, Margherita Torchio^{8,9}, Cornelia Wiese⁴², David Weber⁴², Rianne Wolswinkel¹, Ruben Coronel¹, Bas J. Boukens^{1,7}, Stéphane Béziau⁴³, Eric Charpentier^{3,4,5}, Stéphanie Chatel^{3,4,5,6}, Aurore Despres^{3,4,5,6}, Françoise Gros^{3,4,5}, Florence Kyndt^{3,4,5,6,43}, Simon Lecointe^{3,4,5,6}, Pierre Lindenbaum^{3,4,5,6}, Vincent Portero^{3,4,5}, Jade Violleau^{3,4,5,6}, Manfred Gessler⁴², Hanno L. Tan¹, Dan Roden²⁸, Vincent M. Christoffels⁷, Hervé Le Marec^{3,4,5,6}, Arthur A. Wilde^{1*}, Vincent Probst^{3,4,5,6*}, Jean-Jacques Schott^{3,4,5,6*}, Christian Dina^{3,4,5,6*} & Richard Redon^{3,4,5,6*}

SUPPLEMENTARY INFORMATION

- | | |
|---------------------------------|--------|
| 1. Supplementary Tables 1 – 6 | Page 2 |
| 2. Supplementary Figures 1 – 12 | Page 8 |

Supplementary Table 1: Summarized clinical information on 1,114 patients with Brugada syndrome

<i>Clinical Centre</i>	<i>n</i>	<i>Males</i>	<i>Age at diagnosis</i>	<i>Baseline Type-I ECG</i>	<i>Symptoms ⁽¹⁾</i>	<i>SCN5A carriers</i>
Nantes (FR)	422	323 (77%)	48 (+/-13)	295 (46%)	153 (36%)	71 (17%)
Pavia (IT)	126	105 (83%)	42 (+/-14)	46 (37%)	16 (13%)	20 (16%)
Amsterdam (NL)	101	84 (83%)	48 (+/-13)	46 (46%)	52 (51%)	23 (23%)
Paris (FR)	93	84 (90%)	44 (+/-13)	56 (60%)	28 (30%)	15 (16%)
Utica (US)	74	49 (66%)	42 (+/-17)	24 (32%)	41 (55%)	10 (14%)
Other Centers ⁽²⁾	90	71 (79%)	44 (+/-14)	47 (52%)	42 (47%)	21 (23%)
Japan ⁽³⁾	208	190 (91%)	46 (+/-15)	95 (46%)	84 (40%)	29 (14%)

⁽¹⁾ Ventricular tachycardia, ventricular fibrillation, syncope and near syncope

⁽²⁾ Munster (DE), London (UK), Copenhagen (DK), Munich (DE), Nashville (US)

⁽³⁾ Osaka, Nagasaki, Shiga

Supplementary Table 2: List of SNPs reaching genome-wide significance in the GWAS

SNP	Chromosome	Position	closest gene(s)	Risk allele	Protective allele	P-value	Odds ratio (95% CI)
rs6599240	3	38738717	<i>SCN10A</i>	A	G	1,20E-13	2.0696 [1.7076-2.5084]
rs11129801	3	38750375	<i>SCN10A</i>	G	A	2,77E-08	1.9969 [1.5645-2.5487]
rs9874633	3	38771994	<i>SCN10A</i>	A	G	1,66E-13	2.7009 [2.0742-3.5169]
rs10428132	3	38777554	<i>SCN10A</i>	T	G	6,79E-26	3.0026 [2.4465-3.6851]
rs7428167	3	38778191	<i>SCN10A</i>	T	C	1,22E-22	2.8625 [2.3191-3.5331]
rs10428168	3	38780059	<i>SCN10A</i>	T	C	2,36E-15	2.6190 [2.0636-3.3238]
rs12638572	3	38787797	<i>SCN10A</i>	A	G	2,48E-10	2.1155 [1.6773-2.6680]
rs7641844	3	38802251	<i>SCN10A</i>	A	G	3,80E-08	2.0198 [1.5722-2.5947]
rs7430439	3	38803639	<i>SCN10A</i>	G	A	1,10E-08	1.7533 [1.4460- 2.1258]
rs6599257	3	38804588	<i>SCN10A</i>	C	T	1,01E-14	2.1738 [1.7858-2.6460]
rs1268070	6	126041164	<i>HEY2</i>	C	T	5,13E-09	1.8030 [1.4795-2.1973]
rs9388451	6	126090377	<i>HEY2, NCOA7</i>	C	T	8,85E-10	1.8325 [1.5099-2.2240]

Supplementary Table 3: GWAS results for hit-SNPs from previously associated with ECG traits

SNP	Cyto Band	Nearest genes	MAF	General trait	allele_A	allele_B	cases_maf	controls_maf	tinfo	beta	se	P-value
rs846111	1p36.31	RNF207,NPHP4,CHDS,ACOT7,PLEKHG5,KLH20	0.26	QTc	G	C	0,253	0,268	0,493	-0,126	0,148	3,94E-01
rs9436640	1p31.3p31.2	NFIA	0.48	QRS	T	G	0,468	0,448	0,950	0,078	0,095	4,09E-01
rs4074536	1p13.3p11	CASQ2	0.30	QRS	T	C	0,309	0,290	1,000	0,080	0,101	4,31E-01
rs2880058	1q23.3	NOS1AP	0.26	QTc	A	G	0,358	0,337	0,893	0,146	0,103	1,56E-01
rs12143842	1q23.3	NOS1AP	0.16	QTc	C	T	0,274	0,254	1,000	0,157	0,107	1,41E-01
rs10494366	1q23.3	NOS1AP	0.33	QTc	G	T	0,399	0,365	1,000	-0,159	0,095	9,59E-02
rs16857031	1q23.3	NOS1AP	0.15	QTc	C	G	0,146	0,145	1,000	0,054	0,131	6,82E-01
rs12029454	1q23.3	NOS1AP	0.11	QTc	G	A	0,176	0,165	1,000	0,107	0,126	3,96E-01
rs4657178	1q23.3	NOS1AP	0.18	QTc	C	T	0,272	0,275	1,000	0,026	0,103	8,03E-01
rs10919071	1q24.2	ATP1B1	0.11	QTc	A	G	0,109	0,138	1,000	-0,241	0,140	8,47E-02
rs12731740	1q32.2	CD46,CD34,PLXNA2PLXNA2	0.09	Heart rate	C	T	0,115	0,101	1,000	0,127	0,149	3,94E-01
rs2745967	1q32	CD34	0.49	Heart rate	G	A	0,372	0,371	1,000	0,035	0,095	7,17E-01
rs17391905	1p32.3	C1orf185,RNF11,CDKN2C,FAF1	0.03	QRS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs7562790	2p21	CRIM1	0.36	QRS	T	G	0,396	0,406	0,998	-0,028	0,095	7,68E-01
rs17020136	2p22.2	HEATR5B,STRN	0.23	QRS	T	C	0,213	0,182	0,998	0,206	0,119	8,32E-02
rs10865355	2p14	MEIS1	0.46/0.48*	PR	A	G	0,402	0,377	0,999	-0,064	0,099	5,14E-01
rs11897119	2p14	MEIS1	0.46	PR	T	C	0,401	0,377	0,997	0,057	0,099	5,63E-01
rs2051211	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.19	QRS	A	G	0,217	0,255	0,995	-0,205	0,108	5,88E-02
rs10865879	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.26	QRS	A	C	0,282	0,233	0,949	0,246	0,112	2,81E-02
rs11129795	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.25	QRS	G	A	0,284	0,233	0,960	0,255	0,111	2,18E-02
rs12053903	3p22.2	SCN5A	0.29	QTc	T	C	0,394	0,327	0,950	0,298	0,101	3,15E-03
rs3922844	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.26/0.68*	PR	T	C	0,233	0,298	0,967	0,344	0,107	1,29E-03
rs11708996	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.17	PR/QRS	G	C	0,228	0,151	1,000	0,540	0,121	8,65E-06
rs6599222	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.23/0.29*	PR	C	T	0,286	0,218	0,897	-0,411	0,114	3,19E-04
rs11710077	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.18	QRS	A	T	0,166	0,197	0,682	-0,266	0,146	6,79E-02
rs9851724	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.28	QRS	C	T	0,226	0,307	0,981	0,387	0,102	1,56E-04
rs6795970	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.42	PR/QRS	A	G	0,668	0,410	0,968	-0,993	0,091	1,11E-27
rs6798015	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.38/0.06*	PR	C	T	0,607	0,364	0,952	-0,985	0,093	3,53E-26
rs7627552	3p22.2	SCN5A,SCN10A	0.18*	PR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs4687718	3p14.3	TKT,PRKCD,CACNA1D	0.13	QRS	A	G	0,120	0,118	0,949	0,005	0,146	9,74E-01
rs2242285	3p14.1	LRIG-SLC25A26	0.37	QRS	A	G	0,436	0,400	0,988	-0,130	0,097	1,81E-01
rs7660702	4q22.1	ARHGAP24	0.25	PR	T	C	0,277	0,303	1,000	-0,121	0,101	2,27E-01
rs13165478	5q33	HAND1,SAP30L	0.33	QRS	G	A	0,339	0,380	0,993	-0,204	0,097	3,60E-02
rs251253	5q35.1	C5orf41,NKX2.5	0.38	PR	C	T	0,438	0,377	0,937	-0,276	0,097	4,58E-03
rs1321311	6p21.2	PI16,CDKN1A	0.31	QRS	C	A	0,267	0,248	0,986	0,083	0,106	4,35E-01
rs281868	6q22.31	C6orf204,SLC35F1,PLN,BRD7P3,ASF1A	0.48	Heart rate	G	A	0,478	0,490	0,995	-0,057	0,092	5,34E-01
rs11153730	6q22.31	C6orf204,SLC35F1,PLN,BRD7P3,ASF1A	0.48	QRS	T	C	0,470	0,463	0,982	0,020	0,094	8,30E-01
rs11970286	6q22.1-6q22.31	C6orf204,SLC35F1,PLN,BRD7P3,ASF1A	0.47	QTc	C	T	0,427	0,422	0,985	-0,001	0,094	9,89E-01
rs12210810	6q22.1-6q22.31	C6orf204,SLC35F1,PLN,BRD7P3,ASF1A	0.08	QTc	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs11154022	6q21q23.2	GJA1	0.29	Heart rate	A	G	0,337	0,339	0,998	-0,024	0,097	8,02E-01
rs9398652	6q21q23.2	GJA1	0.07	Heart rate	C	A	0,085	0,099	0,991	-0,146	0,161	3,64E-01
rs1362212	7p14.3	TBX20	0.13	QRS	G	A	0,226	0,182	0,999	0,319	0,116	6,02E-03
rs7784776	7p12.3	IGFBP3	0.48	QRS	A	G	0,430	0,420	0,984	0,067	0,097	4,87E-01
rs314370	7q22	SLC12A9,UFSF1	0.22	Heart rate	T	C	0,176	0,189	0,930	-0,128	0,122	2,94E-01
rs3807989	7q31.1	CAV1/CAV2	0.43	PR	A	G	0,471	0,401	1,000	-0,273	0,092	2,94E-03
rs2968863	7q36.1	KCNH2	0.26	QTc	C	T	0,245	0,277	0,989	-0,112	0,106	2,92E-01
rs4725982	7q36.1	KCNH2	0.18	QTc	C	T	0,221	0,204	0,955	0,124	0,117	2,90E-01
rs1733724	10q11.2	DDK2	0.23	QRS	A	G	0,260	0,238	0,996	-0,121	0,106	2,56E-01
rs7342028	10q25.2	VTG1A	0.27	QRS	G	T	0,260	0,277	0,981	-0,058	0,103	5,75E-01
rs2074238	11p15.5	KCNQ1	0.08	QTc	T	C	0,093	0,079	0,480	-0,499	0,245	4,17E-02
rs12296050	11p15.5	KCNQ1	0.23	QTc	C	T	0,180	0,196	0,780	-0,145	0,132	2,73E-01
rs12576239	11p15.5	KCNQ1	0.16	QTc	C	T	0,124	0,134	0,848	-0,136	0,146	3,52E-01
rs174547	11q12.2q13.1	FADS1	0.38	Heart rate	T	C	0,329	0,305	0,994	0,069	0,099	4,90E-01
rs4944092	11q13.5	WNT11	0.29	PR	A	G	0,291	0,307	0,609	-0,117	0,128	3,61E-01
rs17287293	12p12.1	SOX5,BCAT1	0.15	Heart rate	A	G	0,171	0,158	0,997	0,144	0,127	2,56E-01
rs11047543	12p12.1	SOX5,BCAT1	0.15	PR	G	A	0,176	0,159	1,000	0,177	0,125	1,57E-01
rs883079	12q24.21	TBX3,TBX5	0.28	QRS	C	T	0,356	0,280	1,000	-0,356	0,101	3,97E-04
rs3825214	12q24.21	TBX5	0.22	QTc	G	A	0,252	0,190	1,000	-0,367	0,115	1,38E-03
rs7312625	12q24.21	TBX3,TBX5	0.27/0.25*	PR	G	A	0,338	0,264	0,995	-0,352	0,102	5,46E-04
rs1896312	12q24.21	TBX3,TBX5	0.38	PR	C	T	0,303	0,286	0,990	-0,054	0,102	6,00E-01
rs10850409	12q24.21	TBX3,TBX5	0.32	QRS	G	A	0,278	0,269	0,969	0,031	0,104	7,69E-01
rs885389	12q24.33	GPR133	0.29	Heart rate	A	G	0,375	0,332	0,971	-0,171	0,099	8,33E-02
rs3825214	12q24.21	TBX3,TBX5	0.22	PR/QRS, QTc	G	A	0,252	0,190	1,000	-0,367	0,115	1,38E-03
rs2478333	13q12.2q13.3	SUCLA2	0.35	QTc	C	A	0,364	0,353	1,000	0,026	0,096	7,84E-01
rs1886512	13q22	KLF12	0.33	QRS	T	A	0,363	0,378	0,994	-0,072	0,094	4,45E-01
rs365990	14q11.2	MYH6,MYH7,NDNG,ZFHX2	0.31	Heart rate	A	G	0,383	0,378	0,613	0,047	0,123	7,05E-01
rs223116	14q11.2	MYH6,MYH7,NDNG,ZFHX2	0.25	Heart rate	A	G	0,265	0,253	0,770	-0,101	0,120	4,02E-01
rs11848785	14q24.2	SIPA1L1	0.30	QRS	G	A	0,296	0,270	0,991	-0,160	0,107	1,34E-01
rs8049607	16p13.13	LITAF,CLEC16A,SNR,ZC3H7A,TNFRSF16	0.49	QTc	T	C	0,484	0,481	0,940	0,018	0,099	8,58E-01
rs37062	16q21	CNOT1,GINS3,SLC38A7,GOT1	0.27	QTc	A	G	0,260	0,239	0,997	0,081	0,107	4,48E-01
rs2074518	17q11.2q12	LIG3,RFFL	0.49	QTc	C	T	0,479	0,456	0,994	0,059	0,093	5,27E-01
rs17608766	17q21	GOSR2	0.09	QRS	T	C	0,136	0,135	1,000	0,031	0,133	8,14E-01
rs9912468	17q22q23.2	PRKCA	0.42	QRS	G	C	0,473	0,454	1,000	-0,099	0,090	2,73E-01
rs17779747	17q24.3	KCNJ2	0.32	QTc	G	T	0,353	0,332	0,995	0,109	0,097	2,63E-01
rs991014	18q21.1	SETBP1	0.41	QRS	C	T	0,405	0,403	1,000	0,004	0,095	9,66E-01
rs1805128	21q22.12	KCNE1	0.03	QTc	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Supplementary Table 4 : Cumulative effect of the three associated SNPs on susceptibility to Brugada syndrome, in Europe and Japan

Nb of at-risk alleles	Europe			Japon		
	% controls	% cases	OR	% controls	% cases	OR
0-1	27.8	9.7	1	40.0	15.4	1
2	35.8	21.8	1.69 [1.27-2.26]	40.9	37.0	2.35 [1.52-3.63]
3	25.5	33.6	3.69 [2.78-4.89]	15.2	30.3	5.18 [3.26-8.25]
4	9.4	26.2	7.89 [5.75-10.81]	3.7	14.4	10.14 [5.56-18.49]
5-6	1.5	8.7	19.89 [11.68-33.86]	0.1	2.9	75.00 [8.76-642.2]

Supplementary Table 5: Subset analyses testing for association with symptoms, baseline type-1 ECG and SCN5A mutation status

Trait	SNP	Population	Affected (PP PR RR)			Non aff. (PP PR RR)			beta add	p add
Symptoms	rs11708996_C	Europe	200	110	15	317	198	33	-0,163	0,172
		Japan	66	15	3	105	16	0	0,630	0,066
		All	266	125	18	422	214	33	-0,074	0,509
	rs10428132_T	Europe	31	138	162	76	240	232	0,277	0,009
		Japan	32	34	17	37	56	28	-0,205	0,293
		All	63	172	179	113	296	260	0,170	0,065
	rs9388451_C	Europe	48	157	123	99	240	218	0,027	0,783
		Japan	8	38	37	9	44	68	-0,337	0,132
		All	56	195	160	108	284	286	-0,032	0,722
Baseline BrS ECG	rs11708996_C	Europe	250	134	24	274	179	25	-0,102	0,377
		Japan	76	15	3	97	16	0	0,414	0,228
		All	326	149	27	371	195	25	-0,045	0,682
	rs10428132_T	Europe	46	185	179	63	198	220	-0,003	0,974
		Japan	30	43	22	40	47	24	0,095	0,620
		All	76	228	201	103	245	244	0,020	0,822
	rs9388451_C	Europe	64	189	157	86	213	189	0,009	0,926
		Japan	7	37	50	10	45	57	0,093	0,678
		All	71	226	207	96	258	246	0,028	0,755
SCN5A mutation	rs11708996_C	Europe	100	50	8	419	262	40	-0,134	0,385
		Japan	24	3	1	149	28	2	-0,093	0,855
		All	124	53	9	568	290	42	-0,127	0,391
	rs10428132_T	Europe	19	79	62	89	299	336	-0,215	0,097
		Japan	15	12	2	55	78	44	-0,839	0,010
		All	34	91	64	144	377	380	-0,306	0,009
	rs9388451_C	Europe	24	76	60	125	325	281	0,061	0,633
		Japan	2	9	17	15	73	90	0,305	0,365
		All	26	85	77	140	398	371	0,095	0,423

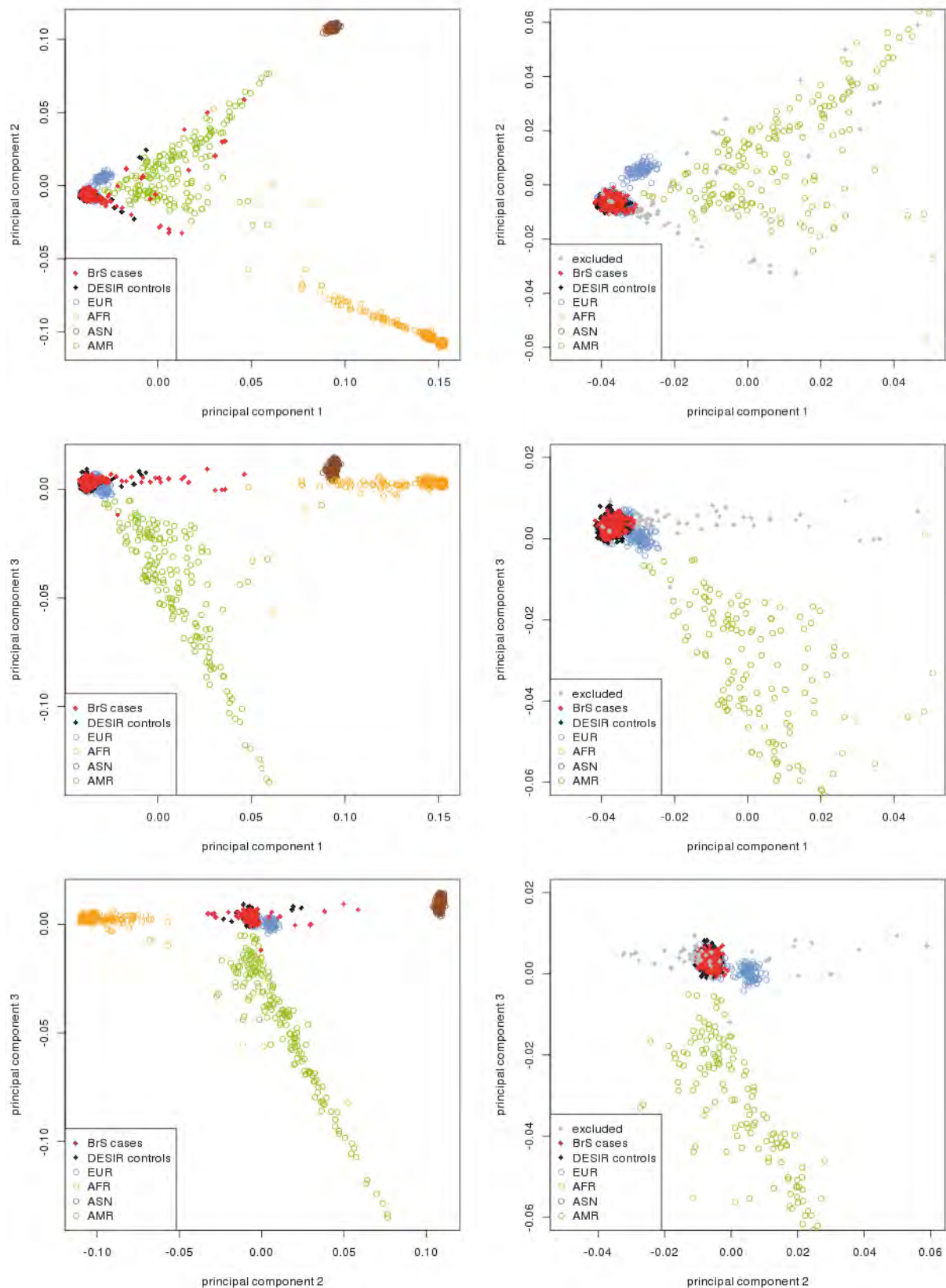
* PP: homozygous for the protective allele ; PR : heterozygous ; RR: homozygous for the risk alleles

