

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

## **GENETIQUE**

# **DES TROUBLES DE LA REPOLARISATION VENTRICULAIRE : NOUVEAUX CONCEPTS**

### **THESE DE DOCTORAT**

Ecole doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Génétique moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

**BARC Julien**

Le 14 octobre 2009, devant le jury ci-dessous

- Président M. Hervé LE MAREC, Praticien Hospitalier, Professeur des Universités,  
Nantes, France
- Rapporteurs M. Hugues ABRIEL, Professeur des Universités, Bern, Suisse  
M. Patrice BOUVAGNET, Praticien Hospitalier, Maître de Conférences des  
Universités, Lyon 1, France
- Examineurs M. Michel GOOSSENS, Praticien Hospitalier, Professeur des  
Universités, Paris, France  
M. Frédéric SACHER, Praticien Hospitalier, Bordeaux, France
- Directeur de thèse M. Jean-Jacques SCHOTT, Directeur de Recherche INSERM,  
Nantes, France
- Co-directeur de thèse M. Cédric LE CAIGNEC, Praticien Hospitalier, Maître de  
Conférences des Universités, Nantes, France

# Table des matières

<b>Table des illustrations</b>	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>10</b>
<b>Table des publications</b>	<b>12</b>
<b>AVANT PROPOS</b>	<b>12</b>
<b>A- INTRODUCTION</b>	<b>14</b>
<b>I. Hérité et génétique</b>	<b>15</b>
I.1 Modèles génétiques : du modèle monogénique au modèle polygénique	15
I.2 Stratégie pour la découverte de variants à effet faible : l'étude d'association	19
I.3 Limites des études d'associations et perspectives	20
<b>II. Repolarisation ventriculaire et mort subite</b>	<b>22</b>
<b>III. Génétique des troubles du rythme cardiaque primaires</b>	<b>25</b>
III.1 Génétique du syndrome de Brugada	25
III.1.1 Description électrocardiographique du syndrome de Brugada	25
III.1.2 Epidémiologie	27
III.1.3 Symptomatologie	28
III.1.4 Propriétés structurales cardiaques	28
III.1.5 Diagnostic différentiel	28
III.1.6 Bases moléculaires du syndrome de Brugada	31
III.1.7 Relation génotype/phénotype	33
III.1.8 Compréhension électrophysiopathologique	33
III.1.9 Stratification du risque	35
III.1.10 Traitement et prise en charge	35
III.2 Génétique du syndrome du QT long congénital	37
III.2.1 Epidémiologie et diagnostic du syndrome du QT long congénital	38
III.2.2 Hétérogénéité génétique du syndrome du QT long congénital	38
III.2.2.1 Les syndromes du QT long de type 1 et 5 : perte de fonction du courant $I_{ks}$	41
III.2.2.2 Les syndromes du QT long 2 et 6 : perte de fonction du courant $I_{kr}$	42
III.2.2.3 Les syndromes du QT long de type 3, 9, 10 et 12 : gain de fonction du courant $I_{Na}$	42
III.2.2.4 Le syndrome du QT long de type 4	44
III.2.2.5 Le syndrome du QT long de type 7 : perte de fonction du courant $I_{k1}$	44
III.2.2.6 Le syndrome du QT long de type 8 : gain de fonction du courant $I_{Ca,L}$	45
III.2.2.7 Diagnostic moléculaire négatif pour 25% des patients atteints par le SQT: hypothèses	45
III.2.3 Relation génotype/phénotype	46
III.2.4 Stratification du risque	47

III.3	Génétique du syndrome du QT court congénital	49
III.3.1	Epidémiologie et diagnostic du syndrome du QT long congénital	49
III.3.2	Hétérogénéité génétique du syndrome du QT court congénital :	50
III.3.3	Traitement	51
III.3.4	Syndrome du QT court acquis	51
III.4	Les syndromes chevauchants	52
	<b>Objectifs de la thèse</b>	<b>55</b>
	<b>B- RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	<b>56</b>
	<b>I. Projet 1 : syndrome de Brugada : un nouveau modèle génétique ?</b>	<b>58</b>
I.1	Projet 1a - Mutations dans le gène <i>SCN5A</i> et rôle du fond génétique dans la physiopathologie du syndrome de Brugada	60
I.1.1	Article 1 : objectifs	60
I.1.2	Article 1 : Principaux résultats et discussion	62
I.2	Projet 1b – Elucidation de la cause moléculaire d'une famille atteinte par le SBr où une mutation du gène <i>SCN5A</i> ne ségrége pas	63
I.2.1	Recrutement et étude clinique de la famille P	63
I.2.2	Etude génotype/phénotypique <i>SCN5A</i> -Q1695X/SBr de la famille P	66
I.2.3	Variant dans le gène <i>CACNA1C</i> codant pour le canal calcique voltage dépendant $Ca_v1.2$	67
I.2.4	Etude génotype/phénotype des variants <i>SCN5A</i> -p.Q1695X et <i>CACNA1C</i> -p.N300D	69
I.2.5	Discussion du projet 1b	70
I.3	Projet 1c – Identification d'un nouveau locus pour le SBr	72
I.3.1	Recrutement et étude clinique d'une grande famille de syndrome de Brugada	72
I.3.2	Séquençage direct des gènes candidats du syndrome de Brugada	75
I.3.3	Analyse de liaison pangénomique	76
I.3.4	Recherche du variant morbide dans les gènes du locus 3p22.3-p25.3	78
I.3.5	Génotypage de 10 familles non mutées pour le gène <i>SCN5A</i> pour le locus 3p22.3-p25.3	79
I.3.6	Discussion du projet 1c	81
I.4	Discussion générale du projet 1	83
	<b>II. Projet 2 : Recherche de variation du nombre de copies dans les gènes impliqués dans le syndrome du QT long: implication clinique</b>	<b>86</b>
II.1	Article 2 : objectifs	86
II.2	Article 2 : principaux résultats et discussion	89
	<b>III. Projet 3 : la génétique du syndrome du QT court : nouveau mécanisme</b>	<b>92</b>
III.1	Objectifs	92
III.2	Confrontation des résultats	93
III.3	Description clinique de la famille G	93
III.4	Nouvelles bases moléculaires pour le SQTc	94
III.4.1	Mutations dans le gène <i>SLC22A5</i> codant le transporteur de la carnitine OCTN2	94
III.4.2	Variants dans le gène <i>CACNA1C</i> codant le canal calcique voltage dépendant $Ca_v1.2$	94

III.4.3 Etude fonctionnelle du variant $Ca_v1.2$ p.A223P en système d'expression hétérologue de mammifère (HEK tsA-201)	96
III.4.3.1 Effet du variant A253P sur le courant $I_{Ca,L}$	96
III.4.3.2 Effet de la mutation A253P sur l'expression de $Ca_v1.2$	99
III.4.3.3 Effet de la mutation p.A253P sur l'expression membranaire de $Ca_v1.2$	100
III.5 Discussion du projet 3	102
<b>C- DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION</b>	<b>105</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>108</b>
<b>I. Annexe 1 : physiologie cardiaque</b>	<b>109</b>
I.1 Anatomie et fonctionnement du cœur	109
I.2 Cycle cardiaque et cardiomyocytes	109
I.3 L'activité électrique cardiaque	110
I.3.1 Au niveau cellulaire : potentiel d'action, canaux, et courants ioniques	110
I.3.2 L'électrocardiogramme de surface	113
<b>II. Annexe 2 : matériel et méthodes</b>	<b>116</b>
II.1 Protocole de détection de réarrangements génomiques	116
II.2 Patch clamp	118
II.2.1 Solutions	118
II.2.2 Mesures de l'amplitude et des cinétiques du courant $I_{Ca,L}$	119
II.2.3 Courbe d'activation	119
II.2.4 Courbe d'inactivation	120
II.2.5 Statistiques	120
II.3 Western blot	121
II.4 Immunomarquages	121
II.5 Biotinylation des protéines membranaires	122
<b>III. Annexe 3 : autres projets</b>	<b>124</b>
III.1 Un nouveau locus d'hyperkaliémie familiale	124
III.2 Mutation of cardiac $Na_v1.5$ in a novel autosomal dominant cardiac arrhythmia of hisian type and associated with dilated cardiomyopathy	125
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>126</b>

## Table des illustrations

### Liste des figures

Figure 1 – Incidence de la mort subite cardiaque aux États-Unis au travers de différents groupes à risque (gauche) et le nombre de morts subites cardiaques dans ces différents groupes (droite)	12
Figure 2 – Accélération de la découverte de gènes morbides entre 1981 et 2002	16
Figure 3 – Représentation des principaux courants ioniques responsables des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains et des canaux ioniques associés	22
Figure 4 – Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire	23
Figure 5 – Electrocardiogramme d'un des 8 patients de la première publication décrivant les caractéristiques cliniques du syndrome de Brugada	25
Figure 6 – Représentation des trois types d'ECG, type I, II et III observés dans le syndrome de Brugada	26
Figure 7 – ECG montrant l'action « démasquante » des antiarythmiques de classe Ic : l'ajmaline et la flécaïnide dans le syndrome de Brugada	27
Figure 8 – Hypothèses sur la modification des PA dans le ventricule droit, expliquant la manifestation du syndrome de repolarisation précoce bénin et du SBr à l'ECG	34
Figure 9 – Schéma représentant un potentiel d'action ventriculaire et un tracé ECG dans une situation normale (à gauche) et chez un patient atteint d'un SQTL (à droite)	37
Figure 10 – Dessin représentant la douzaine de gènes associés au 12 formes de syndrome du QT long (SQTL1-12)	40
Figure 11 – Mécanismes ioniques de la prolongation de l'intervalle QT des formes 1 à 12	40
Figure 12 – ECG caractéristiques du syndrome du QT long	41
Figure 13 – Stratification du risque parmi les patients atteints d'un syndrome du QT long selon leur génotype et le sexe	48
Figure 14 – ECG caractéristiques du syndrome du QT court	49
Figure 15 – Potentiel d'action ventriculaire chez un sujet sain et atteint d'un SQTC	51
Figure 16 – Diagramme de Venn représentant le phénotype de 41 patients porteurs de la mutation SCN5A-E1784K	52