Supplementary Table 6: Independent heterozygote effects for the three associated SNPs

SNP	OR	Z score	p-value
rs11708996	1.01 [0.79-1.29]	0.07	9.46E-01
rs10428132	0.92 [0.79-1.07]	-1.06	2.90E-01
rs9388451	0.86 [0.74-1.01]	-1.84	6.55E-02

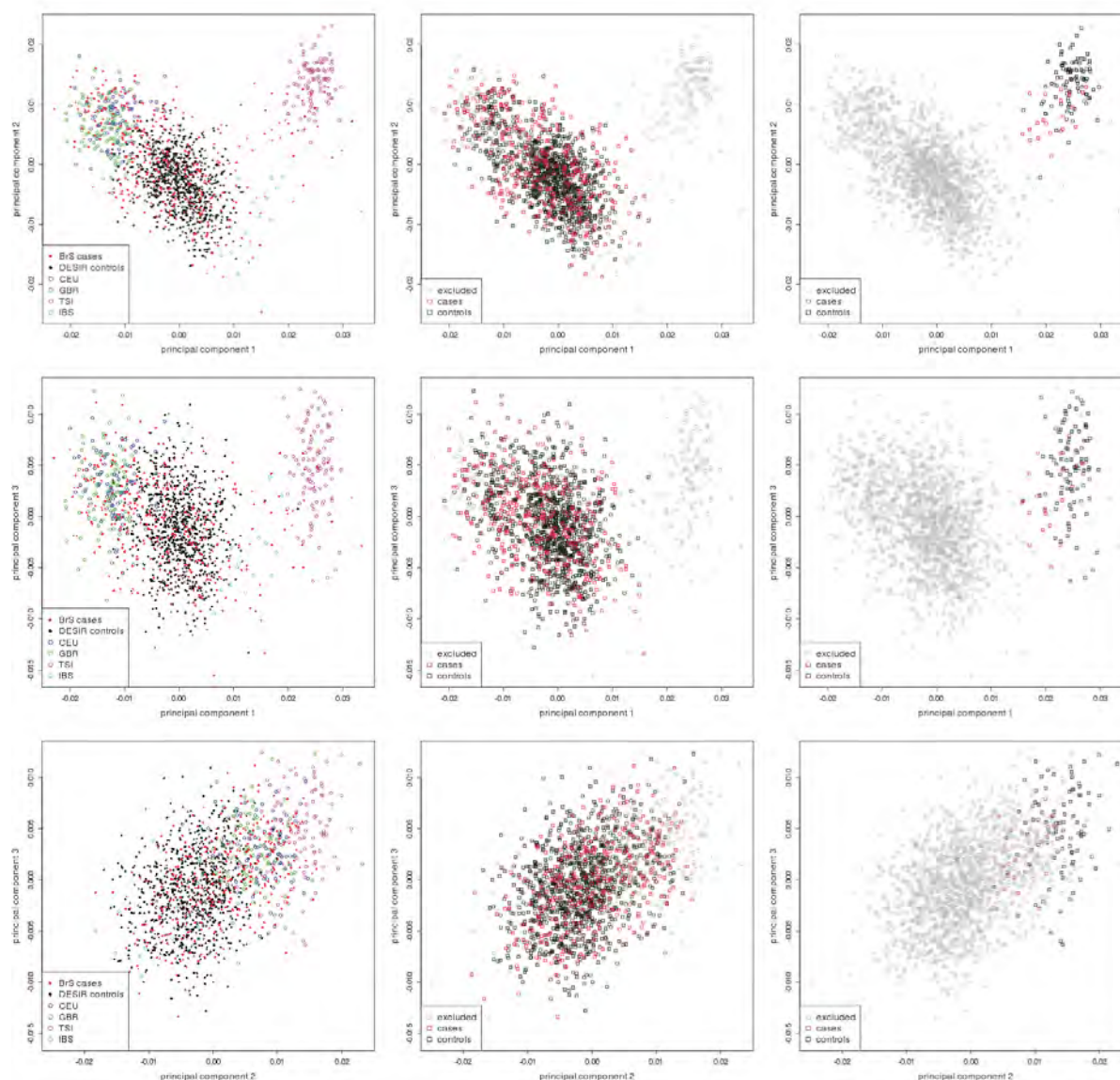
Supplementary Figure 1: Multidimensional scaling (MDS) identifies 42 samples of non-European descent

On the left-panels, the first 3 principal components are plotted against one another for combined genotype data from cases, D.E.S.I.R. controls, and individuals from the 1000 Genomes Project (EUR, European; AFR, African; ASN, East Asian; AMR, Admixed American). The right-panels are zoomed views from the same plots, where 42 samples of Non-European descent, which were excluded from the GWAS study, are displayed in grey.



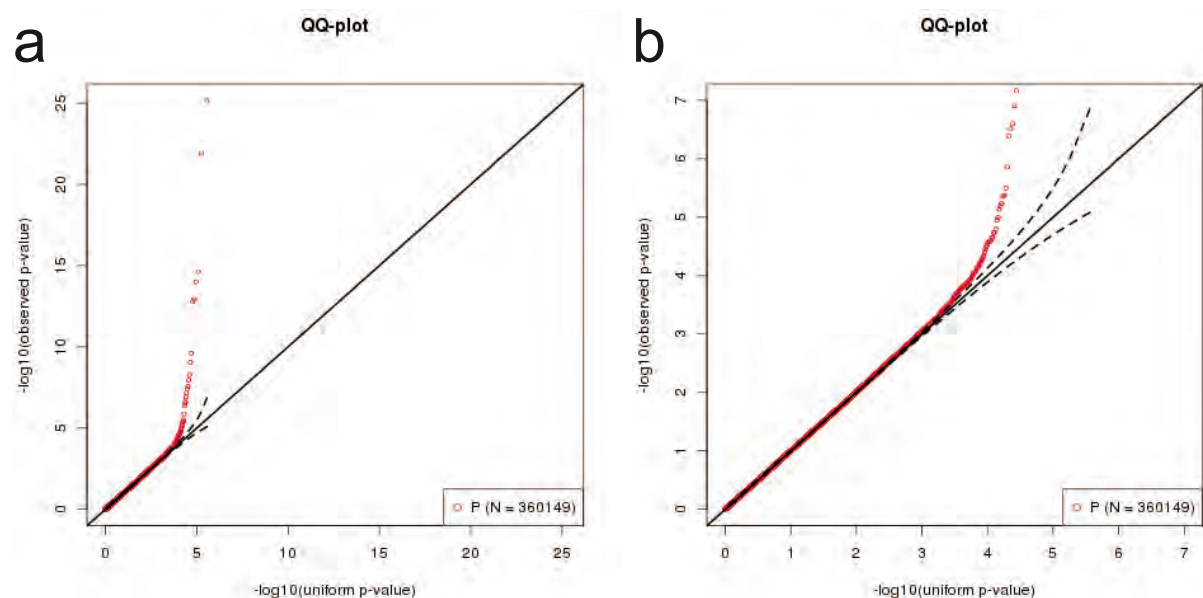
Supplementary Figure 2: MDS on samples of European ancestry defines 2 homogeneous case-control sets suitable for GWAS

MDS including genotype data of European descent individuals drawn from 1000 Genomes Project indicates, as displayed in the left-panels, that the corresponding individuals can be used as additional controls in the present study. The GWAS was conducted separately on the two homogeneous case-control groups thus identified (shown respectively on the middle- and right-panels). The association data obtained on both groups were subsequently combined in a meta-analysis, which included a total of 312 cases and 1,115 ancestry-matched controls. CEU, Utah residents (CEPH) with Northern and Western European ancestry; GBR, British from England and Scotland; TSI, Tuscan from Italy; IBS, Iberian populations from Spain.



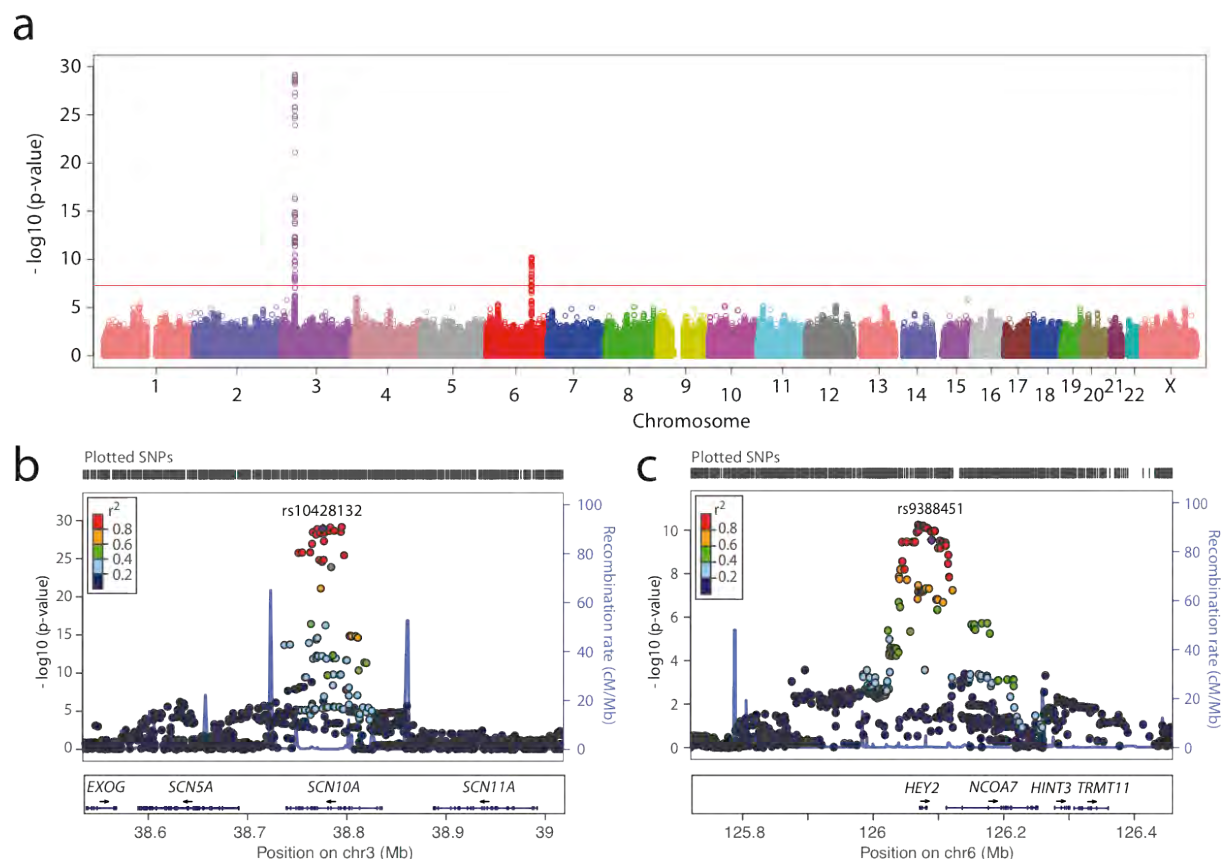
Supplementary Figure 3: Quantile-quantile plot for the genome-wide association results

(a) Q-Q plot of association results (inverse normal meta-analysis) for 360,149 SNPs in 312 cases and 1,115 ancestry-matched controls. The horizontal axis shows ($-\log_{10}$ transformed) expected p values while the vertical axis indicates ($-\log_{10}$ transformed) observed p values. Straight line indicates expected results under null hypothesis. **(b)** Zoomed view of the same Q-Q plot, indicating no widespread small differences in allele frequencies between cases and controls.



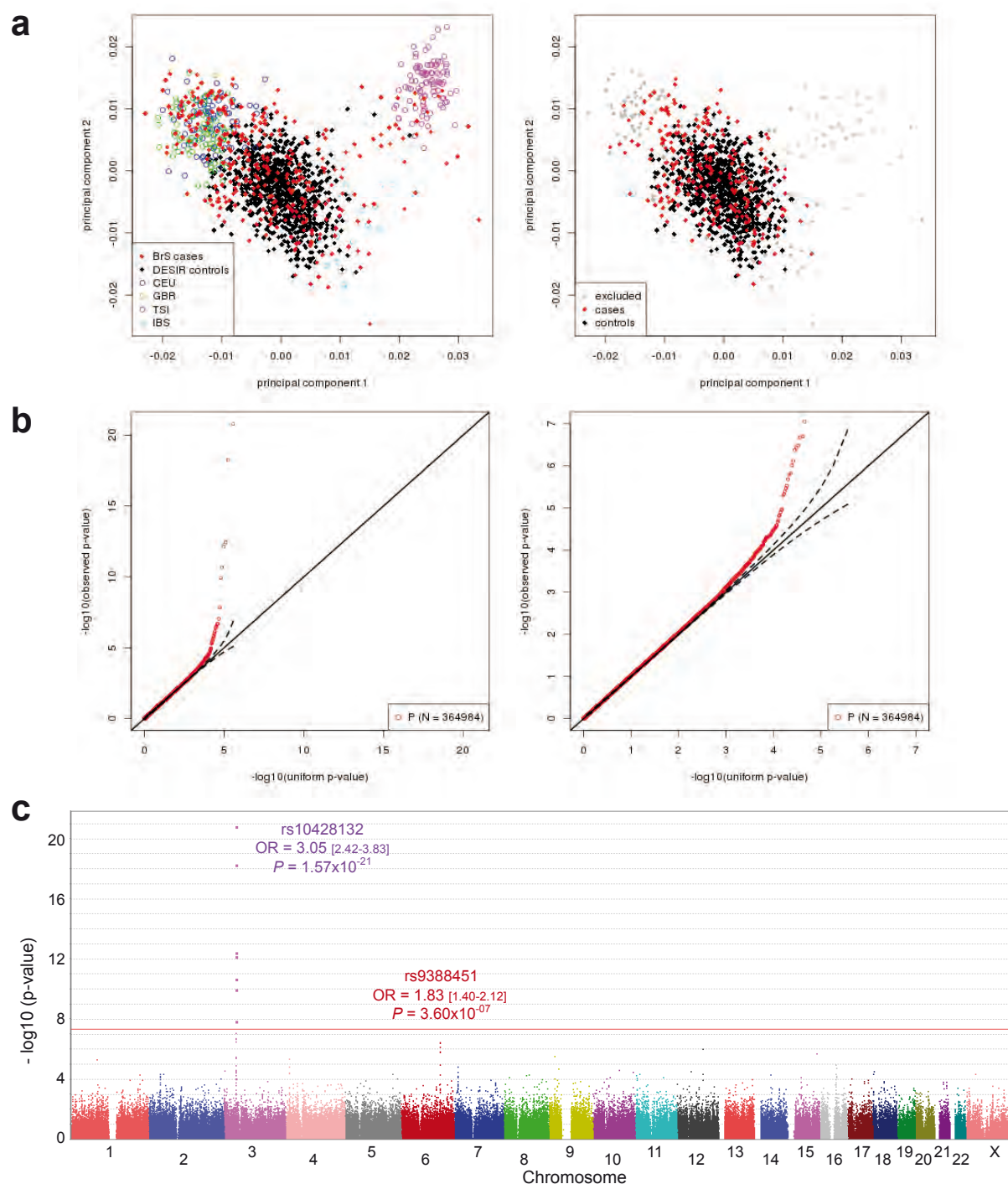
Supplementary Figure 4: Manhattan plot and association results at each significantly associated locus after genome-wide imputation of non-genotyped alleles

(a) Manhattan plot showing the association of SNPs with Brugada syndrome in a GWAS of 312 cases versus 1,115 controls, after imputation of the 1000 Genome Project variants (CEU population). The red horizontal line marks the threshold for genome-wide significance ($P = 5 \times 10^{-8}$). Two loci reached genome-wide significance, on chromosomes 3 and 6. (b) Association plots at 3q22.2 (left panel) and 6q22.32 (right panel). Each SNP is plotted with respect to its chromosomal location (x-axis) and its P value (y-axis on the left). SNPs are coloured according to their degree of linkage disequilibrium (R^2), with the leading variant highlighted with a purple square and displayed by name. The tall blue spikes indicate the recombination rate (y-axis on the right) at that region of the chromosome. The blue-outlined triangles indicate coding region SNPs. Coordinates are given according to NCBI build 37.



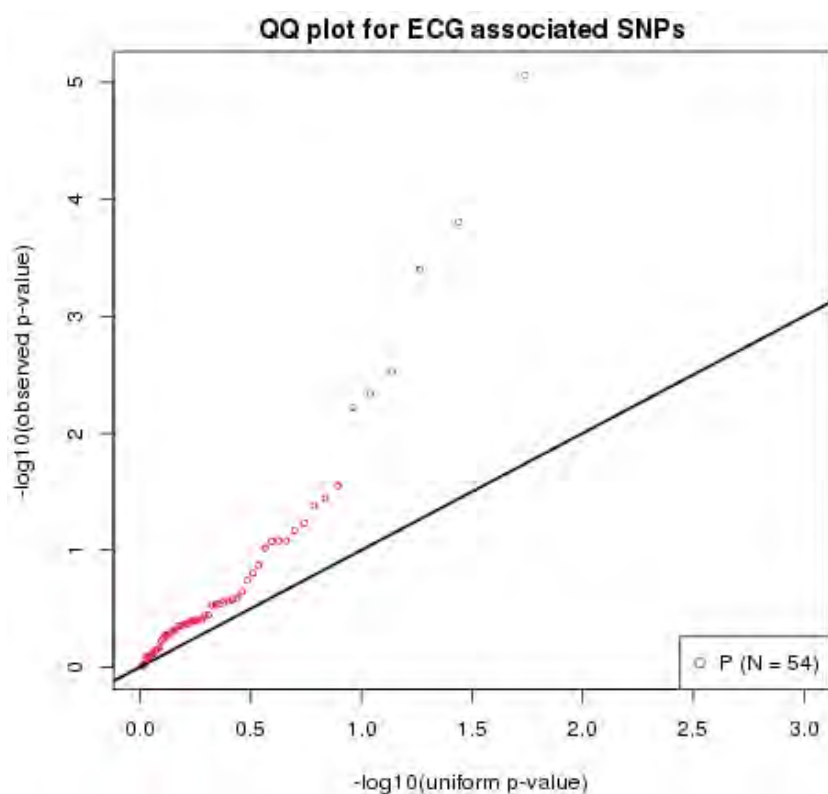
Supplementary Figure 5: Restricting the GWAS to D.E.S.I.R. controls and ancestry-matched cases with Brugada syndrome by stringent MDS criteria confirms both association hits

(a) On the left-panel, the first two principal components are plotted against one another for combined genotype data from the cases, D.E.S.I.R. controls, and European descent individuals from the 1000 Genomes Project (CEU, Utah residents (CEPH) with Northern and Western European ancestry; GBR, British from England and Scotland; TSI, Tuscan from Italy; IBS, Iberian populations from Spain). The right-panel displays the first two principal components for genotype data pertaining to the 856 D.E.S.I.R. controls and 254 cases used in the subsequent GWAS: the samples in grey were excluded from subsequent GWAS by applying stringent exclusion criteria. **(b)** The left-panel displays the Q-Q plot of association results for 364,984 SNPs in the 254 cases and the 856 ancestry-matched controls. The right-panel is a zoomed view of the same plot, indicating no widespread small differences in allele frequencies between cases and controls. **(c)** Manhattan plot showing SNP association with Brugada syndrome. The red horizontal line marks the threshold for genome-wide significance ($P=5\times 10^{-8}$).



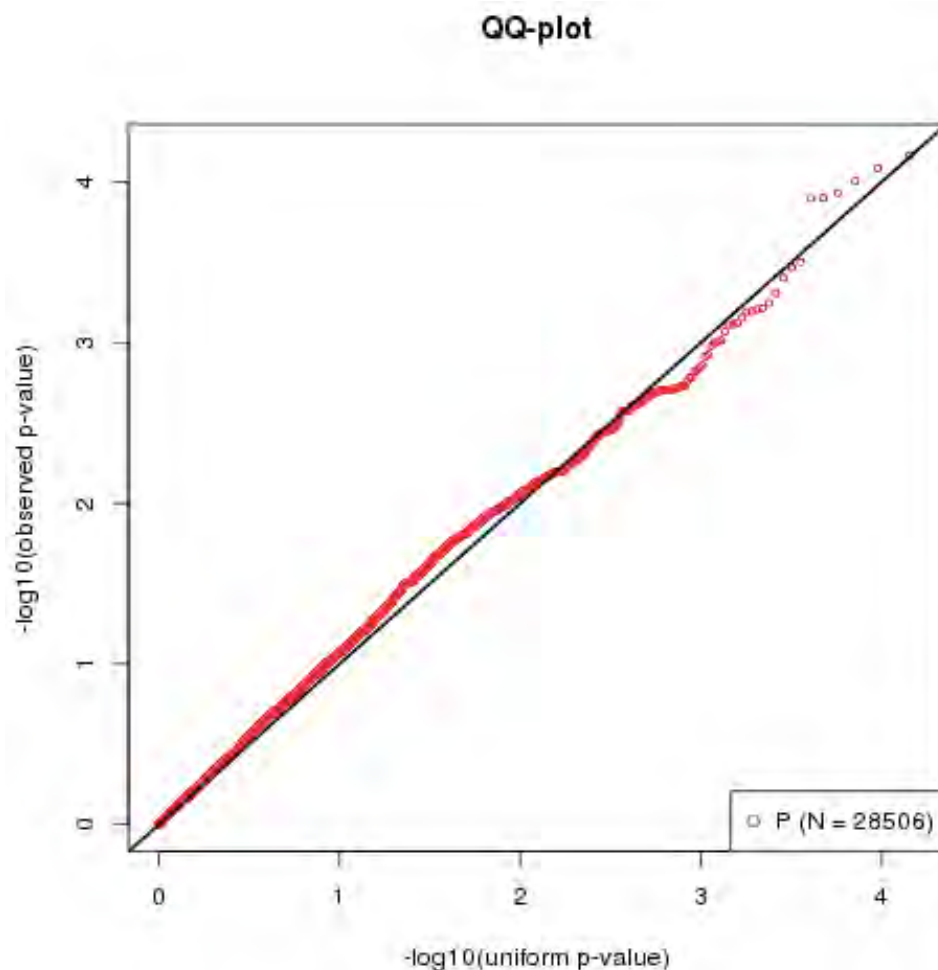
Supplementary Figure 6: Q-Q plot for ECG-associated SNPs

The analysis of 54 independent SNPs previously associated with ECG traits (after exclusion of the haplotype including rs10428132) results in a significant enrichment in association signals ($P=5.0 \times 10^{-8}$). Note that, when all SNPs from the SCN5A/SCN10A locus were removed, a large decrease in statistical significance ($P=0.0011$) was observed. The horizontal axis shows ($-\log_{10}$ transformed) expected P values, the vertical axis ($-\log_{10}$ transformed) observed p values. The straight line indicates expected results under the null hypothesis.



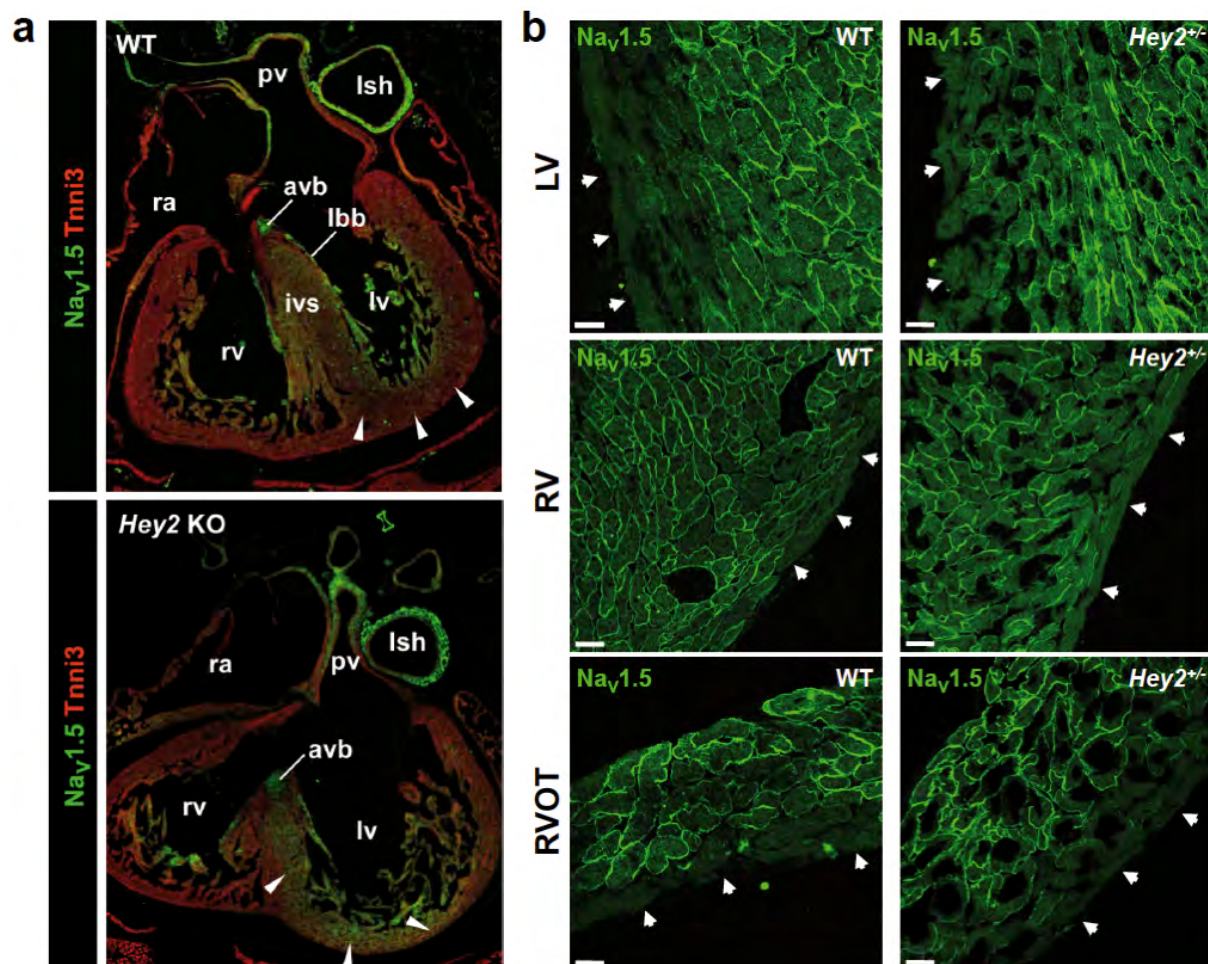
Supplementary Figure 7: Q-Q plot for SNPs located at loci harboring susceptibility genes for Brugada syndrome

The horizontal axis shows ($-\log_{10}$ transformed) expected p values while the vertical axis indicates ($-\log_{10}$ transformed) observed p values. Straight line indicates expected results under the null hypothesis.



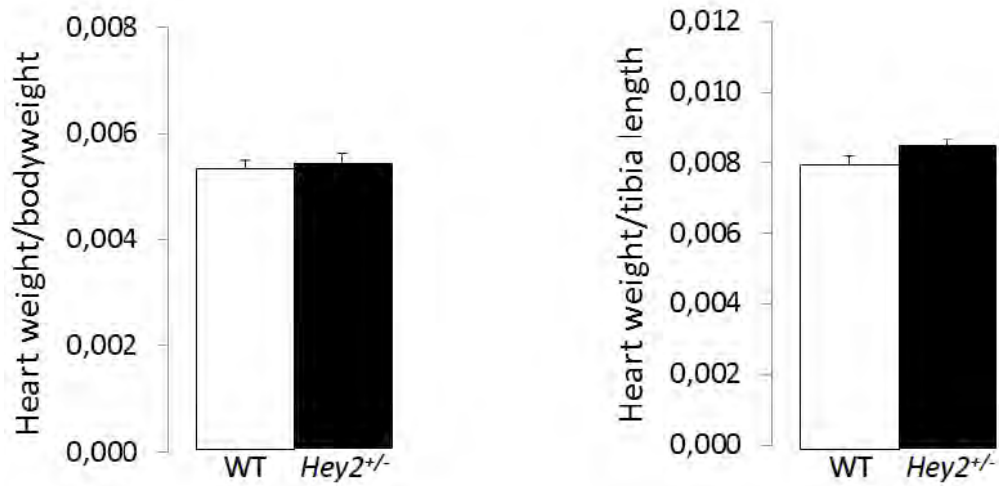
Supplementary Figure 8: $\text{Na}_v1.5$ patterning across the ventricular wall in *Hey2* knockout embryos and adult *Hey2*^{+/-} hearts

(a) Immunohistochemical staining displaying expanded expression of $\text{Na}_v1.5$ in the compact zone of the ventricular myocardium (white arrowheads) in embryonic hearts (ED16.5) of *Hey2* knockout mice. Tnni3 (troponin I) is used as cardiomyocyte marker. Note the thinner (hypoplastic) left and right ventricular compact walls and the smaller and deformed right ventricle in knockout mice. La, left atrium; ra, right atrium; ivs, inter-ventricular septum; lv, left ventricle; rv, right ventricle; lbb, left bundle branch; avb, atrioventricular bundle; pv, pulmonary vein; lsh, left sinus horn. (b) Immunohistochemical staining of $\text{Na}_v1.5$ in left ventricle (LV), right ventricle (RV) and right ventricular outflow tract (RVOT) regions of adult wild-type (WT) and *Hey2*^{+/-} hearts. No differences in $\text{Na}_v1.5$ distribution across the myocardial wall were detected between adult WT and *Hey2*^{+/-} hearts (sub-epicardial layers are indicated by white arrowheads; scale bar: 25 μm).



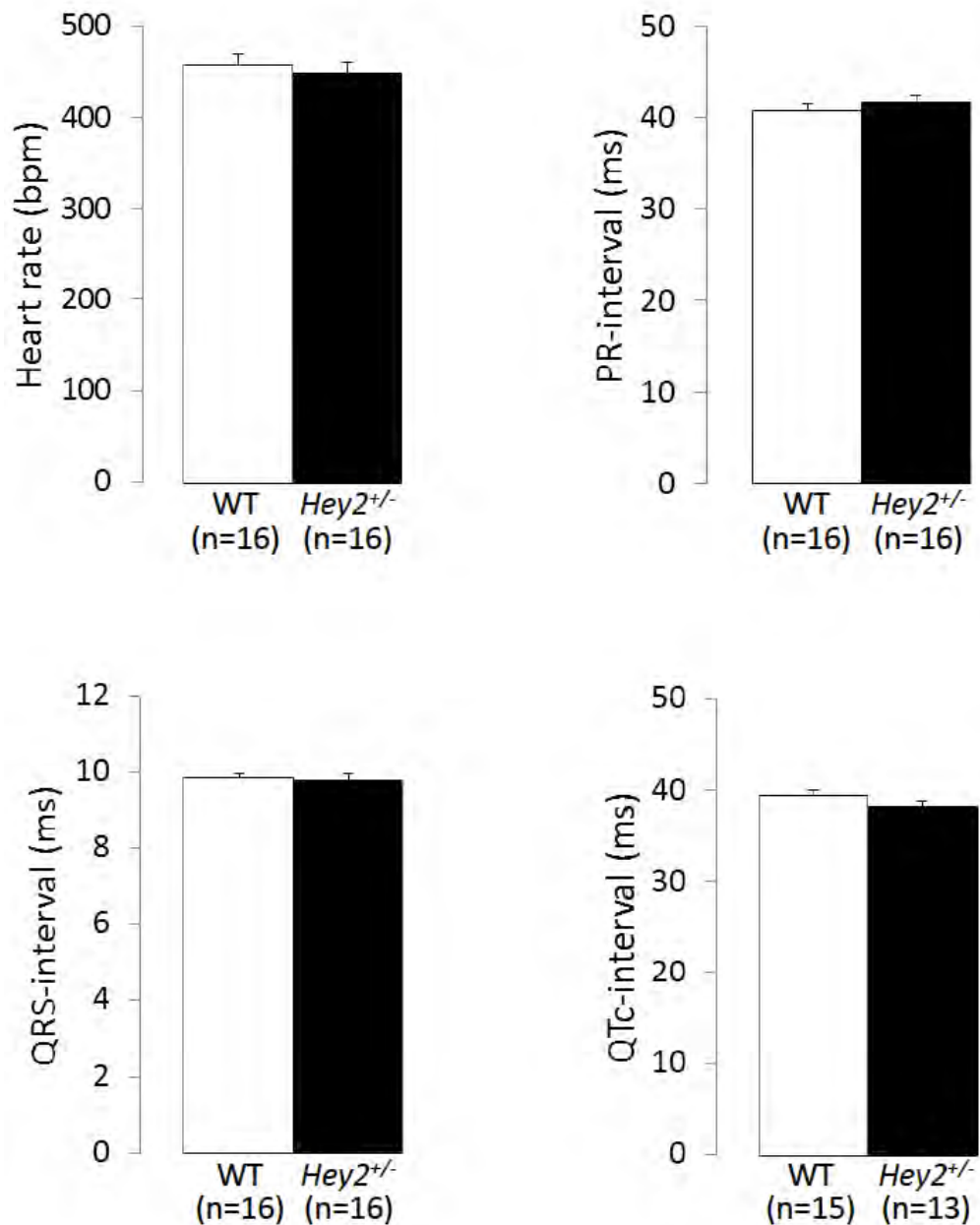
Supplementary Figure 9: Heart weight in adult WT and *Hey2*^{+/-} mice.

Heart weight to body weight ratios (left) and heart weight to tibia length ratios (right) were similar in adult wild-type (WT, n=8) and *Hey2*^{+/-} (n=8) mice.



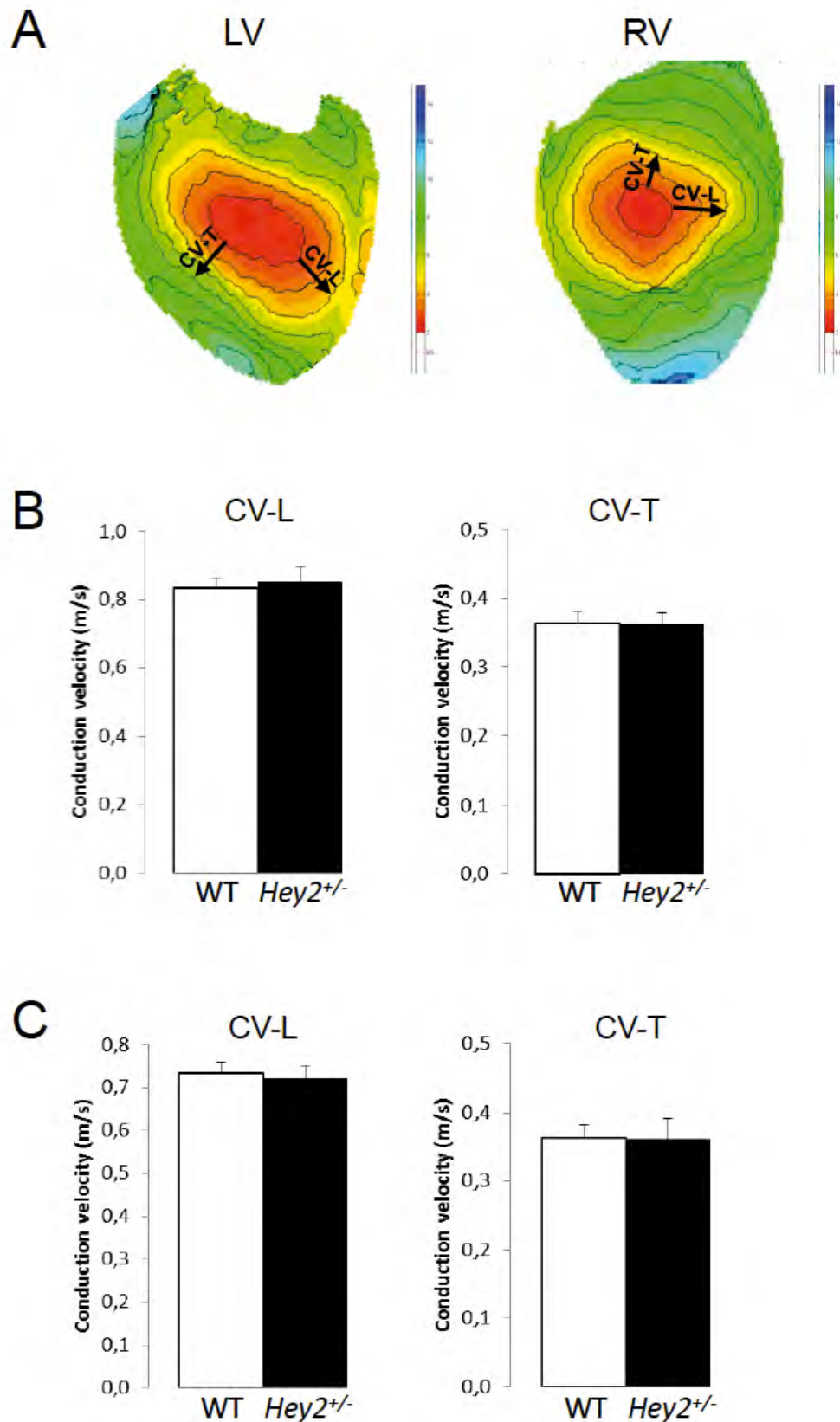
Supplementary Figure 10: ECG data in adult WT and *Hey2*^{+/-} mice.

Surface ECG parameters measured from anaesthetized (isoflurane) adult wild-type (WT) and *Hey2*^{+/-} mice. No significant differences in heart rate or PR-, QRS-, and QTc-intervals were observed between WT and *Hey2*^{+/-} mice.



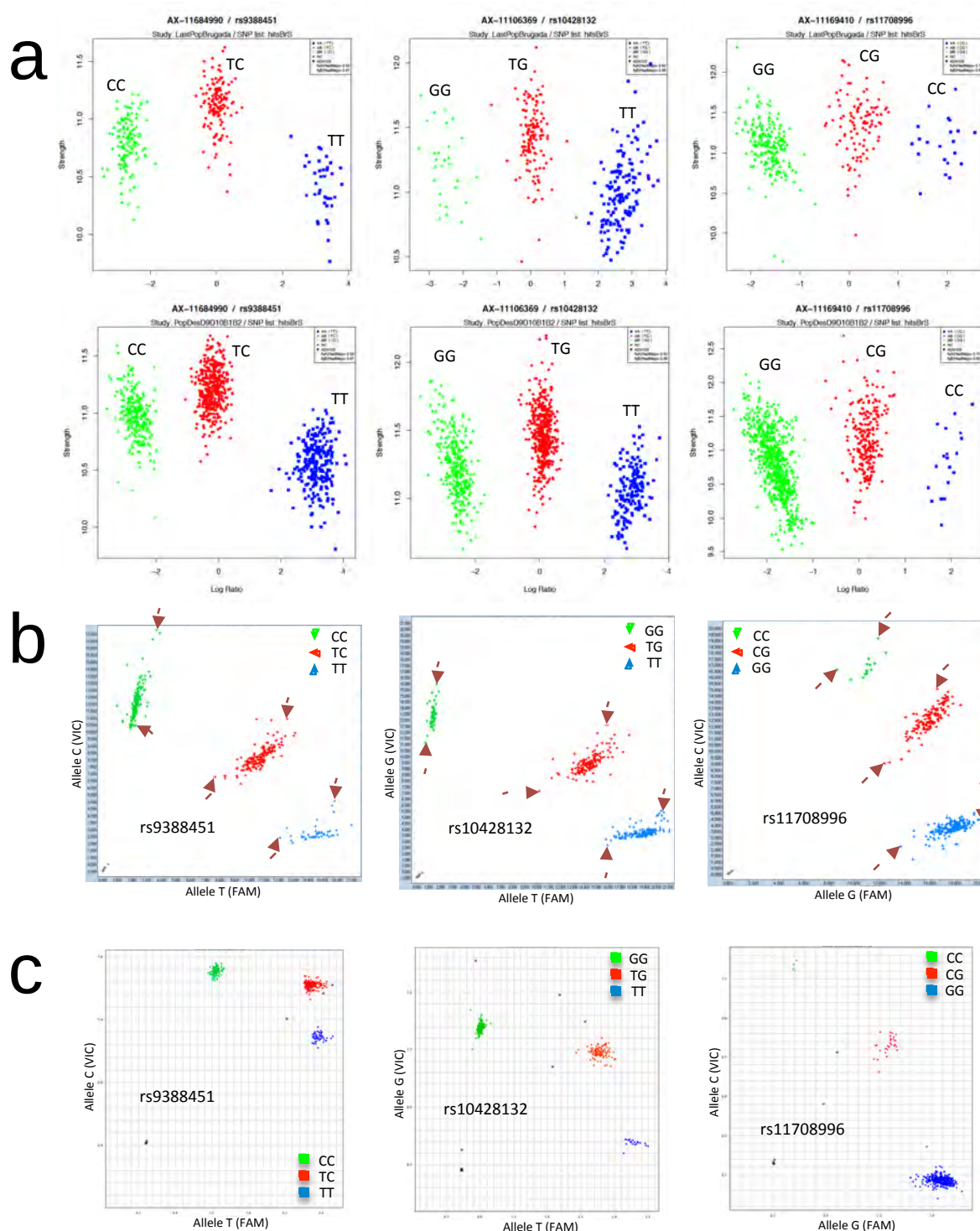
Supplementary Figure 11: RV and LV conduction velocities in WT and *Hey2*^{+/-} hearts.