Figure 17 – Diagramme de Venn représentant le caractère chevauchant du phénotype des patients porteurs de la mutation <i>SCN5A</i> - 1795insD	53
Figure 18 – Représentation schématique de $Na_v1.5$ et de la répartition des mutations associées à leur phénotype	53
Figure 19 – Electrocardiogramme du propositus de la famille P montrant une tachycardie ventriculaire monomorphe	63
Figure 20 – Electrocardiogrammes de base et au cours d'un test à l'ajmaline, des individus II.1, II.4, II.5, III.2, III.3, III.4 et III.5 de la famille P	64
Figure 21 – Arbre généalogique et caractéristiques cliniques de la famille P	64
Figure 22 – Electrophorégramme de la séquence d'un individu contrôle (gauche) et du propositus de la famille P muté pour le gène <i>SCN5A</i> : <i>p.Q1695X</i> (droite)	66
Figure 23 – Représentation schématique de la sous unité $\alpha$ du canal sodique $Na_v1.5$ et de la mutation non-sens <i>p.Q1695X</i>	66
Figure 24 – Arbre généalogique de la famille P : ségrégation de la mutation <i>SCN5A p.Q1695X</i>	67
Figure 25 – Electrophorégramme de la séquence d'un individu contrôle (gauche) et de l'individu III.4 de la famille P muté pour le gène <i>CACNA1C</i> : <i>p.N300D</i> (droite)	68
Figure 26 – A Représentation schématique du canal calcique $Ca_v1.2$ et du variant faux-sens <i>p.N300D</i> . B Conservation de l'acide aminé asparagine (N) en position 300 du gène <i>CACNA1C</i> (NP_000710) au travers des espèces de mammifères	68
Figure 27 – Arbre généalogique de la famille P : Ségrégation des mutations des gènes <i>SCN5A p.Q1695X</i> et <i>CACNA1C p.N300D</i> dans la famille P.	69
Figure 28 – Electrocardiogrammes de base, au 3 <sup>ème</sup> espace intercostal et au cours d'un test à la flécaïnide A du premier propositus et B du deuxième propositus de la famille C	73
Figure 29 – Arbre généalogique de la famille C	74
Figure 30 – Electrocardiogramme des individus II.14 et IV.1 de la famille C montrant un aspect de SBr de type 1 au cours d'un test provocatif à la flécaïnide	76
Figure 31 – Arbre généalogique de la famille C (haut) montrant un haplotype commun aux individus atteints en 3p22.3-p25.3. Représentation graphique du Lod Score (bas) multipoints obtenu $Z(\max)= 3,31$ à 0% de recombinaison et à une pénétrance de 100% (GeneHunter)	77

Figure 32 – Représentation graphique du résultat de la puce Custom HD-CGH Microarrays 2 x 105K interrogeant la région du gène GPD1L du propositus de la famille C en « dye-swap »	79
Figure 33 – Arbres généalogiques montrant 4 familles compatibles avec le locus 3p22.3-p25.3	80
Figure 34 – Arbre généalogique de la famille G (haut) et électrocardiogrammes du propositus (III1) et de sa mère (II2) (bas)	93
Figure 35 – Arbre généalogique montrant le statut phénotypique des individus de la famille G et la ségrégation des mutations du gène <i>SLC22A5</i> codant le transporteur OCTN2	94
Figure 36 – Electrophorégramme de la séquence d'un individu contrôle (gauche) et du propositus de la famille G muté pour le gène <i>CACNA1C</i> : <i>p.A223P</i> (droite)	95
Figure 37 – A Représentation schématique du canal calcique $Ca_v1.2$ et du variant faux-sens <i>p.A223P</i> . B Conservation de l'acide aminé alanine (A) en position 223 du gène <i>CACNA1C</i> (NM_000719) au travers des espèces de mammifères	95
Figure 38 – Arbre généalogique montrant le statut phénotypique des individus de la famille G, la ségrégation des mutations du gène <i>SLC22A5</i> codant le transporteur OCTN2 et du variant $Ca_v1.2$ <i>p.A223P</i>	96
Figure 39 – Effets de la mutation A253P sur les caractéristiques biophysiques du courant $I_{Ca,L}$	97
Figure 40 – Effet de la mutation A253P sur la sensibilité au potentiel d' $I_{Ca,L}$	98
Figure 41 – Courbe de disponibilité des canaux $Ca_v1.2$ dans les 2 conditions, WT n=7, A253P n=6	99
Figure 42 – Estimation de l'expression des protéines $Ca_v1.2$ WT et mutées A253P par la technique de Western blot. La bande à 250 kDa correspond à $Ca_v1.2$ , la bande à 50 kDa à la $\beta$ -tubuline	100
Figure 43 – Immunomarquages intracellulaires de la protéine $Ca_v1.2$ WT (gauche), mutée A253P (centre) et contrôle sur cellules non transfectées (droite)	100
Figure 44 – Estimation de l'expression membranaire des protéines $Ca_v1.2$ WT et mutées A253P par la technique de biotinylation des protéines de surface cellulaire	101
Figure 45 – Le cœur et le tissu de conduction	109
Figure 46 – Représentation des principaux courants ioniques responsables des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains et des canaux ioniques associés	111
Figure 47 – Potentiels d'action épiqueardique et endocardique chez l'homme	112
Figure 48 – Représentation d'un potentiel d'action myocardique et d'une post-dépolarisation précoce et retardée	112

Figure 49 – L'ECG, manifestation du fonctionnement électrique du cœur	113
Figure 50 – Principaux paramètres de l'ECG	114
Figure 51 – Principe de la détection de réarrangements génomiques par CGH- <i>array</i>	116
Figure 52 – Schéma d'une installation de patch clamp (A) et de la configuration cellule entière (B)	118
Figure 53 – Séquence de stimulation et courant résultant	119
Figure 54 – Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'activation	119
Figure 55 – Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'inactivation	120
Figure 56 – Technique de marquage des protéines de surface	123



## Liste des tableaux

Tableau 1 – Caractéristiques électrocardiographiques des ECG de type I, II et III du syndrome de Brugada	26
Tableau 2 – Comparatif clinique, génétique et pharmacologique du syndrome de repolarisation précoce, du syndrome de Brugada et de la dysplasie arythmogène du ventricule droit	30
Tableau 3 – Gènes identifiés dans le syndrome de Brugada	32
Tableau 4 – Gènes identifiés dans le syndrome du QT long congénital (SQTL)	39
Tableau 5 – Prévalence des mutations dans les gènes du SBr2-7 parmi les propositus de Nantes	59
Tableau 6 – Caractéristiques cliniques et moléculaires de la famille P	65
Tableau 7 – Caractéristiques cliniques de la famille C	75
Tableau 8 – Listes des 117 gènes candidats aux arythmies cardiaques densifiés en oligonucléotides sur la puce à façon HD-CGH Microarrays 2 x 105K	78

## Liste des abréviations

Acq	<b>Acquis</b>
AMPc	<b>Ad</b> éno <b>sine MonoPhosphate cyclique</b>
AD	<b>Autosomique Dominant</b>
AR	<b>Autosomique Récessif</b>
CGH	<b>Comparative Genomic Hybridization</b> (Hybridation génomique comparative)
cM	<b>centiMorgan</b>
CNV	<b>Copy Number Variation</b> (Variation de nombre de copies)
DAVD	<b>Dysplasie Arythmogène du Ventricule Droit</b>
dHPLC	<b>denaturing High Performance Liquid Chromatography</b> (Chromatographie liquide à haute pression en condition dénaturante)
ECG	<b>Electrocardiogramme</b>
FV	<b>Fibrillation Ventriculaire</b>
Gb	<b>Gigabases</b>
Hap Map	<b>Haplotype Map</b> (carte des haplotypes)
JLN	<b>Jervell et Lange-Nielsen</b>
Kb	<b>Kilobases</b>
Mb	<b>Mégabases</b>
OMIM <sup>®</sup>	<b>Online Mendelian Inheritance in Man<sup>®</sup></b> (Maladie héréditaire mendélienne humaine en ligne)
PA	<b>Potentiel d'Action</b>
pb	<b>paire de bases</b>
PCR	<b>Polymerase Chain Reaction</b> (Réaction de polymérisation en chaîne)
RFLP	<b>Restriction Fragment Length Polymorphism</b> (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
SBr	<b>Syndrome de Brugada</b>
SNP	<b>Single Nucleotide Polymorphism</b> (Polymorphisme d'un nucléotide unique)
Sp	<b>Sporadique</b>
SQTC	<b>Syndrome du QT Court</b>
SQTL	<b>Syndrome du QT Long</b>
SRP	<b>Syndrome de Repolarisation Précoce</b>
TdP	<b>Torsade de Pointes</b>
TV	<b>Tachycardie Ventriculaire</b>
UTR	<b>Untranslated Region</b> (Région non traduite)
WT	<b>Wild Type</b> (Type sauvage)



## Table des publications

### Article 1

Vincent Probst\*, MD, PhD <sup>1,2,3,4</sup>, Arthur A.M. Wilde\*, MD, PhD <sup>5</sup>, Julien Barc, MS <sup>1,2,3</sup>, Frederic Sacher, MD <sup>6</sup>, Dominique Babuty, MD <sup>7</sup>, Philippe Mabo, MD <sup>8</sup>, Jacques Mansourati, MD <sup>9</sup>, Solena Le Scouarnec, PhD <sup>1,2,3</sup>, Florence Kyndt, PharmD, PhD <sup>1,2,3,10</sup>, Cedric Le Caignec, MD, PhD <sup>10</sup>, Pascale Guicheney, PhD <sup>11</sup>, Laetitia Gouas, PhD<sup>11</sup>, Juliette Albuissou, MD <sup>10</sup>, Paola G. Meregalli, MD,<sup>5</sup> Hervé Le Marec, MD, PhD <sup>1,2,3,4</sup>, Hanno L. Tan, MD, PhD <sup>5</sup>, and Jean-Jacques Schott, PhD <sup>1,2,3,4</sup>

**SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome.**

Sous presse à *Circulation: Cardiovascular Genetics*

Page 61

### Article 2

Julien Barc\*, MS<sup>1,2,3</sup>; François Briec\*, MD<sup>1,2,3,4</sup>; Sébastien Schmitt\*, MD <sup>5</sup>; Florence Kyndt, PharmD, PhD<sup>1,2,3,5</sup>; Martine Le Cunff, BS<sup>1,2,3</sup>; Estelle Baron, BS<sup>1,2,3</sup>; Claude Vieyres, MD<sup>6</sup>; Frederic Sacher, MD<sup>7</sup>; Richard Redon, PhD <sup>1,2,3</sup>; Cédric Le Caignec, MD, PhD<sup>1,2,3,5</sup>; Hervé Le Marec, MD, PhD<sup>1,2,3,4</sup>; Vincent Probst, MD, PhD<sup>1,2,3,4</sup>; Jean-Jacques Schott, PhD<sup>1,2,3,4</sup>

**Screening for copy number variation in genes associated with the Long QT Syndrome: clinical relevance**

Soumis à *Circulation: Cardiovascular Genetics*

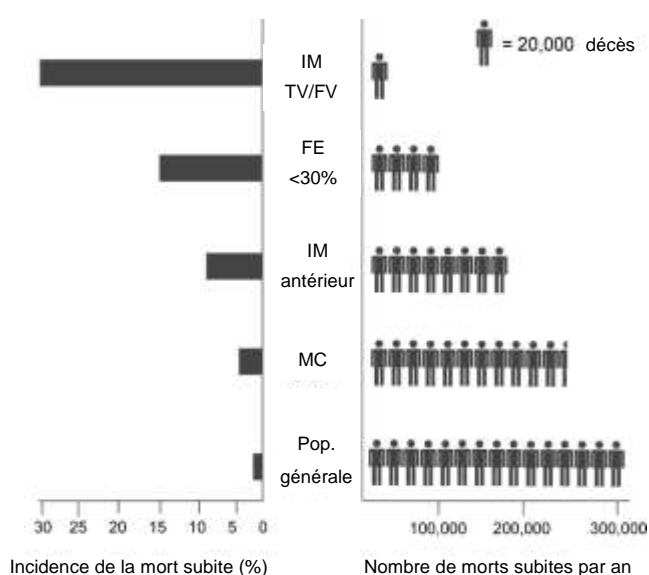
\*contribution équivalente

Page 88



## AVANT PROPOS

La mort subite d'origine cardiaque représente environ un million de décès annuels aux États-Unis et en Europe (40.000 en France). La fibrillation ventriculaire en est le mécanisme le plus fréquent [Zheng *et al.* 2001; Jouven *et Escande* 2006; Goldberger *et al.* 2008]. En raison de l'importance du problème en terme de santé publique, les possibilités d'obtenir un impact réel sont considérables : des améliorations mineures (10-20%) dans la détection du risque pourraient réduire le nombre de victimes de 100.000 ou plus. Le prochain défi sera donc de découvrir les marqueurs de la mort subite cardiaque dans la population générale (Figure 1).



**Figure 1 – Incidence de la mort subite cardiaque aux États-Unis au travers de différents groupes à risque (gauche) et le nombre de morts subites cardiaques dans ces différents groupes (droite)**

*Un plus grand nombre de morts subites est observé dans les groupes où le risque est faible, comparativement peu de cas surviennent dans les groupes à haut risque de morts subites du type infarctus du myocarde associé à des TV ou FV. IM : Infarctus du Myocarde, TV : Tachycardie Ventriculaire, FV : Fibrillation Ventriculaire, FE ; Fraction d'Ejection, MC : Maladie des Coronaires, Pop, Population. Modifié d'après [Myerburg 1997]*

Notre laboratoire, créé par le professeur Denis Escande en 1996, contribue à ces améliorations par la découverte de nouvelles bases moléculaires et voies de signalisation dans le domaine cardio-vasculaire. L'institut du thorax fondé en 2004 vise à consolider les relations entre les cliniciens et les scientifiques. Un des objectifs de cette interaction entre cardiologues, généticiens et physiologistes est la découverte des bases moléculaires de l'activité électrique cardiaque normale et anormale. En effet l'identification de mutations conduisant à des troubles du rythme cardiaque à risque de mort subite est l'un des vecteurs de compréhension de la physiologie cardiaque. L'unité Inserm 915 rassemble également les expertises de génomique des canaux ioniques, de physiologie moléculaire et cellulaire et des animaux transgéniques indispensable à une vision intégrée de la physiologie et de la physiopathologie cardiaque.

Notre hypothèse centrale est que le risque d'arythmie fatale est modulé par des variants génétiques dans des voies importantes de régulation de l'activité électrique cardiaque. Les canalopathies cardiaques forment un groupe de maladies génétiques rares affectant les propriétés électriques normales des cellules cardiaques. Cet ensemble inclut le syndrome du QT long congénital, le syndrome du QT court congénital, le syndrome de Brugada, la forme héréditaire de la maladie de Lenègre (ou maladie de Lev), les formes héréditaires de dysfonction sinusale, la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique et les formes familiales de fibrillation auriculaire.

Ces pathologies génétiques essentiellement de type dominant sont, par définition, liées à une altération dans un gène unique. Il est communément admis par les cliniciens et les généticiens que l'expressivité de ces pathologies liées à ces gènes uniques est extrêmement variable, allant de la non pénétrance à des formes cliniques extrêmement sévères. Par conséquent, des variations dans un gène majeur sont nécessaires, mais pas suffisantes pour développer une maladie et d'autres facteurs restent à être identifiés. Ces facteurs peuvent être d'origine endogène (gène à effet mineur) ou exogène (environnement, mode de vie, alimentation, etc.). L'identification de ces modulateurs implique une évolution conceptuelle des modèles génétiques, une rigueur extrême de phénotypage afin de caractériser des variations d'expressivité et un développement de nouvelles technologies pouvant répondre à ce nouveau défi.

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte de recherche appliquée mêlant au quotidien données cliniques, recherche de l'origine moléculaire à l'aide de technologies et de concepts en constante évolution et compréhension physiopathologique de ces variations génétiques. L'objectif final est d'appliquer ces recherches afin d'améliorer la prise en charge des patients.

## ***A- INTRODUCTION***



## I. Hérité et génétique

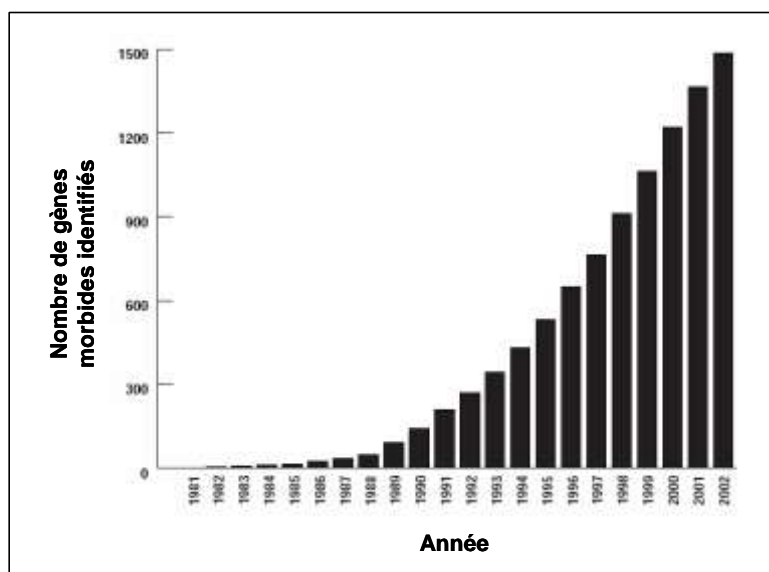
### Evolution des concepts et des outils

L'évolution du génie génétique au cours des années 70 a permis l'émergence de la génétique moléculaire. Les années 80 ont vu les premières identifications de régions chromosomiques associées à des maladies génétiques telles que la chorée de Huntington [Gusella *et al.* 1983], la mucoviscidose [Knowlton *et al.* 1985; Tsui *et al.* 1985; Wainwright *et al.* 1985; White *et al.* 1985] ou encore la myopathie de Duchenne [Dubowitz 1986]. En septembre 2008, la base de donnée OMIM<sup>®</sup> (Online Mendelian Inheritance in Man<sup>®</sup>) comptabilisait 6487 entrées avec une description phénotypique et l'on disposait des bases moléculaires pour 3770 (58%) d'entre elles [Amberger *et al.* 2009]. La base de données OMIM<sup>®</sup> recense environ 70 nouvelles entrées par mois et estime à plus de 1500 le nombre de pathologies génétiques sans base moléculaire identifiée. Une voie de découverte de nouveaux gènes passerait par l'étude de familles consanguines concernant au moins 1 milliard de personnes dans le monde [Bittles 2001].

Le déterminisme des maladies cardio-vasculaires, bien que complexe, voit sa compréhension s'améliorer grâce au développement de nouveaux outils cliniques et moléculaires. Dans la plus grande majorité des cas, les maladies cardio-vasculaires ont des causes multiples, et sont associées à des facteurs de risque (âge, sexe, cholestérol, tabagisme, hypertension). Pour certaines pathologies, une origine génétique est en revanche clairement établie. Ces formes où l'implication de la génétique est prépondérante correspondent, selon leur niveau de complexité, soit à des pathologies monogéniques (à transmission mendélienne), où un gène majeur est à l'origine du mécanisme pathologique, soit à des pathologies multigéniques, où l'association de plusieurs gènes est nécessaire pour développer une pathologie.

#### I.1 Modèles génétiques : du modèle monogénique au modèle polygénique

La publication de cartes génétiques humaines dans les années 90 et l'achèvement du séquençage du génome humain en 2001 ont permis une croissance exponentielle de la découverte des gènes morbides (Figure 2).



**Figure 2 – Accélération de la découverte de gènes morbides entre 1981 et 2002**

Modifié d'après <http://www.nih.gov/news/pr/apr2003/Pace.pdf>

Les pathologies monogéniques ont été les premières à bénéficier de ces avancées. Comme leur nom l'indique, elles sont la conséquence de la mutation d'un seul gène. A ce jour deux approches principales sont utilisées pour identifier ces gènes morbides : l'approche d'analyse de liaison génome entier (ou clonage positionnel) et l'approche gène candidat.