(a) Representative optical activation maps measured in right (RV) and left ventricle (LV) of isolated adult hearts. Hearts were stimulated at a basic cycle length of 120 ms, and longitudinal (CV-L) and transversal conduction velocities (CV-T) were measured as indicated. (b) Average longitudinal (CV-L) and transversal conduction velocities (CV-T) in LV and (c) RV were similar in WT and *Hey2*^{+/-} hearts.



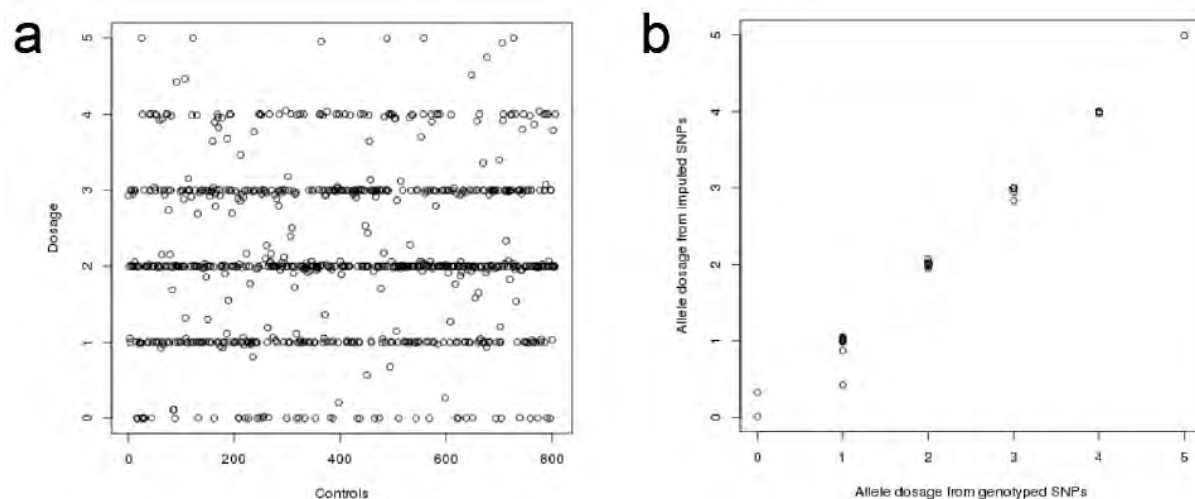
Supplementary Figure 12: Genotyping plots for the three SNPs associated with Brugada syndrome

(a) Cluster plots of the SNPs rs9388451, rs10428132 and rs11708996 genotyped on Affymetrix Axiom CEU-1 arrays for cases (top-panel) and controls (bottom-panel). Blue squares, red circles and green triangles indicated AA, AB and BB genotypes, respectively; “x” symbols indicate missing genotype calls. **(b)** Scatter plot analysis of TaqMan® Endpoint genotyping assay using a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Mannheim, Germany). **(c)** Scatter plot analysis of TaqMan® Endpoint genotyping assay using the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The X-axis reports the FAM-fluorescence intensity; the Y-axis the VIC-fluorescence intensity. Green/blue triangles indicate homozygote genotypes; red triangles heterozygote samples; grey circles or “x” symbols missing genotype calls. Arrows indicate the samples for which genotypes were validated by capillary sequencing.



Supplementary Figure 13: Quality control of imputed risk allele dosages

(a) Distribution of imputed risk allele dosages for the control population (n=806) used in the European replication set. (b) Comparison of the genetic scores obtained with imputed *versus* typed SNPs for 49 individuals.



III. Identification de cas familiaux du syndrome de repolarisation précoce (article 4)

Identification of large families in early repolarization syndrome.

(J Am Coll Cardiol. 2013 Jan 15;61(2):164-72.)

Identification of Large Families in Early Repolarization Syndrome

Jean-Baptiste Gourraud, MD,*†‡§ Solena Le Scouarnec, PhD,*†‡ Frederic Sacher, MD,||
Stéphanie Chatel, PhD,*†‡§ Nicolas Derval, MD,|| Vincent Portero, MS,*†‡
Pascal Chavernac, MD,# Juan E. Sandoval, PhD,*†‡ Philippe Mabo, MD, PhD,¶
Richard Redon, PhD,*†‡§ Jean-Jacques Schott, PhD,*†‡§ Hervé Le Marec, MD, PhD,*†‡§
Michel Haïssaguerre, MD, PhD,|| Vincent Probst, MD, PhD*†‡§
Nantes, Bordeaux, Rennes, and Castres, France

Objectives

The aim of this study was to identify families affected by early repolarization syndrome (ERS) and to determine the mode of transmission of the disease.

Background

Early repolarization (ER) has recently been linked to idiopathic ventricular fibrillation. Familial inheritance of the disease has been suggested but not demonstrated.

Methods

We screened relatives of 4 families affected by ERS. ER was defined as a distinct J-wave in at least 2 consecutive leads and a 1-mm amplitude above baseline. The Valsalva maneuver was performed in affected and unaffected family members to decrease heart rate and thus increase or reveal an ER pattern.

Results

Twenty-two sudden cardiac deaths occurred in the 4 families including 10 before 35 years of age. In the 4 families, the prevalence of ER was 56%, 34%, 61%, and 33% of, respectively, 30, 82, 29, and 30 screened relatives. In these families, transmission of an ER pattern is compatible with an autosomal dominant mode of inheritance. All probands were screened for genes identified in ERS, and no mutation was found. The Valsalva maneuver was performed in 80 relatives, resulting in increased J-wave amplitude for 17 of 20 affected patients and revealing an ER pattern in 17 relatives in whom 5 are obligate transmitters of an ER pattern.

Conclusions

ERS can be inherited through autosomal dominant transmission and should be considered a real inherited arrhythmia syndrome. Familial investigation can be facilitated by using the Valsalva maneuver to reveal the electrocardiographic pattern in family members. The prognosis value of this test remains to be assessed. (J Am Coll Cardiol 2013;61:164–72) © 2013 by the American College of Cardiology Foundation

Over the past 70 years, early repolarization (ER) has been considered a benign electrocardiographic finding affecting more predominantly asymptomatic young and healthy men (1–3). The high prevalence of this pattern in the general population (1% to 5.8%) was considered the best argument to reinforce the benign nature of this electrocardiographic pattern (1,3–6). However, new evidence has recently highlighted the importance of this abnormality, defined as a

positive deflection on the S-wave in at least 2 consecutive inferior or lateral leads and at least 1-mm amplitude above baseline, with identification of this electrocardiographic pattern in 31% of patients presenting with idiopathic ventricular fibrillation (7). Recent studies also found a higher risk of sudden cardiac death (SCD) in the general population in ER pattern carriers (8,9). The high prevalence of ER in the general population contrasts with a relatively low risk of SCD, requiring further investigation to understand the pathogenic consequences of ER and risk stratification for various types of the malignant forms (10).

See page 173

From *INSERM, UMR1087, L'Institut du Thorax, Nantes, France; †CNRS, UMR 6291, Nantes, France; ‡Université de Nantes, Nantes, France; §CHU de Nantes, L'Institut du Thorax, Nantes, France; ||Service de Cardiologie, Hôpital Cardiologique du Haut Lévéque, Bordeaux, France; ¶Département de Cardiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Rennes, France; and the #Service de Cardiologie, Centre Hospitalier de Castres Mazamet, Castres, France. This work was supported by special grants from the Direction Générale de l'Offre de Soins (PHRC no. 20-12, Dr. Probst). All authors have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

Manuscript received March 29, 2012; revised manuscript received August 6, 2012, accepted September 22, 2012.

In 2008, our group identified the first mutation associated with ER syndrome (ERS) in a sporadic case, located on the *KCNJ8* gene (11), suggesting genetic factors in ERS occurrence. The same mutation was found in another patient by

Medeiros-Domingo et al. (12), who showed that this amino acid change could lead to a gain of function of K_{ATP} channel. Genes encoding calcium channels also appear to be involved in a few unrelated ERS cases (13). However, to our knowledge, no familial cases have been previously described. The mode of transmission and genetic basis of this syndrome remain essentially unknown.

A major limitation in diagnosis is the high variability of the ER pattern over time, partly due to variation in autonomic tone and heart rate (14–17). For other arrhythmias such as Brugada syndrome and long QT syndrome, pharmacological challenges have proved their efficiency in unmasking the pattern. Because ER is modulated by vagal tone, we tested the ability of the Valsalva maneuver (VM) to reveal an ER pattern.

The aim of the study was to recruit large families affected by a malignant form of ERS and to evaluate the efficiency of the VM to unmask ER.

Methods

Probands were included in the study after experiencing SCD associated with an ER pattern in French university hospitals (Bordeaux, Nantes, and Rennes), from a database of 148 symptomatic cases. This study was conducted according to French guidelines for clinical and genetic research. Informed written consent was obtained from each family member who agreed to participate in the clinical and genetic study.

Clinical investigation. The ER pattern was the only cardiac abnormality in at least 1 case of SCD in each family. Coronary artery disease, nonischemic cardiomyopathy, and other known inherited cardiac arrhythmias were excluded (echocardiography, exercise test, coronary angiography, Na blocker test) in family A, B, and C probands according to the guidelines for management of ventricular arrhythmia (18).

Familial investigation included a review of medical history and a complete physical examination. A 12-lead electrocardiogram (ECG) was obtained for family member at rest and, when possible, during a VM. The VM was performed by closing one's mouth and pinching one's nose shut to obtain forceful attempted expiration against a closed airway. We performed continuous 12-lead rhythm strips during the VM and measured the J-wave amplitude when heart rate was the lowest.

Blinded interpretation of electrocardiographic data was done by 2 physicians for each patient. Heart rate, PR interval, QRS axis, J-point amplitude, QT interval, and QT interval corrected for heart rate (Bazett's formula) were measured at rest and during the VM.

Patients were considered to be affected by ER in the presence of a distinct J-wave defined as a positive deflection on the S-wave in at least 2 consecutive inferior or lateral leads and with at least 1-mm amplitude above baseline (7). ST-segments after ER were classified as horizontal/descending or rapidly ascending/upsloning (19).

The phenotype was classified as major (J-wave amplitude >2 mm), minor (J-wave amplitude between 1 and 2 mm), probably unaffected (J-wave amplitude <1 mm, or J-wave observed in only 1 lead), and unaffected (normal ECG). The VM was considered positive for affected patients when J-wave increased by >0.5 mm in 2 consecutive leads or when a significant J-wave as previously described appeared in a new territory. Appearance of a significant J-wave as previously described (>1 mm) defined a positive test for unaffected patients.

Cases of unexplained SCD without any available ECG were included in the estimation of ER prevalence if an ER pattern was found in first-degree relatives.

Penetrance of ER within the families was evaluated by the frequency of an ER pattern in obligate transmitters defined as family members with descendants affected by ER or SCD.

Genetic investigation. Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using a Macherey-Nagel kit according to manufacturer recommendations. Genes implicated in ERS were excluded for each proband by DNA sequencing.

Statistical analysis. Continuous variables were reported as mean $\pm$ SD or median (lower quartile, upper quartile), as appropriate. A comparison between families and patients was performed with 1-way analysis of variance, the Kruskal-Wallis test, Student *t* test, or chi-square test, as appropriate. A comparison between heart rate before and after a VM was performed with a paired Student *t* test as appropriate. All tests were 2 tailed, and a *p* value <0.05 was considered as statistically significant.

Results

We identified 4 large French families in which SCD occurred in, respectively, 11, 4, 4, and 3 young adults.

Identification and description of the families. Family A (Fig. 1A) was recruited after examination of the ECG of a 45-year-old woman (V:15) who died during an electrical storm due to ERS even though she had an implantable cardioverter-defibrillator (Figs. 2A, 3A, and 4A).

Familial screening identified a large family of 72 members. Eleven SCDs occurred (5 during the day, 4 at night, and 2 undetermined) including 7 before 35 years of age. The mean age at SCD was 41 years (range, 20 to 72 years), occurring more frequently in males (sex ratio = 1.7) (Table 1). Four individuals had normal cardiac investigation findings and negative toxicological test results. The autopsy was negative for 3 individuals (V:3, V:9, V:22). No cardiac information or ECG was available for the 3 others.

Abbreviations and Acronyms

ECG	= electrocardiogram
ER	= early repolarization
ERS	= early repolarization syndrome
SCD	= sudden cardiac death
VM	= Valsalva maneuver

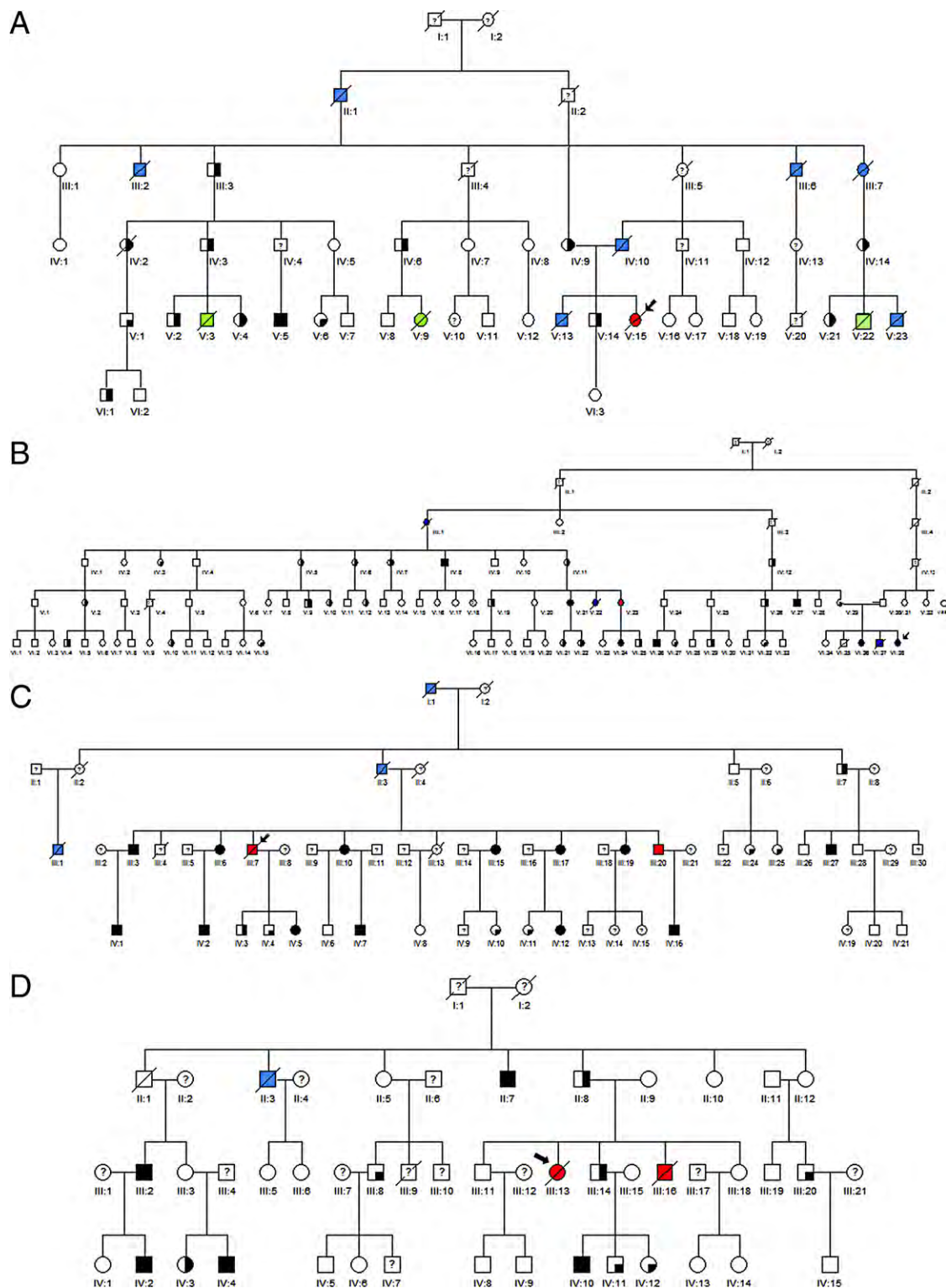


Figure 1 Familial Segregation of ER in 4 Families

(A) Pedigree of family A (1 early repolarization syndrome [ERS], 3 negative autopsies, 7 unexplained sudden deaths, 12 other early repolarization [ER] patterns). (B) Pedigree of family B (1 ERS, 3 unexplained sudden deaths, 25 other ER patterns). (C) Pedigree of family C (2 ERS, 3 unexplained sudden deaths, 15 other ER patterns). (D) Pedigree of family D (2 ERS, 1 unexplained sudden death, 8 other ER patterns). ERS: ER pattern + arrhythmia; unexplained sudden death: no available autopsy or antemortem clinical examination; probably a normal electrocardiogram; ER in only 1 lead or with amplitude <1 mm above baseline.

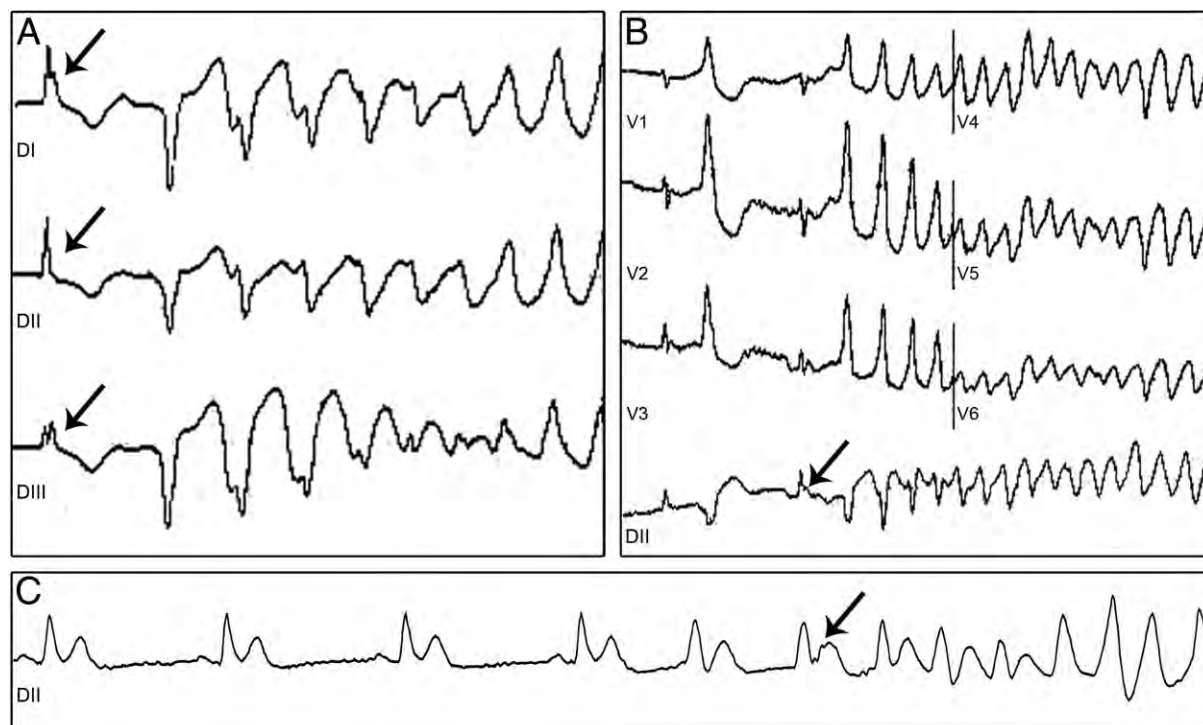


Figure 2 Mode of Onset of Ventricular Fibrillation in the Probands

The first (A), second (B), and fourth (C) families. Note that the J-wave increases before ventricular fibrillation in B and C (arrows).

ECGs were available for 30 members and revealed a major ER pattern in 2 patients and a minor form of ER in 11 (Figs. 1A, 3A, and 3B, Table 1).

Family B was identified after the individual VI:37 died without previous symptoms at 17 years of age (Fig. 1B). No ECGs were available, but 2 asymptomatic sisters presented a major ER pattern with no other cardiac abnormalities (Figs. 3C and 4B).

In this family, 4 SCDs occurred. The mean age at SCD was 39 years (range, 17 to 56 years), with a predominance of SCD in females (sex ratio = 0.3) (Table 1). No cardiac information or ECG was available for 3 of these individuals. Individual V:23 experienced an electrical storm aborted by isoprenaline. The ECG showed a typical ER pattern (Figs. 2B and 3D).

Familial screening identified a large family with 119 members including 82 with an available ECG. Eight individuals presented a major ER pattern and 17 a minor one (Figs. 1B, 3C, and 3D).

Family C was identified when individual III:7 experienced an aborted SCD associated with a major ER pattern on the ECG (Figs. 1C and 3E). Findings on cardiac testing were normal, and toxicological test results were negative. He finally died during an electrical storm 2 years after he received an implantable cardioverter-defibrillator.

Familial screening identified 61 patients spanning 4 generations. In this family, 3 SCDs occurred at a mean age of 49

years (range, 45 to 52 years), but no ECGs were available. The SCDs occurred exclusively in males (Table 1).

Individual III-20 experienced 2 unexplained syncope episodes with no other cardiac abnormality than an ER pattern. He finally received an implantable cardioverter-defibrillator after asymptomatic monomorphic ventricular tachycardia was identified by an implantable loop recorder.