- L'analyse de liaison génome entier, consiste à génotyper à l'aide de marqueurs polymorphes tous les individus d'une famille (atteints et sains) sur l'ensemble du génome et à identifier un locus partagé par tous les patients atteints et absent chez tous les individus sains. Ces marqueurs polymorphes, au départ les marqueurs RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) [Botstein *et al.* 1980; Donis-Keller *et al.* 1987]) ont laissé la place à des cartes de plus en plus denses de marqueurs microsatellites hautement polymorphes [Weissenbach *et al.* 1992; NIH/CEPH Collaborative Mapping Group 1992; Buetow *et al.* 1994; Gyapay *et al.* 1994; Murray *et al.* 1994; The Utah Marker Development Group 1995]

La composition génique de l'intervalle identifié est examinée et le séquençage de cette région peut révéler l'implication d'un nouveau gène et d'une nouvelle voie physiopathologique.

- L'approche gène candidat cible un gène présumé impliqué dans la voie physiopathologique touchée d'après les données scientifiques collectées comme son expression tissulaire, sa fonction ou son étude dans un modèle animal invalidé pour ce même gène. Le gène *SCN5A* est un exemple d'identification de gène morbide dans le syndrome de Brugada par cette méthode [Chen *et al.* 1998].

L'analyse de liaison familiale a permis d'élucider les bases moléculaires à l'origine de certaines de maladies monogéniques rares. Cependant un nombre considérable de loci identifiés n'ont pas abouti à l'identification du gène en cause. Ces données suggèrent (i) que la liaison est due au hasard (faux positif), (ii) que le nombre de gènes à explorer est trop important, (iii) que tous les gènes du locus ne sont pas encore identifiés ou (iv) que les régions non-codantes et les petits réarrangements génomiques (délétions, duplications, inversions), qui étaient encore peu ou pas explorés et sous-estimés il y a quelques années, pourraient avoir un rôle majeur dans le développement des pathologies. Cette méthode nécessite de disposer de familles suffisamment grandes, génétiquement informatives, et que la pathologie soit liée à un ou des gènes à effet majeur. Elle permet en effet de démontrer l'implication de variants rares à effet fort.

Des pathologies trouvent leur explication moléculaire dans une combinaison d'un nombre réduit de variants ( $1 < n <$  quelques dizaines). Plusieurs maladies génétiques, initialement décrites comme monogéniques sont soutenues par un modèle génétique plus complexe. En effet des contradictions avec le modèle monogénique de certains cas de rétinites pigmentaires ont conduit à la mise en évidence d'un modèle digénique [Kajiwara *et al.* 1994]. Un modèle digénique « triallèlique » a été décrit dans le syndrome de Bardet-Biedl où le modèle récessif présenté initialement ne pouvait pas expliquer certaines transmissions [Beales *et al.* 2001]. Une combinaison de 2 ou 3 variants est encore identifiable par des analyses de liaison comme pour les formes monogéniques mais où non pas un mais 2 ou 3 loci ont une liaison significative avec la ségrégation du phénotype.

Le nombre théorique de gènes responsable d'une pathologie est fonction de la variance phénotypique que va apporter chaque allèle. La pathogénie de variants à effet modéré ou encore appelés « gènes de susceptibilité ou de prédisposition » est observable si et seulement si la combinaison de leur impact phénotypique dépasse un seuil d'apparition de la maladie (effet seuil). Dans ce modèle chaque variant pris séparément ne peut provoquer un phénotype, on parle alors de modèle oligogénique<sup>1</sup>. La maladie de Hirschsprung est un exemple de maladie oligogénique. Une étude a notamment montré que la présence de trois facteurs de susceptibilité situés dans 3 loci différents étaient nécessaires et suffisants pour développer la maladie de Hirschsprung [Gabriel *et al.* 2002]. Au début de l'année 2009 une étude menée sur plus de 20 000 individus a pu démontrer que des variants communs répartis dans 30 loci participaient à des dyslipidémies [Kathiresan *et al.* 2009].

On parle de modèle polygénique lorsque la combinaison de dizaines voire de centaines de variants est nécessaire à l'apparition d'une symptomatologie. L'identification de ces variations génétiques suppose une puissance statistique plus élevée que pour l'identification de variants à effets plus fort. Cette puissance et donc la probabilité de trouver une liaison est

---

<sup>1</sup> Modèle oligogénique : modèle génétique dans lequel une maladie est provoquée par un nombre réduit de variants

fonction du nombre d'individus génotypés, de la finesse du phénotypage et du degré de variation phénotypique engendré par le SNP (Single Nucleotide Polymorphism). En effet plus la population étudiée est grande et partage le même phénotype et plus la probabilité d'identifier des variants à effet faible sera importante. Une étude menée par le consortium international sur la schizophrénie a permis d'établir un modèle polygénique pour cette maladie psychiatrique [Purcell *et al.* 2009].

Le principe de détection de ces variants à effet faible est de trouver un allèle commun aux individus partageant le même phénotype. La différence réside dans le nombre de patients à génotyper (plusieurs milliers) et le nombre de marqueurs à génotyper : les SNPs (plusieurs centaines de milliers par individu). La mise en place de telles études a nécessité la constitution de population de grande taille, le développement de nouvelles technologies et de méthodes d'analyse haut débit (cf. paragraphe I.2).

On pensait auparavant que les maladies rares 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 *et 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<sup>2</sup> et d'expressivité<sup>3</sup> que l'on peut attribuer à la présence de variants à effet mineur [Kaab *et 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, ne permet pas toujours d'expliquer tous les cas rencontrés. Par exemple, des travaux de séquençage menés sur 3 gènes candidats d'une maladie fréquente : l'hypercholestérolémie, ont montré que dans 16% des cas, des variants rares pouvaient expliquer cette pathologie fréquente [Cohen *et al.* 2004].

Outre la cause génétique, l'environnement joue un rôle dans le déterminisme de la plupart de ces pathologies. Pour déterminer cela une corrélation du phénotype entre des patients apparentés et non apparentés peut être réalisée. Cette approche devient indispensable et subtile d'autant plus si le but est d'identifier le gène conduisant à un défaut de pénétrance. L'étude des jumeaux demeure l'approche la plus pertinente pour déterminer l'impact du fond génétique de l'environnement sur une maladie [Vanscoy *et al.* 2007].

---

<sup>2</sup> Pénétrance : rapport entre le nombre d'individus porteurs d'une mutation donnée et malades et le nombre total d'individus porteurs de cette mutation

<sup>3</sup> Expressivité : variabilité de l'expression phénotypique d'une mutation

## I.2 Stratégie pour la découverte de variants à effet faible : l'étude d'association

Pour les maladies communes, une alternative à l'analyse de liaison familiale et à l'approche gène candidat a donc été développée pour identifier des facteurs génétiques de susceptibilité (à effet faible) : l'étude d'association. Le principe de l'étude d'association est de trouver une corrélation entre un génotype et un phénotype au travers de l'étude d'une population. Pour se faire, ces études ont nécessité une évolution des cartes génétiques, des technologies de génotypage et la constitution de cohortes de patients.

Le but est de détecter le ou les variants génétiques prédisposant à une pathologie en génotypant des marqueurs génétiques (SNPs) en déséquilibre de liaison avec ces variants, et dont la position chromosomique est connue. Le déséquilibre de liaison entre un marqueur et le locus causal se traduit par une association allélique non aléatoire entre un allèle du marqueur et l'allèle de susceptibilité du locus causal, indiquant qu'il y a liaison génétique. Les marqueurs génétiques possédant des allèles préférentiellement présents chez les patients indiqueront que ces marqueurs sont (i) eux-mêmes causals ou (ii) physiquement proches du polymorphisme impliqué dans la pathologie (en déséquilibre de liaison). La valeur statistique de « *P-value* » doit être faible pour une forte évidence d'association.

Cette approche a été rendue possible à l'échelle du génome entier grâce au projet HapMap. Il a permis le développement de cartes denses de SNPs et d'obtenir des informations sur leur fréquence, sur leur répartition physique, et sur les groupes de SNPs en déséquilibre de liaison qui permettent de limiter le nombre de SNPs étudiés (« *TagSNP* ») [Ardlie *et al.* 2002; Morton 2005; The International HapMap Consortium 2005; The International HapMap Consortium 2007]. Une des premières études d'associations appliquées au génome entier utilisait 100 000 SNPs. Elle semblait a priori d'une puissance insuffisante mais l'importance de l'effet du polymorphisme a toutefois permis une association significative [Klein *et al.* 2005]. La disponibilité depuis 2005 de « puces » permettant de tester simultanément 300 000 (système Illumina) ou 500 000 SNPs (système Affymetrix) sur un grand nombre de patients et contrôles a permis le développement des études d'associations sur des pathologies très diverses [Wellcome Trust Case Control Consortium 2007]. Les technologies d'aujourd'hui permettent le génotypage de près d'un million de SNPs et d'accroître la puissance des études.

Les études d'associations requièrent de grandes cohortes de patients pour déterminer significativement des régions pouvant contenir des variants communs responsables d'une prédisposition et mettre en évidence des gènes impliqués dans des pathologies communes. En effet plus on va vouloir identifier des variants à impact phénotypique faible plus on devra augmenter la taille de la cohorte et/ou augmenter l'homogénéité du phénotype de la population.

Plusieurs possibilités existent quant au choix de la population à étudier. Une étude cas

contrôle permet de comparer la fréquence allélique de marqueurs entre une population de patients atteints et une autre saine. Une autre stratégie est d'utiliser les données de populations issues d'études épidémiologiques (exemples : population KORA : 18 000 individus ou population Framingham : 66 910 individus). Elles sont phénotypées pour un grand nombre de paramètres et permettent l'étude de la corrélation entre son génotype et un trait quantitatif. Une dernière stratégie combine les deux précédentes en ne gardant, au sein d'une population générale, que les patients situés aux extrêmes du trait quantitatif. Cette dernière méthode demande à ce que les deux populations soient en effectif encore assez important après la sélection des cas extrêmes. Une méta-analyse de plusieurs populations est souvent réalisée afin de répliquer les résultats obtenus et afin d'augmenter la puissance de l'étude et pouvoir ainsi détecter de nouveaux marqueurs de susceptibilité.