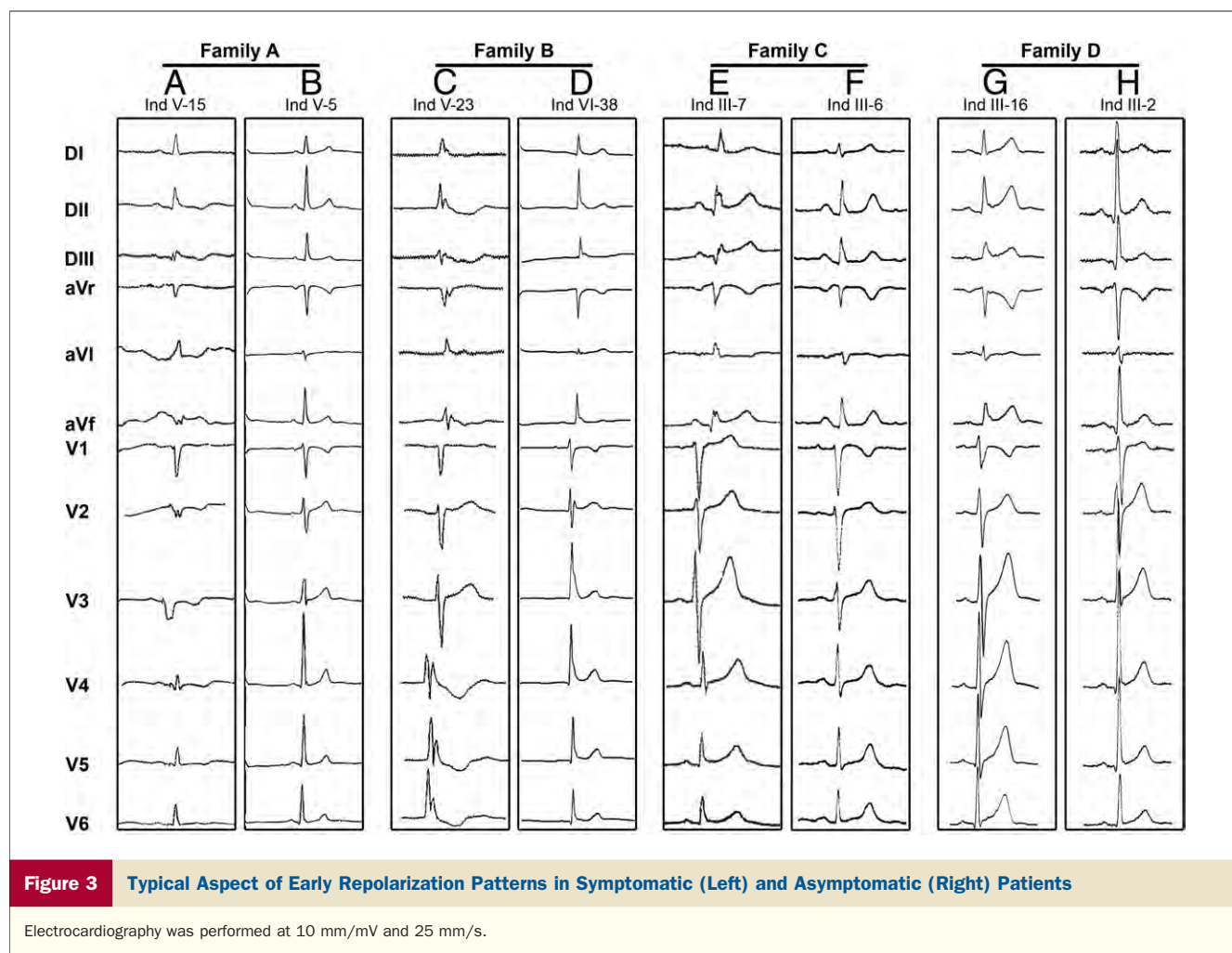
ECGs were available for 29 individuals and revealed a major ER pattern in 14 and a minor pattern in 3 (Figs. 1C, 3E, 3F, and 4C).

Family D was identified after individual III:13 died during an electrical storm with no cardiac abnormality except a major ER pattern (Figs. 1D and 2C). Her brother died 2 years earlier during ventricular fibrillation. He presented a major ER pattern in inferolateral leads (Figs. 3G and 4D).

Familial screening identified a large family of 50 members. In this family, 3 SCDs occurred (2 related to ERS). The mean age at SCD was 40 years (range, 26 to 55 years) with a predominance of SCDs in males (sex ratio = 2) (Table 1).

ECGs were available in 30 relatives and revealed a major ER pattern in 5 other patients and a minor pattern in 3 (Figs. 1D, 3G, and 3H).

Global analysis of families. No statistical differences were found between heart rate, PR interval, QRS duration, and QT interval in the different families. We found a statistical



difference between affected and unaffected patients in age, heart rate, and QRS duration (Table 2).

Localization of ER was mostly inferior, with a predominance of notching and a horizontal/descending ST-segment in the families (Table 1). All patients with ERS, except for individual III-16 in the family D, presented a notched ER with a horizontal/descending ST-segment.

In these 4 families, the ER pattern is probably transmitted by an autosomal dominant mode of inheritance because we found ER in males and females and a father-to-son transmission of ER pattern in each family. Penetrance of the ER pattern was, respectively, 90%, 33%, 90%, and 60% in families.

Within the family, most of the unexplained SCDs occurred in the presence of ERS or an ER pattern in first-degree relatives (Table 1).

Analysis of a VM. We performed a VM in 80 members of families B and C. This maneuver increased ER amplitude in 17 of 20 baseline affected patients tested. It revealed an ER pattern in 17 of 60 individuals previously considered unaffected. The VM succeeded in unmasking the pattern for 5 of 11 obligate transmitters previously considered unaffected. Using this test, penetrance of the ER pattern increases from

33% to 60% in family B and from 90% to 100% in family C. Finally, the VM made it possible to reclassify 45% (5/11) of obligate transmitters first considered with a baseline ECG as unaffected as ER cases (Table 3, Fig. 5).

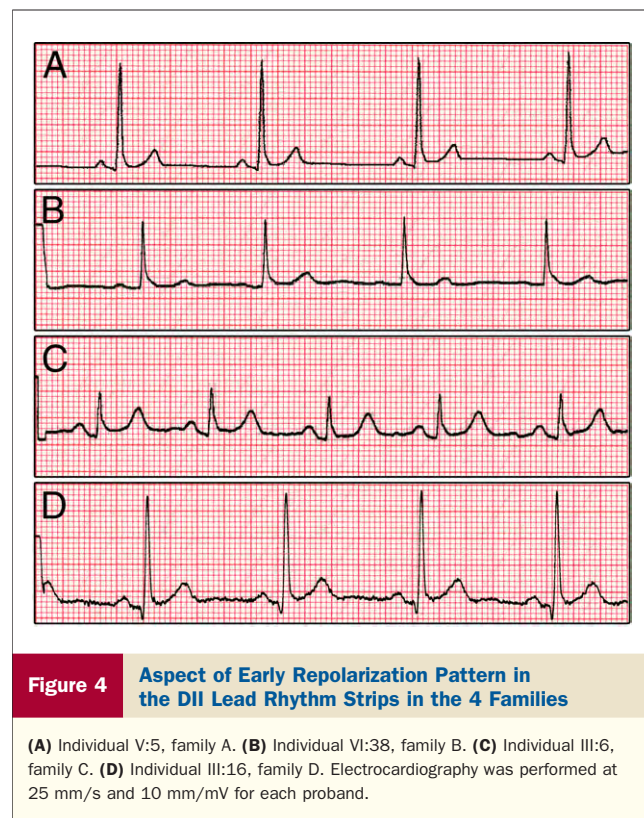
The mean heart rate was 75 ± 13 beats/min (median, 75 beats/min [range, 65 to 80 beats/min]) at rest and was not different between patients with a positive (VM+) or negative (VM-) outcome ($p = 0.141$). Heart rate decreased by 3.87 ± 7.93 beats/min during the test ($p < 0.001$), but no difference was observed between the VM+ and VM- groups ($p = 0.304$).

After performing the VM in families B and C, an ER pattern was found in, respectively, 56%, 34%, 58%, and 33% of relatives in each family (Table 1).

Genetic analysis. Mutations in *KCNJ8*, *SCN5A*, *CACNA1C*, *CACNB2*, and *CACNA2D1*, were excluded by DNA sequencing in the probands of each family.

Discussion

Starting with a database of 148 ER cases, this study allowed the identification of 4 large families affected by a malignant form of ERS. Our familial studies demonstrated for the first



time that an ER pattern can be inherited with an autosomal dominant mode of transmission. Since the description of ER as a potential factor for the occurrence of SCD by our group in 2008, the involvement of this electrocardiographic pattern in the occurrence of SCD remains a matter of

Table 2 Clinical and Electrocardiographic Data of Affected (ER+) and Unaffected (ER–) Patients in 4 Families

	ER+ (n = 64)	ER– (n = 112)	p Value
Age, yrs	44 (25–63)	33 (16–48)	0.002
Sex ratio	1.18	0.85	0.307
Heart rate, beats/min	70 (60–80)	77 (68–86)	0.001
PR, ms	165 (40–180)	155 (140–170)	0.202
QRS interval, ms	88 (80–97)	80 (78–90)	0.001
QT interval corrected for heart rate, ms	407 ± 19	410 ± 24	0.314

Values are median (lower quartile–upper quartile) or mean ± SD.

ER = early repolarization.

debate owing to the frequency of this pattern in the general population (20,21). Tikkanen et al. (8) and Sinner et al. (9) demonstrated in 2 distinct populations that an ER pattern is associated with an increased risk of SCD (respective relative risks: 1.28 and 1.96; 95% confidence interval: 0.04 to 1.59 and 1.05 to 3.68; $p < 0.05$). The present demonstration of a high occurrence of SCD in multigenerational families presenting a far higher prevalence of ER pattern than in the general population adds strong evidence that these patients may face an increased risk of SCD due to ER, emphasizing that ERS should be considered a potentially inherited arrhythmia syndrome along with Brugada or long QT syndrome. Similar results on J-point elevation prevalence were recently reported by published by Nunn et al. (22) and Noseworthy et al. (23) among relatives of sudden arrhythmic death syndrome probands and among relatives of ER pattern probands. Even if we have no definitive proof that an ER pattern is responsible for SCD occurring in these

Table 1 Clinical Characteristics of Families: History of SCD, Clinical Data, and Characteristics of ER

	Family				p Value
	A	B	C	D	
Sudden death	11	4	4	3	—
ERS	1	1	1	2	—
SCD with negative autopsy	3	0	0	0	—
Unexplained sudden death	7	3	3	1	—
With ER pattern in relatives	3	3	3	1	—
Mean age, yrs (range)	41 (20–72)	39 (17–56)	49 (45–52)	40 (26–55)	—
Sex ratio	1.7	0.3	∞ (100% male)	2	—
No. of screened relatives	30	82	29	30	—
No. of relatives with an ER pattern	12	25	16	8	—
Early repolarization pattern					
Prevalence of ER pattern (in probands and relatives), %	56	34	58	33	—
Mean amplitude, mm	1.61 ± 0.654	1.50 ± 0.452	1.93 ± 0.805	2.0 ± 0.79	0.385
Localization, %					
Inferior	61	61	76	92	0.146
Lateral	22	32	33	25	0.773
Inferolateral	33	37	44	58	0.300
Notching repolarization, %	78	88	92	89	0.668
Horizontal/descending ST segment, %	78	68	67	72	0.888

Values are n, median (lower quartile–upper quartile), or mean ± SD. Distinction has been established in unexplained SCD, which was considered related with ER when ERS occurred in descendant or an ER pattern was found in first-degree relatives.

ER = early repolarization; ERS = early repolarization syndrome; SCD = sudden cardiac death.

Table 3 VM in Affected and Unaffected Patients at Rest

	No. of Screened Relatives	No. of VM+	No. of VM–	Positive VM, %
Affected	20	17	3	85
Unaffected	60	17	43	28
Nonobligate transmitter	49	12	37	24
Obligate transmitter	11	5	6	45
Total	80	34	46	42

The VM was considered positive (VM+) through an increasing J-wave (affected patients) or when the J-wave was unmasking during the test (unaffected patients). Obligate transmitters were defined as family members with descendants affected by early repolarization or sudden cardiac death.

VM = Valsalva maneuver.

families, we have several lines of evidence to consider that the ER pattern is the cause of SCD. In 3 families (families A, B, and D), 1 patient with recorded ventricular fibrillation also displays a major ER pattern increasing before arrhythmia. In all patients who experienced SCD, at least 1 first-degree relative is clearly a carrier of a major ER pattern, and all parents (except 1) of symptomatic individuals present an ER pattern on an ECG. Patient V:29 (family B) is probably unaffected with an ER pattern, but she is the mother of VI:37 who died suddenly at 17 years of age. We have a major argument to consider that SCD is related to ER because the 2 young sisters of the patient showed canonical ER aspect. Moreover, no other cardiac abnormalities have been found in affected family members, although a complete cardiac examination was performed, and autopsies were negative for 3 patients who experienced SCD.

The identification of large families also provides a unique opportunity to allow insight into the genetic basis of the disease and probably, in a second step, to better characterize

this particular electrocardiographic pattern, which would make it possible to identify the truly malignant form of ER in the general population.

The ER pattern is transmitted by an autosomal dominant trait in the 4 families. Genetic studies have already demonstrated a strong genetic component for other inherited cardiac arrhythmias such as congenital long QT syndrome, short QT syndrome, and or Brugada syndrome. Most of the mutations described affect genes encoding ion channels, with an autosomal dominant trait that results in a 50% risk of transmission through Mendelian inheritance. In the 4 families described here for the first time, penetrance seems to be incomplete with an autosomal dominant model, particularly in the second family, despite the use of the VM to unmask the pattern.

The second important finding of this study is the identification of the VM as an interesting tool to unmask an ER pattern on an ECG. In this study, the VM unmasked an ER pattern in 17 patients, including 5 obligate transmitters of ER. Similar to other genetic arrhythmias, the ER pattern is highly variable over time, partly because of the variation of autonomic tone and heart rate (14–17). Indeed, ER has been shown to increase at a lower rate and during a higher vagal tone (10,24,25). This variability of the electrocardiographic pattern over time has led to widespread use of unmasking tests such as an ajmaline or flecainide challenge for Brugada syndrome or adrenaline challenge or stress test for long QT syndrome. These tests have proved their efficacy in unmasking abnormal electrocardiographic patterns in the context of familial screening or in the case of a borderline ECG. Until now, no reliable test could reveal the ER pattern. In the present study, we demonstrated that the

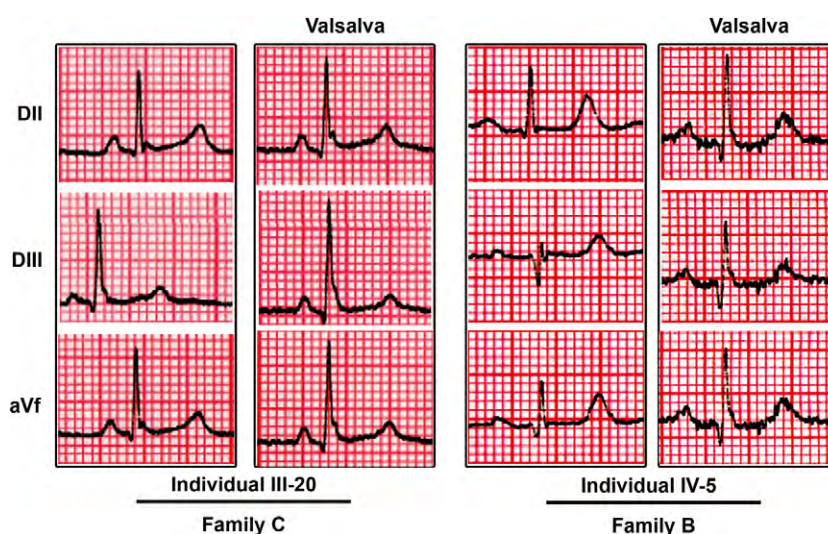


Figure 5 Effect of the Valsalva Maneuver in the ER Patterns of 2 Obligate Transmitters of Families B and C (Electrocardiography Performed at 25 mm/s and 10 mm/mV)

(A) Electrogram (ECG) of individual III:20 (family C) first performed at rest with an inferior early repolarization (ER) increased during the Valsalva maneuver.
(B) ECG of individual IV:5 (family B) without ER at rest. The Valsalva maneuver unmasks an inferior pattern.

VM is helpful in unmasking the syndrome in the context of familial screening. However, it should be noted that a negative VM result is not enough to rule out the diagnosis because the sensitivity of the test is only 45% in our study. Further investigations are required to estimate the ability of this test to differentiate the malignant and benign forms of the ER pattern in the general population and to estimate the prognostic value of this test in arrhythmic status of relatives.

In the 4 families, the affected patients appeared to present a significantly longer PR and QRS duration. This observation does not underlie conduction disease in the ER pattern because in the families, the affected patients are older and because ER can lead to an overestimation of QRS duration through the J-wave length. Heart rates tend to be lower in affected patients, but, as previously shown, autonomic tone decreases heart rate, increasing the chances of observing an ER pattern (14–16). The proportion of ER pattern fluctuating between 34% and 61% among families is a far higher prevalence than in the general population in which previous studies have reported 1% to 5.8% of ER (1,3–9,26–28). This higher prevalence confirms the genetic foundations of ERS suggested by previous identification of a heterozygous mutation in unrelated cases reported and by population-based studies (11–13,29). Identification of the familial forms of malignant ER moves us to recommend systematic familial screening of first-degree relatives in ERS.

The ER pattern is sometimes found in association with other pathologies such as Wolff-Parkinson-White, short QT syndrome, and Brugada syndrome (30–32). Some similarities were observed between ERS and Brugada syndrome, including sex and arrhythmia triggers. However, no other pathologies and, more specifically, no Brugada syndrome were found during the familial screening, suggesting a differential mechanism between ER in the inferolateral leads and ST-segment elevation in the right precordial leads (33).

Study limitations. The main limitation of the study is the limited capacity to detect the ER, which can lead to underestimation of the prevalence of ER in families, although the VM can be used to unmask the ER pattern in asymptomatic individuals. The prognostic value of this test remains to be assessed using a control population, but we can already suppose that with the use of the VM, some familial segregation of ERS could be revealed and some idiopathic ventricular fibrillation cases could be reclassified as ERS cases. Another issue is the difficulty in applying measurement and characterization of J-wave amplitude to clinical practice, especially because differences of <1 mm have been shown to modify the risk of SCD (14–16).

Conclusions

ERS is an inherited arrhythmia that is, at least in some families, compatible with an autosomal dominant trait. Familial screening should be performed, at least in first-degree relatives, for each proband. Because the VM can unmask the ER pattern, it should be used to reveal inherited

malignant forms. The prognostic value of this test remains to be assessed in relatives and the general population. Identification of these first large families is the first step toward understanding the genetic basis of the malignant familial forms of ER.

Acknowledgments

The authors thank Christine Fruchet, Annabelle Rajalu, and Patricia Bouillet for their assistance in familial screening. They also thank these families for participation.

Reprint requests and correspondence: Dr. Jean-Baptiste Gourraud, Clinique Cardiologique, L'Institut du Thorax, CHU de Nantes, Hôpital Laennec, Bd Jacques Monod, 44093 Nantes Cedex, France. E-mail: jbgourraud@gmail.com.

REFERENCES

1. Gussak I, Antzelevitch C. Early repolarization syndrome: clinical characteristics and possible cellular and ionic mechanisms. *J Electrocardiol* 2000;33:299–309.
2. Mehta M, Jain AC, Mehta A. Early repolarization. *Clin Cardiol* 1999;22:59–65.
3. Kambara H, Phillips J. Long-term evaluation of early repolarization syndrome (normal variant RS-T segment elevation). *Am J Cardiol* 1976;38:157–6.
4. Wasserburger RH, Alt WJ. The normal RS-T segment elevation variant. *Am J Cardiol* 1961;8:184–92.
5. Yan G-X, Lankipalli RS, Burke JF, Musco S, Kowey PR. Ventricular repolarization components on the electrocardiogram: cellular basis and clinical significance. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:401–9.
6. Mehta MC, Jain AC. Early repolarization on scalar electrocardiogram. *Am J Med Sci* 1995;309:305–11.
7. Haïssaguerre M, Derval N, Sacher F, et al. Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N Engl J Med* 2008;358:2016–23.
8. Tikkanen JT, Anttonen O, Junttila MJ, et al. Long-term outcome associated with early repolarization on electrocardiography. *N Engl J Med* 2009;361:2529–37.
9. Sinner MF, Reinhard W, Müller M, et al. Association of early repolarization pattern on ECG with risk of cardiac and all-cause mortality: a population-based prospective cohort study (MONICA/KORA). *PLoS Med* 2010;7:e1000314.
10. Antzelevitch C, Yan G-X. J wave syndromes. *Heart Rhythm* 2010;7:549–58.
11. Haïssaguerre M, Chatel S, Sacher F, et al. Ventricular fibrillation with prominent early repolarization associated with a rare variant of KCNJ8/K ATP channel. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009;20:93–8.
12. Medeiros-Domingo A, Tan B-H, Crotti L, et al. Gain-of-function mutation S422L in the KCNJ8-encoded cardiac KATP channel Kir6.1 as a pathogenic substrate for J-wave syndromes. *Heart Rhythm* 2010;7:1466–71.
13. Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, et al. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010;7:1872–82.
14. Abe A, Ikeda T, Tsukada T, et al. Circadian variation of late potentials in idiopathic ventricular fibrillation associated with J waves: insights into alternative pathophysiology and risk stratification. *Heart Rhythm* 2010;7:675–82.
15. Osborn JJ. Experimental hypothermia: respiratory and blood pH changes in relation to cardiac function. *Am J Physiol* 1953;175:389–98.
16. Benito B, Guasch E, Rivard L, Nattel S. Clinical and mechanistic issues in early repolarization of normal variants and lethal arrhythmia syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:1177–86.
17. Derval N, Simpson CS, Birnie DH, et al. Prevalence and characteristics of early repolarization in the CASPER registry: Cardiac Arrest Survivors with Preserved Ejection fraction Registry. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:722–8.

18. Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, et al., American College of Cardiology, American Heart Association Task Force, European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:e247–346.
19. Tikkanen JT, Junttila MJ, Anttonen O, et al. Early repolarization: electrocardiographic phenotypes associated with favorable long-term outcome. *Circulation* 2011;123:2666–73.
20. Surawicz B, Macfarlane PW. Inappropriate and confusing electrocardiographic terms: J-wave syndromes and early repolarization. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1584–6.
21. Riera ARP, Uchida AH, Schapachnik E, et al. Early repolarization variant: epidemiological aspects, mechanism, and differential diagnosis. *Cardiol J* 2008;15:4–16.
22. Nunn LM, Bhar-Amato J, Lowe MD, et al. Prevalence of J-point elevation in sudden arrhythmic death syndrome families. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:286–90.
23. Noseworthy PA, Tikkanen JT, Porthan K, et al. The early repolarization pattern in the general population: clinical correlates and heritability. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:2284–9.
24. Haïssaguerre M, Sacher F, Nogami A, et al. Characteristics of recurrent ventricular fibrillation associated with inferolateral early repolarization: role of drug therapy. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:612–9.
25. Borggrefe M, Schimpf R. J-wave syndromes caused by repolarization or depolarization mechanisms: a debated issue among experimental and clinical electrophysiologists. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:798–800.
26. Nam G-B, Kim Y-H, Antzelevitch C. Augmentation of J waves and electrical storms in patients with early repolarization. *N Engl J Med* 2008;358:2078–9.
27. Rosso R, Kogan E, Belhassen B, et al. J-point elevation in survivors of primary ventricular fibrillation and matched control subjects: incidence and clinical significance. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1231–8.
28. Miyazaki S, Shah AJ, Haïssaguerre M. Early repolarization syndrome. *Circ J* 2010;74:2039–44.
29. Reinhard W, Kaess BM, Debiec R, et al. Heritability of early repolarization/clinical perspective. *Circ Cardiovasc Genet* 2011;4:134–8.
30. Mizumaki K, Nishida K, Iwamoto J, et al. Early Repolarization in Wolff-Parkinson-White syndrome: prevalence and clinical significance. *Europace* 2011;13:1195–200.
31. Watanabe H, Makiyama T, Koyama T, et al. High prevalence of early repolarization in short QT syndrome. *Heart Rhythm* 2010;7:647–52.
32. Lestas KP, Sacher F, Probst V, et al. Prevalence of early repolarization pattern in inferolateral leads in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2008;5:1685–9.
33. Kawata H, Noda T, Yamada Y, et al. Effect of sodium-channel blockade on early repolarization in inferior/lateral leads in patients with idiopathic ventricular fibrillation and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2012;9:77–83.

Key Words: early repolarization syndrome ■ familial inheritance ■ ventricular fibrillation.

F. BIBLIOGRAPHIE

- Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O., Cardon, L.R., 2002. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* 30, 97–101.
- Akai, J., Makita, N., Sakurada, H., Shirai, N., Ueda, K., Kitabatake, A., Nakazawa, K., Kimura, A., Hiraoka, M., 2000. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett.* 479, 29–34.
- An, W.F., Bowlby, M.R., Betty, M., Cao, J., Ling, H.P., Mendoza, G., Hinson, J.W., Mattsson, K.I., Strassle, B.W., Trimmer, J.S., Rhodes, K.J., 2000. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403, 553–556.
- Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., Gussak, I., LeMarec, H., Nademanee, K., Perez Riera, A.R., Shimizu, W., Schulze-Bahr, E., Tan, H., Wilde, A., 2005. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation* 111, 659–670.
- Antzelevitch, C., Pollevick, G.D., Cordeiro, J.M., Casis, O., Sanguinetti, M.C., Aizawa, Y., Guerchicoff, A., Pfeiffer, R., Oliva, A., Wollnik, B., Gelber, P., Bonaros, E.P., Burashnikov, E., Wu, Y., Sargent, J.D., Schickel, S., Oberheiden, R., Bhatia, A., Hsu, L.-F., Haïssaguerre, M., Schimpf, R., Borggrefe, M., Wolpert, C., 2007. Loss-of-Function Mutations in the Cardiac Calcium Channel Underlie a New Clinical Entity Characterized by ST-Segment Elevation, Short QT Intervals, and Sudden Cardiac Death. *Circulation* 115, 442–449.
- Antzelevitch, C., Sicouri, S., Litovsky, S.H., Lukas, A., Krishnan, S.C., Di Diego, J.M., Gintant, G.A., Liu, D.W., 1991. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ. Res.* 69, 1427–1449.
- Antzelevitch, C., Yan, G.-X., 2011. J-wave syndromes. from cell to bedside. *J. Electrocardiol.* 44, 656–661.
- Arking, D.E., Junttila, M.J., Goyette, P., Huertas-Vazquez, A., Eijgelsheim, M., Blom, M.T., Newton-Cheh, C., Reinier, K., Teodorescu, C., Uy-Evanado, A., Carter-Monroe, N., Kaikkonen, K.S., Kortelainen, M.-L., Boucher, G., Lagacé, C., Moes, A., Zhao, X., Kolodgie, F., Rivadeneira, F., Hofman, A., Witteman, J.C.M., Uitterlinden, A.G., Marsman, R.F., Pazoki, R., Bardai, A., Koster, R.W., Dehghan, A., Hwang, S.-J., Bhatnagar, P., Post, W., Hilton, G., Prineas, R.J., Li, M., Köttgen, A., Ehret, G., Boerwinkle, E., Coresh, J., Kao, W.H.L., Psaty, B.M., Tomaselli, G.F., Sotoodehnia, N., Siscovick, D.S., Burke, G.L., Marbán, E., Spooner, P.M., Cupples, L.A., Jui, J., Gunson, K., Kesäniemi, Y.A., Wilde, A.A.M., Tardif, J.-C., O'Donnell, C.J., Bezzina, C.R., Virmani, R., Stricker, B.H.C. h., Tan, H.L., Albert, C.M., Chakravarti, A., Rioux, J.D., Huikuri, H.V., Chugh, S.S., 2011. Identification of a Sudden Cardiac Death Susceptibility Locus at 2q24.2 through Genome-Wide Association in European Ancestry Individuals. *PLoS Genet* 7, e1002158.
- Barajas-Martínez, H., Hu, D., Ferrer, T., Onetti, C.G., Wu, Y., Burashnikov, E., Boyle, M., Surman, T., Urrutia, J., Veltmann, C., Schimpf, R., Borggrefe, M., Wolpert, C., Ibrahim, B.B., Sánchez-Chapula, J.A., Winters, S., Haïssaguerre, M., Antzelevitch, C., 2012. Molecular genetic and functional association of Brugada and early repolarization syndromes with S422L missense mutation in KCNJ8. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 9, 548–555.

- Barski, O.A., Mindnich, R., Penning, T.M., 2013. Alternative splicing in the aldo–keto reductase superfamily: Implications for protein nomenclature. *Chem. Biol. Interact.* 202, 153–158.
- Beffert, U., Dillon, G.M., Sullivan, J.M., Stuart, C.E., Gilbert, J.P., Kambouris, J.A., Ho, A., 2012. Microtubule plus-end tracking protein CLASP2 regulates neuronal polarity and synaptic function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 13906–13916.
- Béguin, P., Mahalakshmi, R.N., Nagashima, K., Cher, D.H.K., Ikeda, H., Yamada, Y., Seino, Y., Hunziker, W., 2006. Nuclear Sequestration of β -Subunits by Rad and Rem is Controlled by 14-3-3 and Calmodulin and Reveals a Novel Mechanism for Ca^{2+} Channel Regulation. *J. Mol. Biol.* 355, 34–46.
- Benson, D.W., Wang, D.W., Dymment, M., Knilans, T.K., Fish, F.A., Strieper, M.J., Rhodes, T.H., George, A.L., Jr, 2003. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J. Clin. Invest.* 112, 1019–1028.
- Berne, P., Brugada, J., 2012. Brugada syndrome 2012. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 76, 1563–1571.
- Bezzina, C.R., Barc, J., Mizusawa, Y., Remme, C.A., Gourraud, J.-B., Simonet, F., Verkerk, A.O., Schwartz, P.J., Crotti, L., Dagradi, F., Guicheney, P., Fressart, V., Leenhardt, A., Antzelevitch, C., Bartkowiak, S., Schulze-Bahr, E., Zumhagen, S., Behr, E.R., Bastiaenen, R., Tfelt-Hansen, J., Olesen, M.S., Kääb, S., Beckmann, B.M., Weeke, P., Watanabe, H., Endo, N., Minamino, T., Horie, M., Ohno, S., Hasegawa, K., Makita, N., Nogami, A., Shimizu, W., Aiba, T., Froguel, P., Balkau, B., Lantieri, O., Torchio, M., Wiese, C., Weber, D., Wolswinkel, R., Coronel, R., Boukens, B.J., Béziau, S., Charpentier, E., Chatel, S., Despres, A., Gros, F., Kyndt, F., Lecoq, S., Lindenbaum, P., Portero, V., Violleau, J., Gessler, M., Tan, H.L., Roden, D.M., Christoffels, V.M., Le Marec, H., Wilde, A.A., Probst, V., Schott, J.-J., Dina, C., Redon, R., 2013. Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat. Genet.*
- Bezzina, C.R., Pazoki, R., Bardai, A., Marsman, R.F., de Jong, J.S.S.G., Blom, M.T., Scicluna, B.P., Jukema, J.W., Bindraban, N.R., Lichtner, P., Pfeufer, A., Bishopric, N.H., Roden, D.M., Meitinger, T., Chugh, S.S., Myerburg, R.J., Jouven, X., Kääb, S., Dekker, L.R.C., Tan, H.L., Tanck, M.W.T., Wilde, A.A.M., 2010. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus at 21q21 for ventricular fibrillation in acute myocardial infarction. *Nat. Genet.* 42, 688–691.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., De Waard, M., 2000. The I-II loop of the Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177–190.
- Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S., 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351–1362.
- Bradshaw, J.M., Hudmon, A., Schulman, H., 2002. Chemical quenched flow kinetic studies indicate an intraholoenzyme autophosphorylation mechanism for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 277, 20991–20998.
- Brette, F., Leroy, J., Le Guennec, J.-Y., Sallé, L., 2006. Ca^{2+} currents in cardiac myocytes: Old story, new insights. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 91, 1–82.
- Brette, F., Orchard, C.H., 2006. Density and sub-cellular distribution of cardiac and neuronal sodium channel isoforms in rat ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1163–1166.
- Brugada, P., Brugada, J., 1992. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J. Am. Coll. Cardiol.* 20, 1391–1396.
- Brugada, P., Brugada, R., Brugada, J., 2000. Sudden death in high-risk family members: Brugada syndrome. *Am. J. Cardiol.* 86, 40K–43K.

- Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe, M., Häissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G.D., Guerchicoff, A., Laiño, R., Marieb, M., Nademanee, K., Nam, G.-B., Robles, R., Schimpf, R., Stapleton, D.D., Viskin, S., Winters, S., Wolpert, C., Zimmern, S., Veltmann, C., Antzelevitch, C., 2010a. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 7, 1872–1882.
- Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe, M., Häissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G.D., Guerchicoff, A., Laiño, R., Marieb, M., Nademanee, K., Nam, G.-B., Robles, R., Schimpf, R., Stapleton, D.D., Viskin, S., Winters, S., Wolpert, C., Zimmern, S., Veltmann, C., Antzelevitch, C., 2010b. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 7, 1872–1882.
- Casini, S., Tan, H.L., Demirayak, I., Remme, C.A., Amin, A.S., Scicluna, B.P., Chatyan, H., Ruijter, J.M., Bezzina, C.R., van Ginneken, A.C.G., Veldkamp, M.W., 2010. Tubulin polymerization modifies cardiac sodium channel expression and gating. *Cardiovasc. Res.* 85, 691–700.
- Catalano, O., Antonaci, S., Moro, G., Mussida, M., Frascaroli, M., Baldi, M., Cobelli, F., Baiardi, P., Nastoli, J., Bloise, R., Monteforte, N., Napolitano, C., Priori, S.G., 2009. Magnetic resonance investigations in Brugada syndrome reveal unexpectedly high rate of structural abnormalities. *Eur. Heart J.* 30, 2241–2248.
- Chang, L., Zhang, J., Tseng, Y.-H., Xie, C.-Q., Ilany, J., Brüning, J.C., Sun, Z., Zhu, X., Cui, T., Youker, K.A., Yang, Q., Day, S.M., Kahn, C.R., Chen, Y.E., 2007. Rad GTPase deficiency leads to cardiac hypertrophy. *Circulation* 116, 2976–2983.
- Chen, Q., Kirsch, G.E., Zhang, D., Brugada, R., Brugada, J., Brugada, P., Potenza, D., Moya, A., Borggrefe, M., Breithardt, G., Ortiz-Lopez, R., Wang, Z., Antzelevitch, C., O'Brien, R.E., Schulze-Bahr, E., Keating, M.T., Towbin, J.A., Wang, Q., 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392, 293–296.
- Chen, Y.-C., Carter, H., Parla, J., Kramer, M., Goes, F.S., Pirooznia, M., Zandi, P.P., McCombie, W.R., Potash, J.B., Karchin, R., 2013. A hybrid likelihood model for sequence-based disease association studies. *PLoS Genet.* 9, e1003224.
- Christie, M.J., North, R.A., Osborne, P.B., Douglass, J., Adelman, J.P., 1990. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 4, 405–411.
- Clerget-Darpoux, F., Bonaïti-Pellié, C., Hochez, J., 1986. Effects of misspecifying genetic parameters in lod score analysis. *Biometrics* 42, 393–399.
- Cohen, S.A., 1996. Immunocytochemical localization of rH1 sodium channel in adult rat heart atria and ventricle. Presence in terminal intercalated disks. *Circulation* 94, 3083–3086.
- Crotti, L., Marcou, C.A., Tester, D.J., Castelletti, S., Giudicessi, J.R., Torchio, M., Medeiros-Domingo, A., Simone, S., Will, M.L., Dagradi, F., Schwartz, P.J., Ackerman, M.J., 2012a. Spectrum and Prevalence of Mutations Involving BrS1- Through BrS12-Susceptibility Genes in a Cohort of Unrelated Patients Referred for Brugada Syndrome Genetic Testing: Implications for Genetic Testing. *J. Am. Coll. Cardiol.*
- Crotti, L., Marcou, C.A., Tester, D.J., Castelletti, S., Giudicessi, J.R., Torchio, M., Medeiros-Domingo, A., Simone, S., Will, M.L., Dagradi, F., Schwartz, P.J., Ackerman, M.J., 2012b. Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1- through BrS12-susceptibility genes in a cohort of unrelated patients referred for Brugada syndrome genetic testing: implications for genetic testing. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 1410–1418.
- Crotti, L., Marcou, C.A., Tester, D.J., Castelletti, S., Giudicessi, J.R., Torchio, M., Medeiros-Domingo, A., Simone, S., Will, M.L., Dagradi, F., Schwartz, P.J., Ackerman, M.J., 2012c. Spectrum and prevalence of mutations involving BrS1- through BrS12-susceptibility

- genes in a cohort of unrelated patients referred for Brugada syndrome genetic testing: implications for genetic testing. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 1410–1418.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C.A., Banks, E., DePristo, M.A., Handsaker, R.E., Lunter, G., Marth, G.T., Sherry, S.T., McVean, G., Durbin, R., 1000 Genomes Project Analysis Group, 2011. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27, 2156 – 2158.
- Delpón, E., Cordeiro, J.M., Núñez, L., Thomsen, P.E.B., Guerchicoff, A., Pollevick, G.D., Wu, Y., Kanters, J.K., Larsen, C.T., Hofman-Bang, J., Burashnikov, E., Christiansen, M., Antzelevitch, C., 2008. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 1, 209–218.
- Den Hoed, M., Eijgelsheim, M., Esko, T., Brundel, B.J.J.M., Peal, D.S., Evans, D.M., Nolte, I.M., Segrè, A.V., Holm, H., Handsaker, R.E., Westra, H.-J., Johnson, T., Isaacs, A., Yang, J., Lundby, A., Zhao, J.H., Kim, Y.J., Go, M.J., Almgren, P., Bochud, M., Boucher, G., Cornelis, M.C., Gudbjartsson, D., Hadley, D., van der Harst, P., Hayward, C., den Heijer, M., Igl, W., Jackson, A.U., Kutalik, Z., Luan, J., Kemp, J.P., Kristiansson, K., Ladenvall, C., Lorentzon, M., Montasser, M.E., Njajou, O.T., O'Reilly, P.F., Padmanabhan, S., St Pourcain, B., Rankinen, T., Salo, P., Tanaka, T., Timpson, N.J., Vitart, V., Waite, L., Wheeler, W., Zhang, W., Draisma, H.H.M., Feitosa, M.F., Kerr, K.F., Lind, P.A., Mihailov, E., Onland-Moret, N.C., Song, C., Weedon, M.N., Xie, W., Yengo, L., Absher, D., Albert, C.M., Alonso, A., Arking, D.E., de Bakker, P.I.W., Balkau, B., Barlassina, C., Benaglio, P., Bis, J.C., Bouatia-Naji, N., Brage, S., Chanock, S.J., Chines, P.S., Chung, M., Darbar, D., Dina, C., Dörr, M., Elliott, P., Felix, S.B., Fischer, K., Fuchsberger, C., de Geus, E.J.C., Goyette, P., Gudnason, V., Harris, T.B., Hartikainen, A.-L., Havulinna, A.S., Heckbert, S.R., Hicks, A.A., Hofman, A., Holewijn, S., Hoogstra-Berends, F., Hottenga, J.-J., Jensen, M.K., Johansson, A., Junttila, J., Kääb, S., Kanon, B., Ketkar, S., Khaw, K.-T., Knowles, J.W., Kooner, A.S., Kors, J.A., Kumari, M., Milani, L., Laiho, P., Lakatta, E.G., Langenberg, C., Leusink, M., Liu, Y., Luben, R.N., Lunetta, K.L., Lynch, S.N., Markus, M.R.P., Marques-Vidal, P., Mateo Leach, I., McArdle, W.L., McCarroll, S.A., Medland, S.E., Miller, K.A., Montgomery, G.W., Morrison, A.C., Müller-Nurasyid, M., Navarro, P., Nelis, M., O'Connell, J.R., O'Donnell, C.J., Ong, K.K., Newman, A.B., Peters, A., Polasek, O., Pouta, A., Pramstaller, P.P., Psaty, B.M., Rao, D.C., Ring, S.M., Rossin, E.J., Rudan, D., Sanna, S., Scott, R.A., Sehmi, J.S., Sharp, S., Shin, J.T., Singleton, A.B., Smith, A.V., Soranzo, N., Spector, T.D., Stewart, C., Stringham, H.M., Tarasov, K.V., Uitterlinden, A.G., Vandenput, L., Hwang, S.-J., Whitfield, J.B., Wijmenga, C., Wild, S.H., Willemsen, G., Wilson, J.F., Witteman, J.C.M., Wong, A., Wong, Q., Jamshidi, Y., Zitting, P., Boer, J.M.A., Boomsma, D.I., Borecki, I.B., van Duijn, C.M., Ekelund, U., Forouhi, N.G., Froguel, P., Hingorani, A., Ingelsson, E., Kivimäki, M., Kronmal, R.A., Kuh, D., Lind, L., Martin, N.G., Oostra, B.A., Pedersen, N.L., Quertermous, T., Rotter, J.I., van der Schouw, Y.T., Verschuren, W.M.M., Walker, M., Albanes, D., Arner, D.O., Assimes, T.L., Bandinelli, S., Boehnke, M., de Boer, R.A., Bouchard, C., Caulfield, W.L.M., Chambers, J.C., Curhan, G., Cusi, D., Eriksson, J., Ferrucci, L., van Gilst, W.H., Glorioso, N., de Graaf, J., Groop, L., Gyllenstein, U., Hsueh, W.-C., Hu, F.B., Huikuri, H.V., Hunter, D.J., Iribarren, C., Isomaa, B., Jarvelin, M.-R., Jula, A., Kähönen, M., Kiemeny, L.A., van der Klauw, M.M., Kooner, J.S., Kraft, P., Iacoviello, L., Lehtimäki, T., Lokki, M.-L.L., Mitchell, B.D., Navis, G., Nieminen, M.S., Ohlsson, C., Poulter, N.R., Qi, L., Raitakari, O.T., Rimm, E.B., Rioux, J.D., Rizzi, F., Rudan, I., Salomaa, V., Sever, P.S., Shields, D.C., Shuldiner, A.R., Sinisalo, J., Stanton, A.V., Stolk, R.P., Strachan, D.P., Tardif, J.-C., Thorsteinsdottir, U., Tuomilehto, J., van Veldhuisen, D.J., Virtamo, J., Viikari, J., Vollenweider, P., Waeber, G., Widen, E., Cho, Y.S., Olsen, J.V., Visscher, P.M., Willer, C., Franke, L., Global BPgen Consortium, CARDIoGRAM Consortium, Erdmann, J., Thompson, J.R., PR GWAS Consortium,