### **I.3 Limites des études d'associations et perspectives**

Les publications décrivant une étude d'association se sont multipliées ces 3 dernières années. L'interrogation de la base de donnée PubMed recense environ 650 occurrences pour le terme Whole Genome Association depuis 3 ans sur un total de moins de 1500 (43%).

Aujourd'hui il est admis que ces études sont loin d'expliquer la totalité de la variation d'un phénotype et donc de la relation génotype/phénotype des maladies complexes. Une des limites de ces études est la mauvaise couverture de certaines zones du génome qui pourraient avoir une implication dans la variabilité du phénotype. En effet on sait que les régions riches en guanine et cytosine sont peu couvertes par les puces actuelles alors que ces régions correspondent souvent à des zones régulatrices de gènes. Une autre hypothèse serait que la majorité des maladies génétiques complexes suive un modèle polygénique et que leur explication moléculaire se trouverait dans l'identification de groupes de marqueurs de susceptibilité [Purcell *et al.* 2009]. Il faut ajouter les facteurs d'origine environnementale qui peuvent se combiner aux effets des variants génétiques.

Ces études nourrissent également des interrogations sur l'application de leurs résultats. Ces différents points ont été résumés par le Professeur Mandel au cours d'enseignements dispensés au Collège de France en novembre et décembre 2006. « Le problème de l'application des résultats obtenus a été discuté. Ils permettent sans nul doute d'aborder de manière entièrement renouvelée 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 %), à l'exception 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]. Mais même dans ce cas, l'aspect prédictif sera difficile

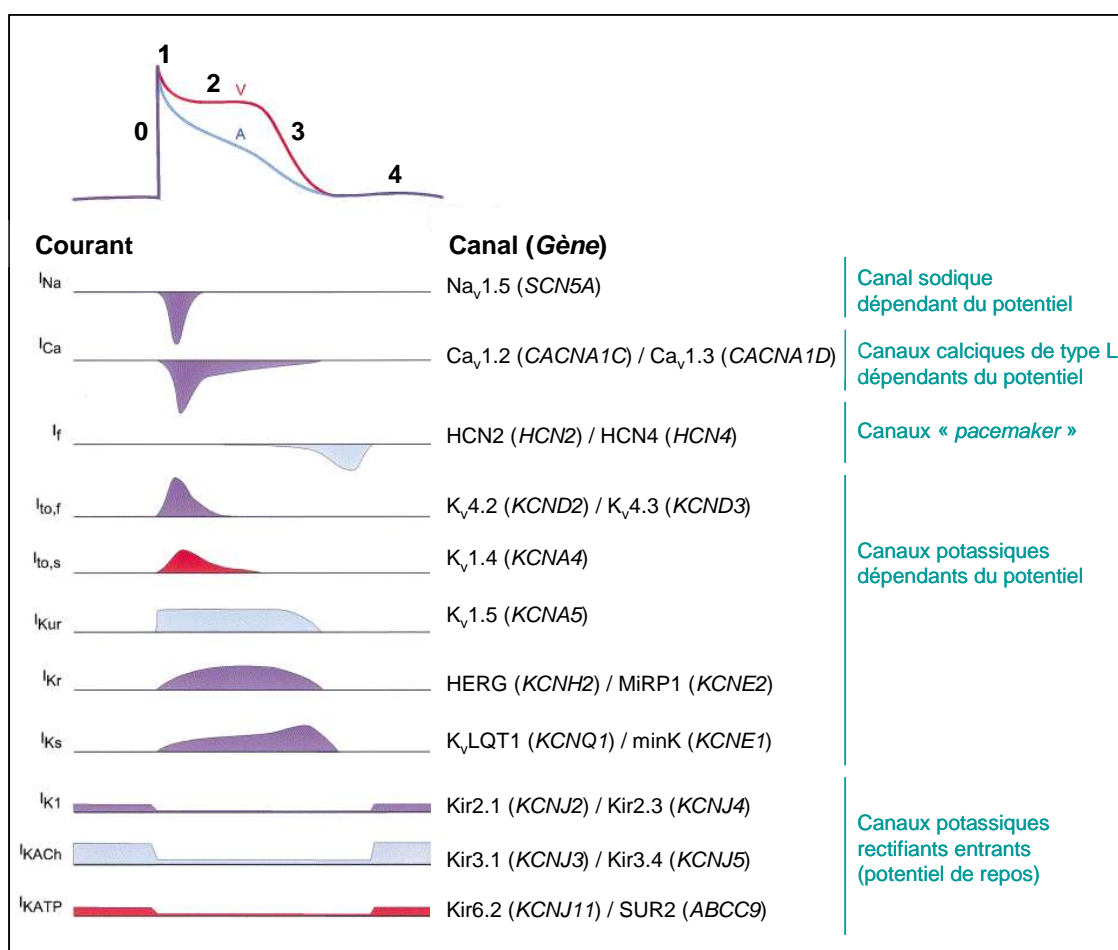
à utiliser et aura un effet limité (car 2 tiers des cas surviennent chez des personnes avec un risque génétique moindre), à moins que des travaux ultérieurs ne permettent de trouver des stratégies préventives ou thérapeutiques justifiant l'utilisation préalable des tests génétiques (stratégie de « médecine personnalisée »). D'autre part, le risque d'utilisation incontrôlée de tels tests soulève d'évidents problèmes éthiques (il existe déjà des offres sur internet dans ce sens). » Une des réponses à l'absence d'identification de marqueur moléculaire dans des populations de patients résiderait dans l'existence en nombre important de défauts génétiques rares non détectés par les méthodes de puces de génotypage [Cohen *et al.* 2004]. Cette hypothèse nécessite des stratégies très lourdes et coûteuses de type reséquençage systématique de nombreux gènes.

Un des prochains défis est le « génome humain à 1 000 dollars » [Mardis 2006], qui sera peut être abordable dans quelques années grâce à de nouvelles plateformes de séquençage et nécessaire pour une prise en charge clinique personnalisée sous une nouvelle ère de « médecine génomique » [Shendure *et al.* 2004; Hutchison 2007]. Parmi les nouvelles technologies de séquençage, on peut citer le pyroséquençage, développé par 454 Life Sciences, la technologie Solexa, développée par Illumina, et la technologie SOLiD pour *Supported Oligonucleotide Ligation and Detection system*, développée par Applied Biosystems [Hutchison 2007]. D'autres approches sont développées comme le séquençage par nanopore. Un nouveau projet ambitieux a été annoncé début 2008, le projet « 1000 Genomes ». Il consiste à séquencer le génome de 1 000 individus de différentes populations pour identifier les variations interindividuelles avec une résolution maximale <http://www.1000genomes.org/page.php>.

En plus des variations d'un seul nucléotide (SNP), il a été mis en évidence des variations de nombre de copies d'ADN (*Copy Number Variations*, CNV). Elles révolutionnent nos concepts sur la diversité entre les individus. En 2006, Richard Redon a publié la première carte répertoriant, sur l'ensemble du génome, les variations du nombre de copies (CNV : Copy Number Variation) [Redon *et al.* 2006]. Cette étude a permis de montrer que 12% du génome varie en nombre de copies (360Mb) avec un peu moins de 1500 régions concernées allant de quelques Kb jusqu'à plusieurs Mb. Une base de données recense les variations de nombre de copies pour des segments d'ADN d'une taille supérieure à 1 kb chez des individus contrôles (Database of Genomic Variants, Toronto, Canada <http://projects.tcag.ca/variation>) [Lafrate *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006]. Les données doivent être interprétées avec précaution puisque pour l'instant la taille exacte des CNV et les points de cassure ne sont pas délimités avec précision. Les études futures permettront de déterminer l'importance des CNV dans les maladies monogéniques où ils pourraient contribuer aux variations d'expressivité des mutations (pénétrance), et dans l'apparition des maladies complexes.

## II. Repolarisation ventriculaire et mort subite

La repolarisation ventriculaire repose sur un subtil équilibre de courants ioniques pouvant s'influencer entre eux (Figure 3). La perturbation de l'un de ces flux de charges positives ou négatives aura une répercussion sur l'automatisme, l'excitabilité, ou la conduction. Ces anomalies intrinsèques ioniques sont appelées anomalies primaires de la repolarisation ventriculaire par opposition aux anomalies dites secondaires causées par des facteurs extrinsèques. Elles vont être à l'origine à la fois d'anomalies électrocardiographiques et d'une instabilité rythmique pouvant aboutir à une mort subite par fibrillation ventriculaire. Ces anomalies influent sur la durée ou la morphologie du potentiel d'action (PA) et par conséquent sur la durée de la repolarisation qui est le déterminant principal de la période réfractaire, élément électrophysiologique majeur. De nombreux travaux montrent que le substrat arythmogène repose en grande partie sur la majoration de l'hétérogénéité des périodes réfractaires que ce soit dans des conditions de durée de repolarisation allongée, courte ou normale [Antzelevitch 2001a].

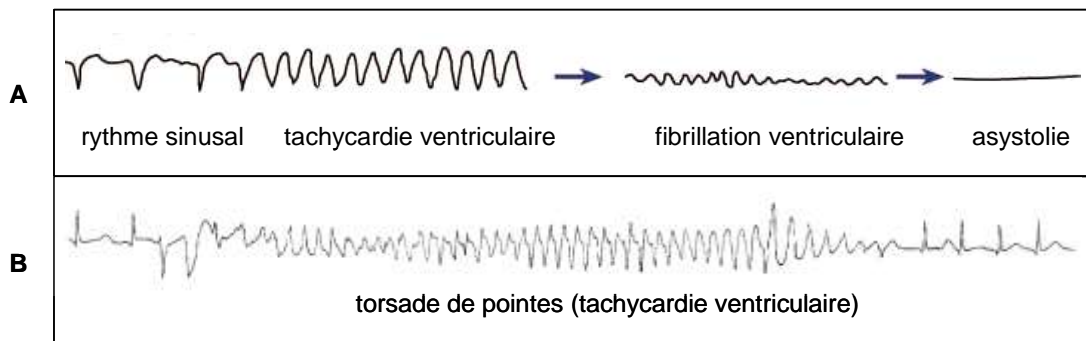


**Figure 3 – Représentation des principaux courants ioniques responsables des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains et des canaux ioniques associés**

$V$  : PA ventriculaire,  $A$  : PA auriculaire. *En rouge*, les courants enregistrés uniquement dans le ventricule, *en bleu* uniquement dans l'oreillette, *en violet* dans les deux compartiments. Vers le bas les courants entrants et vers le haut les courants sortants.  $K_v$  : Canaux potassiques dépendants du voltage,  $Kir$  : Canaux potassiques rectifiants entrants (*inward rectifier*).  $I$  signifie courant. Modifié d'après [Pond et Nerbonne 2001]



La mort subite cardiaque est un problème de santé publique majeur puisqu'elle touche environ un individu sur mille par an dans les pays développés (40 000 cas par an en France) [Zipes et Wellens 1998; Huikuri *et al.* 2001; Jouven et Escande 2006]. Elle est définie comme une mort inattendue et brutale survenant dans l'heure suivant l'apparition des premiers symptômes. Chez la moitié des victimes, il s'agit de la première et dernière manifestation d'une cardiopathie sous-jacente méconnue, le plus fréquemment une maladie coronarienne ou une cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique. Le taux de survie est inférieur à 3% en France, on parle alors de « mort subite récupérée ». Le mécanisme létal est dans 80% des cas un trouble du rythme ventriculaire causé par l'instabilité électrique du cœur : torsades de pointes ou tachycardie qui peut dégénérer en fibrillation (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 décrivent de torsion autour de la ligne isoélectrique. Elles sont liées à un phénomène de réentrée 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. Modifié d'après [Napolitano et Priori 2002]

On distingue les troubles du rythme cardiaque primaires, sans cardiopathie sous-jacente (le syndrome du QT long congénital, le syndrome du QT court congénital, le syndrome de Brugada, la forme héréditaire de la maladie de Lenègre, les formes héréditaires de dysfonction sinusale, la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique et les formes familiales de fibrillation auriculaire), des troubles du rythme causés par une maladie structurale cardiaque (cardiomyopathies dilatée et hypertrophique, dysplasie arythmogène du ventricule droit, malformations congénitales...) ou associés à des affections génétiques neurologiques ou musculaires (ataxie de Friedreich, myopathie de Duchenne...) [Roberts et Brugada 2003]. Environ 5 à 10% des cas de mort subite sont attribués aux troubles du rythme sans cardiopathie sous-jacente. Elle survient surtout chez les sujets jeunes [Wever et Robles de Medina 2004; Sarkozy et Brugada 2005; Tester et Ackerman 2007]. Une étude clinique et génétique sur 43 familles où au moins un membre avait fait une mort subite avant 40 ans a démontré une arythmie, primaire ou liée à une maladie structurale cardiaque, dans 40% des cas et pour la majorité une origine génétique a été identifiée [Tan *et al.* 2005].

Ces données montrent l'importance de l'identification des bases moléculaires à l'origine des troubles du rythme. Ces marqueurs permettent la mise en place de diagnostic préventif, en particulier en cas d'histoire familiale de mort subite, et de développer des stratégies thérapeutiques autres que le défibrillateur cardiaque largement utilisé [Passman *et* Kadish 2007].

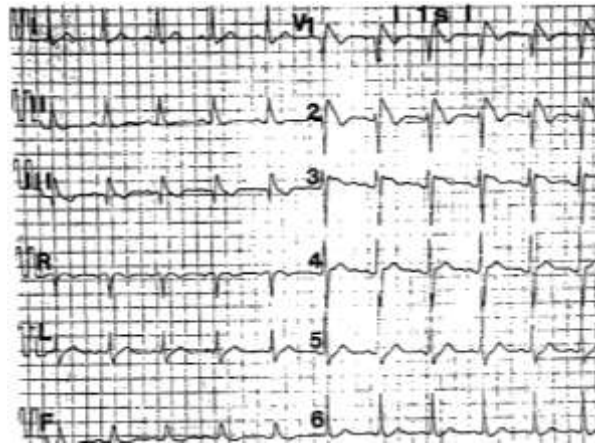
Le développement de ces arythmies est sous l'influence de variants rares à effet majeur, mais également de polymorphismes communs [Kaab *et* Schulze-Bahr 2005]. D'autre part, l'expressivité des mutations semble aussi dépendante du sexe. En effet, on remarque une disparité de la pénétrance, en particulier pour le syndrome du QT long congénital et le syndrome de Brugada, qui pourrait s'expliquer par une action des hormones stéroïdes sur la régulation des canaux ioniques [Furukawa *et* Kurokawa 2007], et une expression différentielle des canaux ioniques [Di Diego *et al.* 2002]. En situation non pathologique, la différence liée au sexe est déjà visible à l'électrocardiogramme avec une fréquence cardiaque plus élevée, un intervalle QT plus long, une amplitude et une durée du complexe QRS plus faibles chez les femmes, ce qui explique en partie une susceptibilité à développer certaines arythmies [Bernal *et* Moro 2006].

Le diagnostic de ces pathologies est le plus souvent réalisé suite à un évènement rythmique puis confirmé par un ECG de surface. L'histoire familiale de mort subite, les symptômes, éventuellement une exploration électrophysiologique, une épreuve d'effort ou un test pharmacologique, permettent aux cliniciens d'adapter la prise en charge en fonction du risque arythmogène.

### III. Génétique des troubles du rythme cardiaque primaires

#### III.1 Génétique du syndrome de Brugada

En 1992, Pedro et Josep Brugada, ont décrit une nouvelle entité clinique associant un aspect typique sur l'ECG, des troubles du rythme et de la conduction, un risque de mort subite par tachycardie ventriculaire (TV) polymorphe et une présomption d'hérédité [Brugada et Brugada 1992]. Ils décrivent les caractéristiques électrocardiographiques de 8 patients dont 6 hommes. Tous présentent un sus-décalage du segment ST persistant visible dans les dérivations précordiales droites (V1 à V3) supérieur à 0,1 mV, un bloc de branche droit sans allongement de l'intervalle QT (Figure 5).

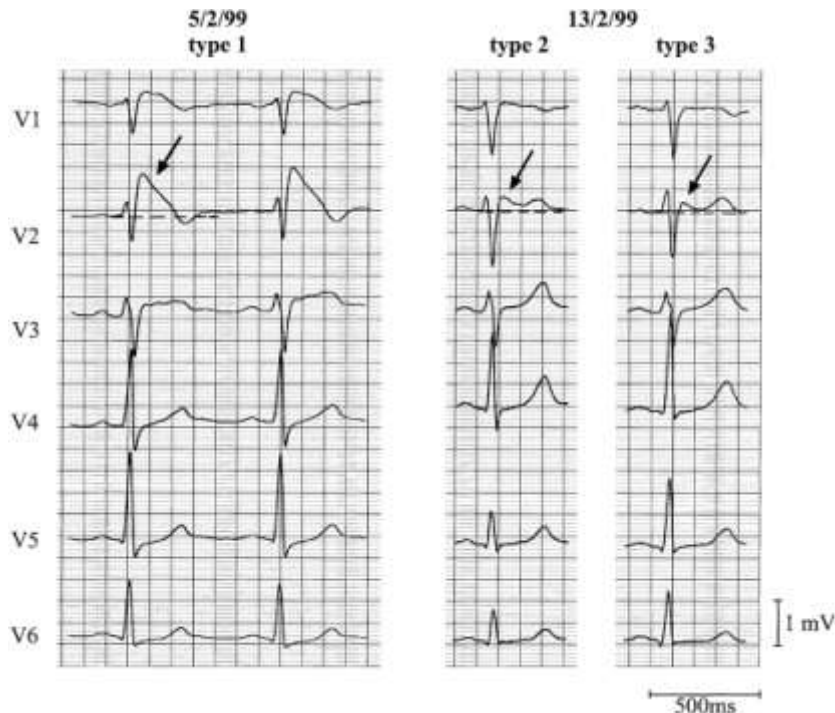


**Figure 5 – Electrocardiogramme d'un des 8 patients de la première publication décrivant les caractéristiques cliniques du syndrome de Brugada**

*L'ECG révèle un sus-décalage persistant du segment ST dans les dérivations précordiales V1, V2 et V3 supérieur à 0,1 mV ainsi qu'un bloc de branche droit sans allongement de l'intervalle QT.*

##### III.1.1 Description électrocardiographique du syndrome de Brugada

L'aspect électrocardiographique du syndrome de Brugada (SBr) se manifeste par une élévation du segment ST sur au moins 2 dérivations précordiales droites successives, par un aspect atypique de bloc de branche droit et par des troubles de la conduction. Trois types sont différenciés suivant l'intensité du sus-décalage et la morphologie du segment ST. Le SBr de type I se définit par un segment ST convexe, sus-décalé d'au moins 0,2 mV et suivi d'une onde T négative. Celui de type II se caractérise par un segment ST en selle et surélevé d'au moins 0,2 mV mais pouvant décroître dans le temps à 0,1 mV. Le SBr de type III est observé pour 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. Dans ces deux derniers types l'onde T est positive (Figure 6 ; Tableau 1).