- Pfeufer, A., QRS GWAS Consortium, Sotoodehnia, N., QT-IGC Consortium, Newton-Cheh, C., CHARGE-AF Consortium, Ellinor, P.T., Stricker, B.H.C., Metspalu, A., Perola, M., Beckmann, J.S., Smith, G.D., Stefansson, K., Wareham, N.J., Munroe, P.B., Sibon, O.C.M., Milan, D.J., Snieder, H., Samani, N.J., Loos, R.J.F., 2013. Identification of heart rate-associated loci and their effects on cardiac conduction and rhythm disorders. *Nat. Genet.* 45, 621–631.
- Dixon, J.E., Shi, W., Wang, H.S., McDonald, C., Yu, H., Wymore, R.S., Cohen, I.S., McKinnon, D., 1996. Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ. Res.* 79, 659–668.
- Doris, P.A., 2002. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease:common variant hypothesis. *Hypertension* 39, 323–331.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R., 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.
- Drabek, K., van Ham, M., Stepanova, T., Draegestein, K., van Horssen, R., Sayas, C.L., Akhmanova, A., ten Hagen, T., Smits, R., Fodde, R., Grosveld, F., Galjart, N., 2006. Role of CLASP2 in Microtubule Stabilization and the Regulation of Persistent Motility. *Curr. Biol.* 16, 2259–2264.
- Elizari, M.V., Levi, R., Acunzo, R.S., Chiale, P.A., Civetta, M.M., Ferreiro, M., Sicouri, S., 2007. Abnormal expression of cardiac neural crest cells in heart development: a different hypothesis for the etiopathogenesis of Brugada syndrome. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 4, 359–365.
- Ellsworth, E.G., Ackerman, M.J., 2005. The changing face of sudden cardiac death in the young. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 2, 1283–1285.
- Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M., Campbell, K.P., 1997. Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ subunit. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 6884–6891.
- Feuk, L., Carson, A.R., Scherer, S.W., 2006. Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* 7, 85–97.
- Fiegler, H., Redon, R., Carter, N.P., 2007. Construction and use of spotted large-insert clone DNA microarrays for the detection of genomic copy number changes. *Nat. Protoc.* 2, 577–587.
- Fox, A.P., Nowycky, M.C., Tsien, R.W., 1987. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394, 173–200.
- Frigo, G., Rampazzo, A., Bauce, B., Pilichou, K., Beffagna, G., Danieli, G.A., Nava, A., Martini, B., 2007. Homozygous SCN5A mutation in Brugada syndrome with monomorphic ventricular tachycardia and structural heart abnormalities. *Eur. J. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 9, 391–397.
- Frustaci, A., Priori, S.G., Pieroni, M., Chimenti, C., Napolitano, C., Rivolta, I., Sanna, T., Bellocci, F., Russo, M.A., 2005. Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation* 112, 3680–3687.
- Fu, M., Zhang, J., Tseng, Y.-H., Cui, T., Zhu, X., Xiao, Y., Mou, Y., Leon, H.D., Chang, M.M.J., Hamamori, Y., Kahn, C.R., Chen, Y.E., 2005. Rad GTPase Attenuates Vascular Lesion Formation by Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation* 111, 1071–1077.
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., Demolombe, S., 2007. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J. Physiol.* 582, 675–693.

- Gaborit, N., Varro, A., Le Bouter, S., Szuts, V., Escande, D., Nattel, S., Demolombe, S., 2010a. Gender-related differences in ion-channel and transporter subunit expression in non-diseased human hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 639–646.
- Gaborit, N., Varro, A., Le Bouter, S., Szuts, V., Escande, D., Nattel, S., Demolombe, S., 2010b. Gender-related differences in ion-channel and transporter subunit expression in non-diseased human hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 639–646.
- Gallagher, M.M., Forleo, G.B., Behr, E.R., Magliano, G., De Luca, L., Morgia, V., De Liberato, F., Romeo, F., 2008. Prevalence and significance of Brugada-type ECG in 12,012 apparently healthy European subjects. *Int. J. Cardiol.* 130, 44–48.
- Gellens, M.E., George, A.L., Jr, Chen, L.Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R.L., Kallen, R.G., 1992. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 554–558.
- George, A.L., Jr, 2013. Molecular and genetic basis of sudden cardiac death. *J. Clin. Invest.* 123, 75–83.
- George, A.L., Jr, Varkony, T.A., Drabkin, H.A., Han, J., Knops, J.F., Finley, W.H., Brown, G.B., Ward, D.C., Haas, M., 1995. Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet. Cell Genet.* 68, 67–70.
- Giudicessi, John R., Ye, D., Tester, D.J., Crotti, L., Mugione, A., Nesterenko, V.V., Albertson, R.M., Antzelevitch, C., Schwartz, P.J., Ackerman, M.J., 2011. Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 8, 1024–1032.
- Giudicessi, John R., Ye, D., Tester, D.J., Crotti, L., Mugione, A., Nesterenko, V.V., Albertson, R.M., Antzelevitch, C., Schwartz, P.J., Ackerman, M.J., 2011. Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 8, 1024–1032.
- Goldberger, J.J., Cain, M.E., Hohnloser, S.H., Kadish, A.H., Knight, B.P., Lauer, M.S., Maron, B.J., Page, R.L., Passman, R.S., Siscovick, D., Stevenson, W.G., Zipes, D.P., American Heart Association Council on Clinical Cardiology, American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, American College of Cardiology Foundation, Heart Rhythm Society, 2008. American Heart Association/american College of Cardiology Foundation/heart Rhythm Society scientific statement on noninvasive risk stratification techniques for identifying patients at risk for sudden cardiac death: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology Committee on Electrocardiography and Arrhythmias and Council on Epidemiology and Prevention. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 5, e1–21.
- Gourraud, J.-B., Le Scouarnec, S., Sacher, F., Chatel, S., Derval, N., Portero, V., Chavernac, P., Sandoval, J.E., Mabo, P., Redon, R., Schott, J.-J., Le Marec, H., Haïssaguerre, M., Probst, V., 2013. Identification of large families in early repolarization syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61, 164–172.
- Guo, W., Jung, W.E., Marionneau, C., Aimond, F., Xu, H., Yamada, K.A., Schwarz, T.L., Demolombe, S., Nerbonne, J.M., 2005. Targeted deletion of Kv4.2 eliminates I_(to,f) and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. *Circ. Res.* 97, 1342–1350.
- Gurnett, C.A., Felix, R., Campbell, K.P., 1997. Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha₂delta and alpha₁ subunits. *J. Biol. Chem.* 272, 18508–18512.
- Haïssaguerre, M., Derval, N., Sacher, F., Jesel, L., Deisenhofer, I., de Roy, L., Pasquié, J.-L., Nogami, A., Babuty, D., Yli-Mayry, S., De Chillou, C., Scanu, P., Mabo, P., Matsuo, S., Probst, V., Le Scouarnec, S., Defaye, P., Schlaepfer, J., Rostock, T., Lacroix, D., Lamaison, D., Lavergne, T., Aizawa, Y., Englund, A., Anselme, F., O'Neill, M., Hocini,

- M., Lim, K.T., Knecht, S., Veenhuyzen, G.D., Bordachar, P., Chauvin, M., Jais, P., Coureau, G., Chene, G., Klein, G.J., Clémenty, J., 2008. Sudden cardiac arrest associated with early repolarization. *N. Engl. J. Med.* 358, 2016–2023.
- Hakim, P., Gurung, I.S., Pedersen, T.H., Thresher, R., Brice, N., Lawrence, J., Grace, A.A., Huang, C.L.-H., 2008. Scn3b knockout mice exhibit abnormal ventricular electrophysiological properties. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 251–266.
- Han, L., Abney, M., 2011a. Identity by descent estimation with dense genome-wide genotype data. *Genet. Epidemiol.* 35, 557–567.
- Han, L., Abney, M., 2011b. Identity by descent estimation with dense genome-wide genotype data. *Genet. Epidemiol.* 35, 557–567.
- Hong, K., Brugada, J., Oliva, A., Berruezo-Sanchez, A., Potenza, D., Pollevick, G.D., Guerchicoff, A., Matsuo, K., Burashnikov, E., Dumaine, R., Towbin, J.A., Nesterenko, V., Brugada, P., Antzelevitch, C., Brugada, R., 2004. Value of Electrocardiographic Parameters and Ajmaline Test in the Diagnosis of Brugada Syndrome Caused by SCN5A Mutations. *Circulation* 110, 3023–3027.
- Honnappa, S., Gouveia, S.M., Weisbrich, A., Damberger, F.F., Bhavesh, N.S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F.J.A., Buey, R.M., Lawera, A., Jelesarov, I., Winkler, F.K., Wüthrich, K., Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2009. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* 138, 366–376.
- Hoogaars, W.M.H., Engel, A., Brons, J.F., Verkerk, A.O., Lange, F.J. de, Wong, L.Y.E., Bakker, M.L., Clout, D.E., Wakker, V., Barnett, P., Ravesloot, J.H., Moorman, A.F.M., Verheijck, E.E., Christoffels, V.M., 2007. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev.* 21, 1098–1112.
- Hu, D., Barajas-Martinez, H., Burashnikov, E., Springer, M., Wu, Y., Varro, A., Pfeiffer, R., Koopmann, T.T., Cordeiro, J.M., Guerchicoff, A., Pollevick, G.D., Antzelevitch, C., 2009. A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2, 270–278.
- Hu, D., Viskin, S., Oliva, A., Carrier, T., Cordeiro, J.M., Barajas-Martinez, H., Wu, Y., Burashnikov, E., Sicouri, S., Brugada, R., Rosso, R., Guerchicoff, A., Pollevick, G.D., Antzelevitch, C., 2007. Novel mutation in the SCN5A gene associated with arrhythmic storm development during acute myocardial infarction. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 4, 1072–1080.
- Huikuri, H.V., Castellanos, A., Myerburg, R.J., 2001. Sudden Death Due to Cardiac Arrhythmias. *N. Engl. J. Med.* 345, 1473–1482.
- Hur, E.-M., Saijilafu, Lee, B.D., Kim, S.-J., Xu, W.-L., Zhou, F.-Q., 2011. GSK3 controls axon growth via CLASP-mediated regulation of growth cone microtubules. *Genes Dev.* 25, 1968–1981.
- International HapMap Consortium, 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299–1320.
- Isacoff, E.Y., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1990. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* 345, 530–534.
- Ishikawa, T., Sato, A., Marcou, C.A., Tester, D.J., Ackerman, M.J., Crotti, L., Schwartz, P.J., On, Y.K., Park, J.-E., Nakamura, K., Hiraoka, M., Nakazawa, K., Sakurada, H., Arimura, T., Makita, N., Kimura, A., 2012. A Novel Disease Gene for Brugada Syndrome Sarcolemmal Membrane-Associated Protein Gene Mutations Impair Intracellular Trafficking of hNav1.5. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 5, 1098–1107.
- Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., Catterall, W.A., 1992. Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256, 839–842.

- Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., Catterall, W.A., 1995. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83, 433–442.
- Jouven, X., Escande, D., 2006. [Sudden cardiac death: toward the identification of susceptibility genes]. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 99, 806–812.
- Kääb, S., Schulze-Bahr, E., 2005. Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* 67, 397–413.
- Kattygnarath, D., Maugenre, S., Neyroud, N., Balse, E., Ichai, C., Denjoy, I., Dilanian, G., Martins, R.P., Fressart, V., Berthet, M., Schott, J.J., Leenhardt, A., Probst, V., Le Marec, H., Hainque, B., Coulombe, A., Hatem, S.N., Guicheney, P., 2011. MOG1: A New Susceptibility Gene for Brugada Syndrome. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4, 261–268.
- Klugbauer, N., Lacinová, L., Marais, E., Hobom, M., Hofmann, F., 1999. Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 684–691.
- Kolder, I.C.R.M., Tanck, M.W.T., Bezzina, C.R., 2012. Common genetic variation modulating cardiac ECG parameters and susceptibility to sudden cardiac death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 620–629.
- Kong, W., Po, S., Yamagishi, T., Ashen, M.D., Stetten, G., Tomaselli, G.F., 1998. Isolation and characterization of the human gene encoding Ito: further diversity by alternative mRNA splicing. *Am. J. Physiol.* 275, H1963–1970.
- Kucera, J.P., Rohr, S., Rudy, Y., 2002. Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ. Res.* 91, 1176–1182.
- Kumar, P., Chimenti, M.S., Pemble, H., Schönichen, A., Thompson, O., Jacobson, M.P., Wittmann, T., 2012. Multisite Phosphorylation Disrupts Arginine-Glutamate Salt Bridge Networks Required for Binding of the Cytoplasmic Linker-Associated Protein 2 (CLASP2) to End-Binding Protein 1 (EB1). *J. Biol. Chem.*
- Kumar, V., Patel, N., Van Houzen, N., Saini, N., 2013. Brugada-type electrocardiographic changes induced by fever. *Circulation* 127, 2145–2146.
- Leoni, A.-L., Gavillet, B., Rougier, J.-S., Marionneau, C., Probst, V., Le Scouarnec, S., Schott, J.-J., Demolombe, S., Bruneval, P., Huang, C.L.H., Colledge, W.H., Grace, A.A., Le Marec, H., Wilde, A.A., Mohler, P.J., Escande, D., Abriel, H., Charpentier, F., 2010. Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the Scn5a(+/-) mouse model. *PloS One* 5, e9298.
- Leterrier, C., Vacher, H., Fache, M.-P., d'Ortoli, S.A., Castets, F., Autillo-Touati, A., Dargent, B., 2011. End-binding proteins EB3 and EB1 link microtubules to ankyrin G in the axon initial segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8826–8831.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Li, X., Xu, Z., Li, S., Rozanski, G.J., 2005. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1417–1424.
- Lindenbaum, P., Le Scouarnec, S., Portero, V., Redon, R., 2011. Knime4Bio: a set of custom nodes for the interpretation of next-generation sequencing data with KNIME. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 3200–3201.
- London, B., Michalec, M., Mehdi, H., Zhu, X., Kerchner, L., Sanyal, S., Viswanathan, P.C., Pfahnl, A.E., Shang, L.L., Madhusudanan, M., Baty, C.J., Lagana, S., Aleong, R., Gutmann, R., Ackerman, M.J., McNamara, D.M., Weiss, R., Dudley, S.C., Jr, 2007. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 116, 2260–2268.
- Lukas, A., Antzelevitch, C., 1993. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular epicardium and endocardium to ischemia. Role of the transient outward current. *Circulation* 88, 2903–2915.

- MacKinnon, R., 1991. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350, 232–235.
- Makita, N., Seki, A., Sumitomo, N., Chkourko, H., Fukuhara, S., Watanabe, H., Shimizu, W., Bezzina, C.R., Hasdemir, C., Mugishima, H., Makiyama, T., Baruteau, A., Baron, E., Horie, M., Hagiwara, N., Wilde, A.A.M., Probst, V., Le Marec, H., Roden, D.M., Mochizuki, N., Schott, J.-J., Delmar, M., 2012. A connexin40 mutation associated with a malignant variant of progressive familial heart block type I. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 5, 163–172.
- Manolio, T.A., Collins, F.S., Cox, N.J., Goldstein, D.B., Hindorff, L.A., Hunter, D.J., McCarthy, M.I., Ramos, E.M., Cardon, L.R., Chakravarti, A., Cho, J.H., Guttmacher, A.E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C.N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A.S., Boehnke, M., Clark, A.G., Eichler, E.E., Gibson, G., Haines, J.L., Mackay, T.F.C., McCarroll, S.A., Visscher, P.M., 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753.
- Marsman, R.F., Barc, J., Beekman, L., Alders, M., Dooijes, D., van den Wijngaard, A., Ratbi, I., Sefiani, A., Bhuiyan, Z.A., Wilde, A.A.M., Bezzina, C.R., 2013. A mutation in CALM1 encoding calmodulin in familial idiopathic ventricular fibrillation in childhood and adolescence. *J. Am. Coll. Cardiol.*
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernysky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., DePristo, M.A., 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303.
- Medeiros-Domingo, A., Tan, B.-H., Crotti, L., Tester, D.J., Eckhardt, L., Cuoretti, A., Kroboth, S.L., Song, C., Zhou, Q., Kopp, D., Schwartz, P.J., Makielski, J.C., Ackerman, M.J., 2010. Gain-of-function mutation S422L in the KCNJ8-encoded cardiac K(ATP) channel Kir6.1 as a pathogenic substrate for J-wave syndromes. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 7, 1466–1471.
- Meregalli, P.G., Wilde, A.A.M., Tan, H.L., 2005a. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: Depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc. Res.* 67, 367–378.
- Meregalli, P.G., Wilde, A.A.M., Tan, H.L., 2005b. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: Depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc. Res.* 67, 367–378.
- Mohler, P.J., Rivolta, I., Napolitano, C., LeMaillet, G., Lambert, S., Priori, S.G., Bennett, V., 2004. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17533–17538.
- Morgan, K., Stevens, E.B., Shah, B., Cox, P.J., Dixon, A.K., Lee, K., Pinnock, R.D., Hughes, J., Richardson, P.J., Mizuguchi, K., Jackson, A.P., 2000. beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2308–2313.
- Morgenthaler, S., Thilly, W.G., 2007. A strategy to discover genes that carry multi-allelic or mono-allelic risk for common diseases: a cohort allelic sums test (CAST). *Mutat. Res.* 615, 28–56.
- Morton, N.E., 1955. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7, 277.
- Moyers, J.S., Bilan, P.J., Zhu, J., Kahn, C.R., 1997. Rad and Rad-related GTPases Interact with Calmodulin and Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *J. Biol. Chem.* 272, 11832–11839.
- Myerburg, R.J., Junttila, M.J., 2012. Sudden Cardiac Death Caused by Coronary Heart Disease. *Circulation* 125, 1043–1052.

- Näbauer, M., Beuckelmann, D.J., Überfuhr, P., Steinbeck, G., 1996. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 93, 168–177.
- Naccarelli, G.V., Antzelevitch, C., 2001. The Brugada syndrome: clinical, genetic, cellular, and molecular abnormalities. *Am. J. Med.* 110, 573–581.
- Nademanee, K., Veerakul, G., Chandanamattha, P., Chaothawee, L., Ariyachaipanich, A., Jirasirojanakorn, K., Likittanasombat, K., Bhuripanyo, K., Ngarmukos, T., 2011. Prevention of ventricular fibrillation episodes in Brugada syndrome by catheter ablation over the anterior right ventricular outflow tract epicardium. *Circulation* 123, 1270–1279.
- Nerbonne, J.M., Kass, R.S., 2005. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol. Rev.* 85, 1205–1253.
- Niwa, N., Nerbonne, J.M., 2010. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (Ito) expression and regulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 12–25.
- Ohno, S., Zankov, D.P., Ding, W.-G., Itoh, H., Makiyama, T., Doi, T., Shizuta, S., Hattori, T., Miyamoto, A., Naiki, N., Hancox, J.C., Matsuura, H., Horie, M., 2011. KCNE5 (KCNE1L) variants are novel modulators of Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 4, 352–361.
- Olson, T.M., Michels, V.V., Ballew, J.D., Reyna, S.P., Karst, M.L., Herron, K.J., Horton, S.C., Rodeheffer, R.J., Anderson, J.L., 2005. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 293, 447–454.
- Papavassiliu, T., Wolpert, C., Flüchter, S., Schimpf, R., Neff, W., Haase, K.K., Düber, C., Borggrefe, M., 2004. Magnetic resonance imaging findings in patients with Brugada syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 15, 1133–1138.
- Parent, L., Gopalakrishnan, M., 1995. Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca²⁺ channel. *Biophys. J.* 69, 1801–1813.
- Pereira, A.L., Pereira, A.J., Maia, A.R.R., Drabek, K., Sayas, C.L., Hergert, P.J., Lince-Faria, M., Matos, I., Duque, C., Stepanova, T., Rieder, C.L., Earnshaw, W.C., Galjart, N., Maiato, H., 2006. Mammalian CLASP1 and CLASP2 cooperate to ensure mitotic fidelity by regulating spindle and kinetochore function. *Mol. Biol. Cell* 17, 4526–4542.
- Pfeufer, A., Sanna, S., Arking, D.E., Müller, M., Gateva, V., Fuchsberger, C., Ehret, G.B., Orrú, M., Pattaro, C., Köttgen, A., Perz, S., Usala, G., Barbalic, M., Li, M., Pütz, B., Scuteri, A., Prineas, R.J., Sinner, M.F., Gieger, C., Najjar, S.S., Kao, W.H.L., Mühleisen, T.W., Dei, M., Happel, C., Möhlenkamp, S., Crisponi, L., Erbel, R., Jöckel, K.-H., Naitza, S., Steinbeck, G., Marroni, F., Hicks, A.A., Lakatta, E., Müller-Myhsok, B., Pramstaller, P.P., Wichmann, H.-E., Schlessinger, D., Boerwinkle, E., Meitinger, T., Uda, M., Coresh, J., Kääb, S., Abecasis, G.R., Chakravarti, A., 2009. Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study. *Nat. Genet.* 41, 407–414.
- Pfeufer, A., van Noord, C., Marcianti, K.D., Arking, D.E., Larson, M.G., Smith, A.V., Tarasov, K.V., Müller, M., Sotoodehnia, N., Sinner, M.F., Verwoert, G.C., Li, M., Kao, W.H.L., Köttgen, A., Coresh, J., Bis, J.C., Psaty, B.M., Rice, K., Rotter, J.I., Rivadeneira, F., Hofman, A., Kors, J.A., Stricker, B.H.C., Uitterlinden, A.G., van Duijn, C.M., Beckmann, B.M., Sauter, W., Gieger, C., Lubitz, S.A., Newton-Cheh, C., Wang, T.J., Magnani, J.W., Schnabel, R.B., Chung, M.K., Barnard, J., Smith, J.D., Van Wagoner, D.R., Vasan, R.S., Aspelund, T., Eiriksdottir, G., Harris, T.B., Launer, L.J., Najjar, S.S., Lakatta, E., Schlessinger, D., Uda, M., Abecasis, G.R., Müller-Myhsok, B., Ehret, G.B., Boerwinkle, E., Chakravarti, A., Soliman, E.Z., Lunetta, K.L., Perz, S., Wichmann, H.-E., Meitinger, T., Levy, D., Gudnason, V., Ellinor, P.T., Sanna, S., Kääb, S., Witteman, J.C.M., Alonso, A., Benjamin, E.J., Heckbert, S.R., 2010. Genome-wide association study of PR interval. *Nat. Genet.* 42, 153–159.