**Figure 6 – Représentation des trois types d’ECG, type 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]

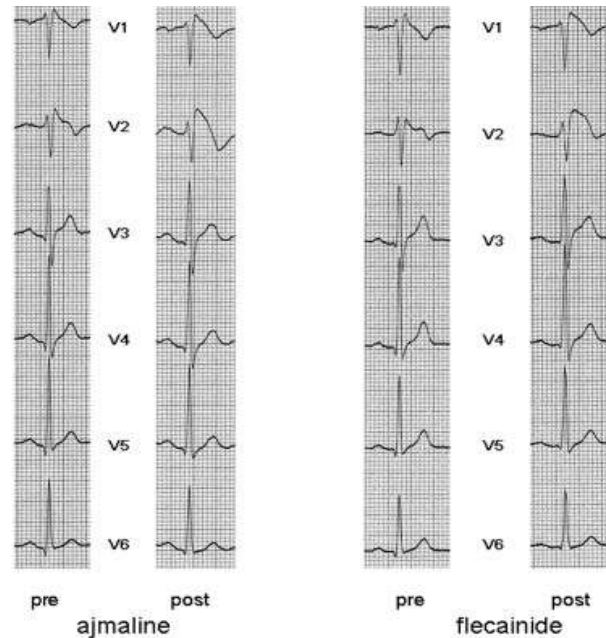
**Tableau 1 – Caractéristiques électrocardiographiques des ECG de type I, II et III du syndrome de Brugada**

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

Modifié d’après [Antzelevitch et al. 2005b]

Le diagnostic de cette pathologie est souvent difficile en raison de facteurs confondants potentiels et de l’intermittence des anomalies ECG [Antzelevitch et al. 2005b]. Il existe cependant des outils pharmacologiques comme les bloqueurs de canaux sodiques permettant 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 et sont administrés en perfusion continue sur 10 min, l’ajmaline (1 mg/kg) ou la flécaïnide (2 mg/kg) pour « démasquer » le syndrome [Brugada et al. 2000; Wolpert et al. 2005a]. La pénétrance passe d’environ 32% à 79% avec l’utilisation de ces bloqueurs des canaux sodiques [Hong et al.

2004]. 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].



**Figure 7 – ECG montrant l'action « démasquante » des antiarythmiques de classe Ic : l'ajmaline et la flécaïnide dans le syndrome de Brugada**

*A gauche : ECG des dérivations précordiales avant et après injection intraveineuse d'ajmaline. A droite : ECG des dérivations précordiales avant et après injection intraveineuse de flécaïnide. Induction d'un sus décalage du segment ST, caractéristique du SBr, par injection d'ajmaline et de flécaïnide chez un même patient. D'après [Wolpert *et al.* 2005a]*

### III.1.2 Epidémiologie

D'après la seconde conférence de consensus le syndrome de Brugada touche environ 1 caucasien sur 2000 (0,05% de la population générale), cette prévalence varie selon les études et peut aller jusqu'à 0,12% [Gallagher *et al.* 2008] (individus ayant un SBr de type I) voire 0,19% à 0,58% si l'on compte les aspects de type II et III. La variation de cette prévalence peut se comprendre par la faible pénétrance du SBr : environ 32%. Cette pénétrance peut être augmentée par l'utilisation d'un test pharmacologique et passer à 79% [Hong *et al.* 2004]. L'âge moyen d'apparition des premiers symptômes est en moyenne de 40 ans avec une distribution très hétérogène (de 2 jours à 84 ans) [Antzelevitch *et al.* 2005b]. Le SBr touchent préférentiellement les hommes : 72 à 80% des cas selon les études [Eckardt 2007; Benito *et al.* 2008].

Ce syndrome génétique est la première cause de mort subite chez les jeunes sans cardiopathie sous jacente ce qui représente environ 1600 décès par an en France [Antzelevitch *et al.* 2005a].

### **III.1.3 Symptomatologie**

Les patients souffrant d'un SBr sont sujets à des troubles du rythme ventriculaire se déclenchant au repos, pendant le sommeil ou lors de stimulation vagale. A ces critères doivent s'ajouter un des critères suivants : des antécédents de tachycardies ventriculaires polymorphes documentées, des syncopes, une tachycardie ventriculaire par stimulation programmée, une histoire familiale de mort subite avant 45 ans ou un aspect ECG de SBr dans la famille.

Les conséquences rythmiques encourues sont des risques élevés de troubles du rythme ventriculaire sévères comme la tachycardie ventriculaire polymorphe ou la fibrillation ventriculaire responsables de syncopes et de morts subites [Antzelevitch *et al.* 2005a].

### **III.1.4 Propriétés structurales cardiaques**

Une des propriétés importantes pour la pose du diagnostic du SBr est la normalité structurale du cœur. Une échocardiographie doit être réalisée systématiquement. 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 (DAVD) [Frustaci *et al.* 2005].

### **III.1.5 Diagnostic différentiel**

Afin d'établir le diagnostic du SBr chez un patient, 3 critères doivent être réunis : posséder un aspect électrocardiographique de type I, être symptomatique ou avoir un de ses membres de sa famille symptomatique et une absence d'anomalie structurale à l'échocardiographie. La présence de ces trois critères est primordiale afin de pouvoir différencier un SBr d'une DAVD ou d'un syndrome de repolarisation précoce (SRP) (Tableau 2).

La DAVD est caractérisée par un sus-décalage du segment ST et une TV polymorphe associée à une fibrose du ventricule droit [Calkins 2006].

Le SRP est un nouveau syndrome de la mort subite cardiaque par fibrillation ventriculaire (FV) sur cœur sain. Il se caractérise par une élévation de la jonction QRS-ST avec un point J  $\geq 0,1$  mV dans les dérivations latérales (V4-V6, D1, aVL) ou inférieures (DII, DIII, aVF), ou un défaut à la fin du complexe QRS (encoche ou empatement). Cet aspect électrocardiographique a été retrouvé plus fréquemment chez les patients avec une FV (31% *versus* 5%) que dans une population contrôle [Haissaguerre *et al.* 2008].

- Diagnostic différentiel entre le SBr et la DAVD

Le SBr partage avec la DAVD le sus-décalage du segment ST, les tachycardies polymorphes (30% des cas de DAVD), des troubles de la conduction, l'atteinte principalement masculine et l'âge de diagnostic [Corrado *et al.* 2001]. A l'inverse, les loci et les gènes impliqués sont différents, la morphologie et la fonction cardiaque sont changées dans la DAVD, enfin les patients souffrant de DAVD déclenchent le plus souvent des tachycardies ventriculaires monomorphes (70%) dans un contexte catécholaminergique ou d'exercice. Devant ces critères bien définis et les distinctions que l'on veut bien accorder, il existe dans la littérature des ponts entre ces deux pathologies. Un patient atteint d'un SBr avec d'importants troubles du rythme a dû être transplanté, une fibrose du ventricule droit a été observée [Ayerza *et al.* 2002; Coronel *et al.* 2005]. De plus Corrado *et al.* rapportent le cas de 13 individus morts subitement pour lesquels l'ECG montrait un sus-décalage du segment ST et un bloc de branche droit. Leur décès est survenu pendant une période de repos et de sommeil pour 11 d'entre eux [Corrado *et al.* 2001]. Ces signes cliniques rappellent ceux du SBr, cependant 12 présentaient une dysplasie myocardique. De même Frustaci *et al.* ont montré chez 18 patients atteints d'un SBr avec un cœur apparent structurellement normal, une myocardite ou une atteinte structurale à un stade précoce [Frustaci *et al.* 2005].

- Diagnostic différentiel entre le SBr et le SRP

Le SBr et le SRP rassemblent plusieurs caractéristiques comme la fibrillation ventriculaire, les syncopes, la moyenne d'âge de diagnostic, la prédominance masculine, le cœur structurellement sain et l'hérédité [Haissaguerre *et al.* 2008]. De façon intéressante certains tests pharmacologiques provoquent le même phénotype : les bloqueurs de canaux sodiques et les  $\beta$ -bloquants entraînent une élévation du segment ST alors que l'isoprotérénol diminue ce sus-décalage [Di Grande *et al.* 2008]. Les dérivations dans lesquels sont observés ces deux syndromes diffèrent : à l'inverse du SBr le syndrome de repolarisation précoce s'observe dans les territoires inférieur et latéral gauche. Le sus décalage dans le SRP se limite au point J et se caractérise par une encoche ou par une absence de retour à la ligne isoélectrique.

La question du continuum entre SBr et SRP a été posée par Di Grande [Di Grande *et al.* 2008]. Depuis 2008 les travaux de Sarkozy et de Letsas ont montré que respectivement 11% et 12% des patients atteints par le SBr (vs 1-6% dans la population générale) présentaient aussi une repolarisation précoce dans leurs dérivations inféro-latérales [Letsas *et al.* 2008; Sarkozy *et al.* 2009]. Notre équipe a publié en 2002 le cas d'une femme avec un sus décalage du segment ST présent avant et après test à la flécaïnide et visible dans les dérivations inférieures [Potet *et al.* 2003].

**Tableau 2 – Comparatif clinique, génétique et pharmacologique du syndrome de repolarisation précoce, du syndrome de Brugada et de la dysplasie arythmogène du ventricule droit**

	Syndrome de repolarisation précoce <sup>a</sup>	Syndrome de Brugada <sup>b</sup>	Dysplasie arythmogène du ventricule droit <sup>c</sup>
<b>clinique</b>			
sus-décalage point J/ST	oui		30% des cas
dérivations	I-II-III-aVL-aVF-V4-V5-V6	V1-V2-V3	
type de tachycardie ventriculaire	-	polymorphe	monomorphe (70%) - polymorphe (30%)
trouble de la conduction	non	BBD	
prédominance féminine/masculine	masculine		
atteinte structurale du cœur	non		oui
contexte des arythmies	repos (19%) effort (9%) autres (72%)	repos - stimulation vagale	stimulation adrénergique - exercice
moyenne d'âge de dépistage	35 - 40 ans		
Héritabilité	autosomique dominant		autosomique dominant et récessif
cas clinique chevauchant	Sarkozy et al. et Letsas et al.	Corrado et al. et ayerza et al.	
prévalence	-	1/2000	1/2000 à 1/5000
<b>génétique</b>			
gènes/loci connus	<i>KCNH8</i>	<i>SCN5A</i>	<i>TGF-beta3</i>
	-	<i>GPD1-L</i>	<i>RyR2</i>
	-	<i>CACNA1C</i>	<i>TMEM43</i>
	-	<i>CACNB2</i>	<i>JUP</i>
	-	<i>SCN1b</i>	<i>DSP</i>
	-	<i>KCNE3</i>	<i>PKP2</i>
	-	<i>SCN3b</i>	<i>DSG2</i>
	-		<i>DSC2</i>
<b>pharmacologie</b>			
bloqueurs canaux sodiques	↑ segment ST		-
bêta-bloquant	↑ segment ST		-
isoprotérénol	↓ segment ST		-
lidocaïne /mexiletine	pas d'effet	→ segment ST	-
verapamil	pas d'effet	peu efficace	-
amiodarone	+/-	peu efficace	-
quinidine	normalise l'ECG et prévient les FV		

**Références** : a = Syndrome de repolarisation précoce (SRP): [Haissaguerre et al. 2008; Rosso et al. 2008], b = Syndrome de Brugada (SBr): [Naccarelli et Antzelevitch 2001; Antzelevitch et Fish 2006; Chinushi et al. 2009; Belhassen et al. 2009], c = Dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD): [Corrado et al. 2001; Gemayel et al. 2001; Corrado et al. 2009].