- Pitt, G.S., Zühlke, R.D., Hudmon, A., Schulman, H., Reuter, H., Tsien, R.W., 2001. Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 276, 30794–30802.
- Pollard, K.S., Hubisz, M.J., Rosenbloom, K.R., Siepel, A., 2010. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 20, 110–121.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P., Campbell, K.P., 1994. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 368, 67–70.
- Priori, S.G., Gasparini, M., Napolitano, C., Della Bella, P., Ottonelli, A.G., Sassone, B., Giordano, U., Pappone, C., Mascioli, G., Rossetti, G., De Nardis, R., Colombo, M., 2012. Risk stratification in Brugada syndrome: results of the PRELUDE (PRogrammed ELectrical stimUlation preDICTive valuE) registry. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59, 37–45.
- Priori, S.G., Wilde, A.A., Horie, M., Cho, Y., Behr, E.R., Berul, C., Blom, N., Brugada, J., Chiang, C.-E., Huikuri, H., Kannankeril, P., Krah, A., Leenhardt, A., Moss, A., Schwartz, P.J., Shimizu, W., Tomaselli, G., Tracy, C., 2013. HRS/EHRA/APHRS Expert Consensus Statement on the Diagnosis and Management of Patients with Inherited Primary Arrhythmia SyndromesExpert Consensus Statement on Inherited Primary Arrhythmia Syndromes: Document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* e75–e106.
- Probst, V., Allouis, M., Sacher, F., Pattier, S., Babuty, D., Mabo, P., Mansourati, J., Victor, J., Nguyen, J.-M., Schott, J.-J., Boisseau, P., Escande, D., Le Marec, H., 2006. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17, 270–275.
- Probst, V., Veltmann, C., Eckardt, L., Meregalli, P.G., Gaita, F., Tan, H.L., Babuty, D., Sacher, F., Giustetto, C., Schulze-Bahr, E., Borggrefe, M., Haissaguerre, M., Mabo, P., Le Marec, H., Wolpert, C., Wilde, A.A.M., 2010. Long-term prognosis of patients diagnosed with Brugada syndrome: Results from the FINGER Brugada Syndrome Registry. *Circulation* 121, 635–643.
- Probst, V., Wilde, A.A.M., Barc, J., Sacher, F., Babuty, D., Mabo, P., Mansourati, J., Le Scouarnec, S., Kyndt, F., Le Caignec, C., Guicheney, P., Gouas, L., Albuissou, J., Meregalli, P.G., Le Marec, H., Tan, H.L., Schott, J.-J., 2009. SCN5A Mutations and the Role of Genetic Background in the Pathophysiology of Brugada Syndrome / CLINICAL PERSPECTIVE. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2, 552–557.
- Radicke, S., Cotella, D., Graf, E.M., Ravens, U., Wettwer, E., 2005. Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative beta-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J. Physiol.* 565, 751–756.
- Remme, C.A., Bezzina, C.R., 2010. REVIEW: Sodium Channel (Dys)Function and Cardiac Arrhythmias. *Cardiovasc. Ther.* 28, 287–294.
- Remme, C.A., Scicluna, B.P., Verkerk, A.O., Amin, A.S., van Brunschot, S., Beekman, L., Deneer, V.H.M., Chevalier, C., Oyama, F., Miyazaki, H., Nukina, N., Wilders, R., Escande, D., Houlgatte, R., Wilde, A.A.M., Tan, H.L., Veldkamp, M.W., de Bakker, J.M.T., Bezzina, C.R., 2009. Genetically determined differences in sodium current characteristics modulate conduction disease severity in mice with cardiac sodium channelopathy. *Circ. Res.* 104, 1283–1292.
- Remme, C.A., Verkerk, A.O., Nuyens, D., van Ginneken, A.C.G., van Brunschot, S., Belterman, C.N.W., Wilders, R., van Roon, M.A., Tan, H.L., Wilde, A.A.M., Carmeliet, P., de Bakker, J.M.T., Veldkamp, M.W., Bezzina, C.R., 2006. Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation* 114, 2584–2594.

- Reynet, C., Kahn, C.R., 1993. Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science* 262, 1441–1444.
- Richter, S., Sarkozy, A., Paparella, G., Henkens, S., Boussy, T., Chierchia, G.-B., Brugada, R., Brugada, J., Brugada, P., 2010. Number of electrocardiogram leads displaying the diagnostic coved-type pattern in Brugada syndrome: a diagnostic consensus criterion to be revised. *Eur. Heart J.* 31, 1357–1364.
- Risch, N., Merikangas, K., 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273, 1516–1517.
- Risgaard, B., Jabbari, R., Refsgaard, L., Holst, A., Haunsø, S., Sadjadieh, A., Winkel, B., Olesen, M., Tfelt-Hansen, J., 2013. High prevalence of genetic variants previously associated with Brugada syndrome in new exome data. *Clin. Genet.*
- Riuró, H., Beltran-Alvarez, P., Tarradas, A., Selga, E., Campuzano, O., Vergés, M., Pagans, S., Iglesias, A., Brugada, J., Brugada, P., Vázquez, F.M., Pérez, G.J., Scornik, F.S., Brugada, R., 2013. A missense mutation in the sodium channel $\beta 2$ subunit reveals SCN2B as a new candidate gene for Brugada syndrome. *Hum. Mutat.* 34, 961–966.
- Rivera, A., Fisher, S.A., Fritsche, L.G., Keilhauer, C.N., Lichtner, P., Meitinger, T., Weber, B.H.F., 2005. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3227–3236.
- Rook, M.B., Evers, M.M., Vos, M.A., Bierhuizen, M.F.A., 2012. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc. Res.* 93, 12–23.
- Rowinsky, E.K., McGuire, W.P., Guarnieri, T., Fisherman, J.S., Christian, M.C., Donehower, R.C., 1991. Cardiac disturbances during the administration of taxol. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 9, 1704–1712.
- Ruan, Y., Liu, N., Priori, S.G., 2009. Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat. Rev. Cardiol.* 6, 337–348.
- Ruppersberg, J.P., Schröter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S., Pongs, O., 1990. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 345, 535–537.
- Scicluna, B.P., Tanck, M.W.T., Remme, C.A., Beekman, L., Coronel, R., Wilde, A.A.M., Bezzina, C.R., 2011. Quantitative trait loci for electrocardiographic parameters and arrhythmia in the mouse. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 380–389.
- Scriven, D.R., Dan, P., Moore, E.D., 2000. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* 79, 2682–2691.
- Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C.R., Anderson, A.E., Schrader, L.A., Doliveira, L.C., Carroll, K.I., Sweatt, J.D., Rhodes, K.J., Trimmer, J.S., 2003. A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J. Biol. Chem.* 278, 36445–36454.
- Shimoni, Y., Ewart, H.S., Severson, D., 1999. Insulin stimulation of rat ventricular K⁺ currents depends on the integrity of the cytoskeleton. *J. Physiol.* 514 (Pt 3), 735–745.
- Smits, J.P.P., Eckardt, L., Probst, V., Bezzina, C.R., Schott, J.J., Remme, C.A., Haverkamp, W., Breithardt, G., Escande, D., Schulze-Bahr, E., LeMarec, H., Wilde, A.A.M., 2002. Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 350–356.
- Snyders, D.J., 1999. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* 42, 377–390.
- Sotoodehnia, N., Isaacs, A., de Bakker, P.I.W., Dörr, M., Newton-Cheh, C., Nolte, I.M., van der Harst, P., Müller, M., Eijgelsheim, M., Alonso, A., Hicks, A.A., Padmanabhan, S., Hayward, C., Smith, A.V., Polasek, O., Giovannone, S., Fu, J., Magnani, J.W., Marcianti, K.D., Pfeufer, A., Gharib, S.A., Teumer, A., Li, M., Bis, J.C., Rivadeneira, F., Aspelund,

- T., Köttgen, A., Johnson, T., Rice, K., Sie, M.P.S., Wang, Y.A., Klopp, N., Fuchsberger, C., Wild, S.H., Mateo Leach, I., Estrada, K., Völker, U., Wright, A.F., Asselbergs, F.W., Qu, J., Chakravarti, A., Sinner, M.F., Kors, J.A., Petersmann, A., Harris, T.B., Soliman, E.Z., Munroe, P.B., Psaty, B.M., Oostra, B.A., Cupples, L.A., Perz, S., de Boer, R.A., Uitterlinden, A.G., Völzke, H., Spector, T.D., Liu, F.-Y., Boerwinkle, E., Dominiczak, A.F., Rotter, J.I., van Herpen, G., Levy, D., Wichmann, H.-E., van Gilst, W.H., Witteman, J.C.M., Kroemer, H.K., Kao, W.H.L., Heckbert, S.R., Meitinger, T., Hofman, A., Campbell, H., Folsom, A.R., van Veldhuisen, D.J., Schwienbacher, C., O'Donnell, C.J., Volpato, C.B., Caulfield, M.J., Connell, J.M., Launer, L., Lu, X., Franke, L., Fehrmann, R.S.N., te Meerman, G., Groen, H.J.M., Weersma, R.K., van den Berg, L.H., Wijmenga, C., Ophoff, R.A., Navis, G., Rudan, I., Snieder, H., Wilson, J.F., Pramstaller, P.P., Siscovick, D.S., Wang, T.J., Gudnason, V., van Duijn, C.M., Felix, S.B., Fishman, G.I., Jamshidi, Y., Stricker, B.H.C., Samani, N.J., Kääb, S., Arking, D.E., 2010. Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nat. Genet.* 42, 1068–1076.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takehara, N., Makita, N., Kawabe, J., Sato, N., Kawamura, Y., Kitabatake, A., Kikuchi, K., 2004. A cardiac sodium channel mutation identified in Brugada syndrome associated with atrial standstill. *J. Intern. Med.* 255, 137–142.
- Tester, D.J., Ackerman, M.J., 2007. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 240–246.
- Ueda, K., Nakamura, K., Hayashi, T., Inagaki, N., Takahashi, M., Arimura, T., Morita, H., Higashiuesato, Y., Hirano, Y., Yasunami, M., Takishita, S., Yamashina, A., Ohe, T., Sunamori, M., Hiraoka, M., Kimura, A., 2004. Functional Characterization of a Trafficking-defective HCN4 Mutation, D553N, Associated with Cardiac Arrhythmia. *J. Biol. Chem.* 279, 27194–27198.
- Vacher, H., Yang, J.-W., Cerda, O., Autillo-Touati, A., Dargent, B., Trimmer, J.S., 2011. Cdk-mediated phosphorylation of the Kv β 2 auxiliary subunit regulates Kv1 channel axonal targeting. *J. Cell Biol.* 192, 813–824.
- Van den Boogaard, M., Wong, L.Y.E., Tessadori, F., Bakker, M.L., Dreizehnter, L.K., Wakker, V., Bezzina, C.R., 't Hoen, P.A.C., Bakkers, J., Barnett, P., Christoffels, V.M., 2012. Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer. *J. Clin. Invest.* 122, 2519–2530.
- Van Veen, T.A.B., Stein, M., Royer, A., Le Quang, K., Charpentier, F., Colledge, W.H., Huang, C.L.-H., Wilders, R., Grace, A.A., Escande, D., de Bakker, J.M.T., van Rijen, H.V.M., 2005. Impaired Impulse Propagation in Scn5a-Knockout Mice: Combined Contribution of Excitability, Connexin Expression, and Tissue Architecture in Relation to Aging. *Circulation* 112, 1927–1935.
- Vanscoy, L.L., Blackman, S.M., Collaco, J.M., Bowers, A., Lai, T., Naughton, K., Algire, M., McWilliams, R., Beck, S., Hoover-Fong, J., Hamosh, A., Cutler, D., Cutting, G.R., 2007. Heritability of Lung Disease Severity in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 1036–1043.
- Verkerk, A.O., Remme, C.A., Schumacher, C.A., Scicluna, B.P., Wolswinkel, R., de Jonge, B., Bezzina, C.R., Veldkamp, M.W., 2012. Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ. Res.* 111, 333–343.
- Wang, D.W., Desai, R.R., Crotti, L., Arnestad, M., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Rognum, T., Schwartz, P.J., George, A.L., Jr, 2007. Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115, 368–376.

- Wang, G., Zhu, X., Xie, W., Han, P., Li, K., Sun, Z., Wang, Y., Chen, C., Song, R., Cao, C., Zhang, J., Wu, C., Liu, J., Cheng, H., 2010. Rad As a Novel Regulator of Excitation–Contraction Coupling and β -Adrenergic Signaling in Heart. *Circ. Res.* 106, 317–327.
- Wang, Q., Li, Z., Shen, J., Keating, M.T., 1996. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* 34, 9–16.
- Watanabe, H., Koopmann, T.T., Le Scouarnec, S., Yang, T., Ingram, C.R., Schott, J.-J., Demolombe, S., Probst, V., Anselme, F., Escande, D., Wiesfeld, A.C.P., Pfeufer, A., Kääh, S., Wichmann, H.-E., Hasdemir, C., Aizawa, Y., Wilde, A.A.M., Roden, D.M., Bezzina, C.R., 2008. Sodium channel β 1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J. Clin. Invest.* 118, 2260–2268.
- Watanabe, H., Minamino, T., 2013. Role of mutations in L-type calcium channel genes in Brugada syndrome, early repolarization syndrome, and idiopathic ventricular fibrillation associated with right bundle branch block. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 77, 1689–1690.
- Watanabe, H., Yang, T., Stroud, D.M., Lowe, J.S., Harris, L., Attack, T.C., Wang, D.W., Hipkens, S.B., Leake, B., Hall, L., Kupersmidt, S., Chopra, N., Magnuson, M.A., Tanabe, N., Knollmann, B.C., George, A.L., Jr, Roden, D.M., 2011. Striking In vivo phenotype of a disease-associated human SCN5A mutation producing minimal changes in vitro. *Circulation* 124, 1001–1011.
- Wettwer, E., Amos, G.J., Posival, H., Ravens, U., 1994. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ. Res.* 75, 473–482.
- Wilde, A.A.M., Postema, P.G., Di Diego, J.M., Viskin, S., Morita, H., Fish, J.M., Antzelevitch, C., 2010. The pathophysiological mechanism underlying Brugada syndrome: depolarization versus repolarization. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 543–553.
- Wu, J., Shimizu, W., Ding, W.-G., Ohno, S., Toyoda, F., Itoh, H., Zang, W.-J., Miyamoto, Y., Kamakura, S., Matsuura, H., Nademanee, K., Brugada, J., Brugada, P., Brugada, R., Vatta, M., Towbin, J.A., Antzelevitch, C., Horie, M., 2010. KCNE2 modulation of Kv4.3 current and its potential role in fatal rhythm disorders. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 7, 199–205.
- Xu, Z., Patel, K.P., Lou, M.F., Rozanski, G.J., 2002. Up-regulation of K(+) channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovasc. Res.* 53, 80–88.
- Yada, H., Murata, Mitsushige, Shimoda, K., Yuasa, S., Kawaguchi, H., Ieda, M., Adachi, T., Murata, Mitsuru, Ogawa, S., Fukuda, K., 2007. Dominant Negative Suppression of Rad Leads to QT Prolongation and Causes Ventricular Arrhythmias via Modulation of L-type Ca^{2+} Channels in the Heart. *Circ. Res.* 101, 69–77.
- Yan, G.X., Antzelevitch, C., 1999a. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* 100, 1660–1666.
- Yan, G.X., Antzelevitch, C., 1999b. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* 100, 1660–1666.
- Yang, E.K., Alvira, M.R., Levitan, E.S., Takimoto, K., 2001a. Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J. Biol. Chem.* 276, 4839–4844.
- Yang, E.K., Alvira, M.R., Levitan, E.S., Takimoto, K., 2001b. Kvbeta subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J. Biol. Chem.* 276, 4839–4844.
- Yang, X., Salas, P.J.I., Pham, T.V., Wasserlauf, B.J., Smets, M.J.D., Myerburg, R.J., Gelband, H., Hoffman, B.F., Bassett, A.L., 2002. Cytoskeletal actin microfilaments and the transient outward potassium current in hypertrophied rat ventriculocytes. *J. Physiol.* 541, 411–421.
- Yokokawa, M., Noda, T., Okamura, H., Satomi, K., Suyama, K., Kurita, T., Aihara, N., Kamakura, S., Shimizu, W., 2007. Comparison of long-term follow-up of

- electrocardiographic features in Brugada syndrome between the SCN5A-positive probands and the SCN5A-negative probands. *Am. J. Cardiol.* 100, 649–655.
- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., DiStefano, P.S., Catterall, W.A., Scheuer, T., Curtis, R., 2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 7577–7585.
- Zhang, J., Klos, M., Wilson, G.F., Herman, A.M., Lian, X., Raval, K.K., Barron, M.R., Hou, L., Soerens, A.G., Yu, J., Palecek, S.P., Lyons, G.E., Thomson, J.A., Herron, T.J., Jalife, J., Kamp, T.J., 2012. Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ. Res.* 111, 1125–1136.
- Zhang, Ji, Chang, L., Chen, C., Zhang, M., Luo, Y., Hamblin, M., Villacorta, L., Xiong, J.-W., Chen, Y.E., Zhang, Jifeng, Zhu, X., 2011. Rad GTPase inhibits cardiac fibrosis through connective tissue growth factor. *Cardiovasc. Res.* 91, 90–98.
- Zheng, Z.-J., Croft, J.B., Giles, W.H., Mensah, G.A., 2001. Sudden Cardiac Death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation* 104, 2158–2163.
- Zhu, X.R., Wulf, A., Schwarz, M., Isbrandt, D., Pongs, O., 1999. Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage-sensitive K⁺ current. *Receptors Channels* 6, 387–400.

RESUMÉ

Variations génétiques et syndrome de Brugada

Le but de ce projet de recherche est d'identifier de nouveaux gènes responsables du syndrome de Brugada (SBr), une maladie rare définie par un aspect électrocardiographique spécifique, associé à un risque élevé de mort subite par fibrillation ventriculaire sur cœur structurellement normal. Le SBr a été associé à des mutations ponctuelles du gène *SCN5A* codant pour la protéine Nav1.5, responsable de la phase 0 du potentiel d'action cardiaque. Cependant, seulement 20 à 30% des patients atteints du syndrome de Brugada sont porteurs de mutations de *SCN5A* : d'autres gènes responsables de ce syndrome restent encore à découvrir.

Afin d'identifier ces autres gènes, nous avons appliqué trois stratégies complémentaires, basées sur des technologies de criblage génomique à haut débit. La première approche a été l'utilisation d'un système de capture et d'enrichissement des régions codantes de gènes candidats, suivi d'un séquençage haut débit, de manière à identifier un enrichissement en variants rares chez les patients par rapport à une population contrôle. La seconde approche a consisté à coupler CGH-array, analyse d'identité par descendance et séquençage d'exome sur des formes familiales de BrS. Enfin, nous avons réalisé une étude d'association sur génome entier qui a permis d'identifier des polymorphismes génétiques associés à un risque accru de SBr.

ABSTRACT

Genetic variation and Brugada syndrome

The aim of this project is to identify new genes involved in the Brugada syndrome (BrS), a rare disease characterized by a specific ECG pattern and associated with a high risk of sudden cardiac death due to ventricular fibrillation on structurally normal heart. The BrS has been previously associated to mutations in the *SCN5A* gene, encoding the Nav1.5 protein that is responsible for the phase 0 of the action potential in human cardiomyocytes. However, only 20 to 30% of the patients with BrS carry a mutation in this gene: other genes responsible for this disorder remain unknown.

In this project, in order to identify these others genes, we have applied three complementary approaches based on high throughput genetic technologies. The first strategy consists in using a targeted and enrichment system of the coding region of candidate genes followed by massively parallel sequencing, in order to identify enrichments in rare variants for candidate genes in patients compared to control individuals. The second strategy is a systematic approach combining CGH-array, Identity-by-Descent analysis and Exome sequencing in familial forms of BrS. At last, we have performed a genome wide association study, in which we have identified genetic polymorphisms associated with a higher risk of BrS.