**Légendes** : en vert foncé : caractéristiques propres au SRP, en bleu : caractéristiques propres au SBr, en jaune : caractéristiques propres à la DAVD, en turquoise foncé : caractéristiques communes au SRP et au SBr, en vert clair : caractéristiques communes au SBr et à la DAVD et en turquoise clair : caractéristiques communes au SRP, au SBr et à la DAVD. BBD = Bloc de Branche Droit.



### III.1.6 Bases moléculaires du syndrome de Brugada

Le SBr est une pathologie génétiquement hétérogène puisque 7 gènes ont été identifiés à ce jour (Tableau 3). En 1998, Chen *et al.* ont mis en évidence 3 types de mutations : faux-sens, substitution d'un acide nucléique dans un site d'épissage et un décalage du cadre de lecture dans le gène *SCN5A* par une approche gène candidat [Chen *et al.* 1998]. Ces variants appartiennent à deux petites familles (n=6 atteints et n=2 atteints) et un cas sporadique souffrant de fibrillations ventriculaires idiopathiques et présentant un aspect ECG compatible avec les critères du SBr. La ségrégation génotype/phénotype démontre le caractère autosomique dominant de cette pathologie. Une mutation du gène *SCN5A* est retrouvée chez environ 15% des patients [Priori *et al.* 2000a; Wilde *et al.* 2002; Schulze-Bahr *et al.* 2003]. En 2008, un travail de Thomas Zimmer et Ralf Surber recensait 119 mutations dans le canal sodique cardiaque  $Na_v1.5$  [Zimmer *et al.* 2008].

Des travaux de recherche de réarrangements dans le gène *SCN5A* ont été menés par l'équipe de Connie Bezzina et Arthur Wilde mais sans succès démontrant que cette hypothèse ne pourrait expliquer que de très rares cas [Koopmann *et al.* 2007]. Une corrélation a été recherchée entre des variants dans le promoteur du gène *SCN5A* et le sus décalage du segment ST. Un haplotype, présent dans environ 20% de la population asiatique, est associé à l'allongement des intervalles PR, QRS, à l'élévation du segment ST et réduit l'expression du canal sodique *in vitro*. Cet haplotype est particulier de l'ethnie asiatique ce qui corrèle avec la forte incidence de SBr dans cette région du monde [Bezzina *et al.* 2006].

Cependant, environ 80% des cas ne peuvent pas être expliqués par ce gène suggérant l'existence d'autres gènes morbides et de l'hétérogénéité de ce syndrome. En 2002, London *et al.* ont identifié, dans une grande famille, un nouveau locus, Brugada Syndrome 2 (SBr2), proche de *SCN5A* sur le chromosome 3 (3p22-25) [Weiss *et al.* 2002]. En 2007, une approche familiale a permis d'identifier une mutation p.A280V sur le gène glycerol-3-phosphate dehydrogenase like (*GPD1L*) appartenant au locus SBr2 [London *et al.* 2007]. Des études suggèrent que ce variant altère l'adressage des canaux sodiques  $Na_v1.5$  à la membrane expliquant la diminution de densité de courant sodique cardiaque [London *et al.* 2007; Valdivia *et al.* 2009]. Aucun autre variant de ce gène n'a été retrouvé à ce jour en relation avec un SBr. Seules 3 mutations ont été décrites dans le syndrome de la mort subite du nourrisson [Van Norstrand *et al.* 2007].

Trois autres approches gène candidat ont abouti à l'identification de nouveaux gènes pour le SBr. Elles n'expliquent que de rares cas. Quatre mutations dans les gènes *CACNA1C* et *CACNB2* codant respectivement les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$  provoquent une perte de fonction [Antzelevitch *et al.* 2007] et uniquement le « phénotype Brugada » alors

que 3 autres mutations mènent au phénotype chevauchant de SBr et QT court. Deux variants dans le gène *SCN1b*, une sous-unité  $\beta$  du canal sodique cardiaque ont été révélés par notre équipe et réduisent ce même courant [Watanabe *et al.* 2008]. Une mutation a été identifiée dans le gène *KCNE3* (R99H) codant une sous-unité  $\beta$  d'un canal potassique MiRP2. Delpont *et al.* montrent la co-immunoprécipitation entre MiRP2 et  $K_v4.3$  (sous-unité  $\alpha$ ) et le gain de fonction engendré par la mutation sur le courant  $I_{to}$  [Delpont *et al.* 2008]. Un cas sporadique a été décrit avec une mutation dans la sous-unité  $\beta_3$  de  $Na_v1.5$  codée par le gène *SCN3b* entraînant de nouveau une perte de fonction du canal sodique cardiaque. Le mécanisme est double puisque la mutation L10P de la sous-unité  $\beta_3$  modifie les propriétés biophysiques du canal ainsi que son adressage à la membrane [Hu *et al.* 2009]. L'implication potentielle de la sous-unité  $\beta_3$  dans les troubles du rythme chez l'homme avait été suggérée par l'exploration électrophysiologique de la souris invalidée pour *SCN3b* [Hakim *et al.* 2008].

**Tableau 3 – Gènes identifiés dans le syndrome de Brugada**

	% patients SQTL	Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
SBr1	25%	3p21	<i>SCN5A</i> <sup>a</sup>	$Na_v1.5$ (canal sodique $\alpha$ ), dépolarisation/ $I_{Na}$	$\downarrow I_{Na}$	AD, Sp
SBr2	rare	3p24 <sup>b</sup>	<i>GPD1L</i> <sup>c</sup>	GPD1L	$\downarrow I_{Na}$	AD
SBr3	1-2%	12p13.3	<i>CACNA1C</i> <sup>d</sup>	$Ca_v1.2$ (canal calcique $\alpha_1C$ ), dépolarisation/ $I_{Ca-L}$	$\downarrow I_{Ca-L}$	AD
SBr4	1-2%	10p12.33	<i>CACNB2b</i> <sup>d</sup>	$Ca_v\beta_2b$ (canal calcique $\beta_2b$ ), dépolarisation/ $I_{Ca-L}$	$\downarrow I_{Ca-L}$	AD, Sp
SBr5	rare	19q13.1	<i>SCN1b</i> <sup>e</sup>	$Na_v\beta_1$ (canal sodique $\beta_1$ ), $I_{Na}$	$\downarrow I_{Na}$	AD
SBr6	rare	11q13-q14	<i>KCNE3</i> <sup>f</sup>	MiRP2 (canal potassique $\beta$ ), repolarisation/ $I_{to}$	$I_{to}$	AD
SBr7	rare	11q23.3	<i>SCN3b</i> <sup>g</sup>	$Na_v\beta_3$ (canal sodique $\beta_3$ ), $I_{Na}$	$\downarrow I_{Na}$	Sp

*AD* : Autosomique dominant, *Sp* : Sporadique. Références : a = [Chen *et al.* 1998] ; b = [Weiss *et al.* 2002] ; c = [London *et al.* 2007] ; d = [Antzelevitch *et al.* 2007] ; e = [Watanabe *et al.* 2008] ; f = [Delpont *et al.* 2008] ; g = [Hu *et al.* 2009].

En résumé un diagnostic moléculaire est posé dans moins de 30% des cas alors que le caractère héréditaire est sans conteste. La recherche de nouvelles bases moléculaires se fait principalement par une approche gène candidat. Cette dernière s'avère peu puissante du fait du nombre de variants faux-sens, non-sens, ou CNVs retrouvés chez un individu sans que ceux-ci ne provoquent un phénotype. En effet un travail mené par le Sanger Institute rapporte que le séquençage de l'ensemble des exons du chromosome X de 18 patients révèle 22 variants non-sens, 983 variants faux-sens, 15 variations géniques décalant le cadre de lecture et 13 variants altérant l'épissage de l'ARNm [Tarpey *et al.* 2009].

L'analyse d'autres gènes est en cours au laboratoire avec toutes les précautions qu'implique cette stratégie : vérification de la fréquence du variant, de la ségrégation familiale, de son effet dans un modèle de réexpression. La faible pénétrance rend difficile le recrutement de grandes familles pouvant servir à réaliser de la génétique inverse et remonter alors, à des gènes à effet fort inaccessible par la méthode des gènes candidats.

### III.1.7 Relation génotype/phénotype

Les mutations dans le gène *SCN5A* reste de loin les plus fréquemment identifiées dans le SBr avec une prévalence d'environ 15%. Cependant aucune relation génotype/phénotype parfaite n'a été observée au sein d'une famille suffisamment informative. Plusieurs hypothèses peuvent être émises.

La faible pénétrance (32%) conduit à considérer, dans les études familiales, un nombre élevé d'individus non pénétrants. De plus, la nette prédominance masculine 8 :1 [Benito *et al.* 2008] et donc l'implication hormonale (testostérone) fausse sans doute le phénotypage puisque les mutations sont transmises de façon équitable [James *et al.* 2007]. Matsuo rapporte deux cas de patients ayant un ECG de type Brugada avant castration, puis une normalisation de l'ECG après opération [Matsuo *et al.* 2003]. Di Diego *et al.* montre que le courant potassique  $I_{to}$  est plus important dans les cellules épicrodiques ventriculaires de chien mâle ce qui laisse entendre que le gradient transmural entre l'épicarde et l'endocarde est lui aussi augmenté [Di Diego *et al.* 1996]. Ces deux hypothèses pourraient expliquer le sus-décalage retrouvé plus fréquemment chez les hommes et de fait cette prédominance masculine dans le SBr.

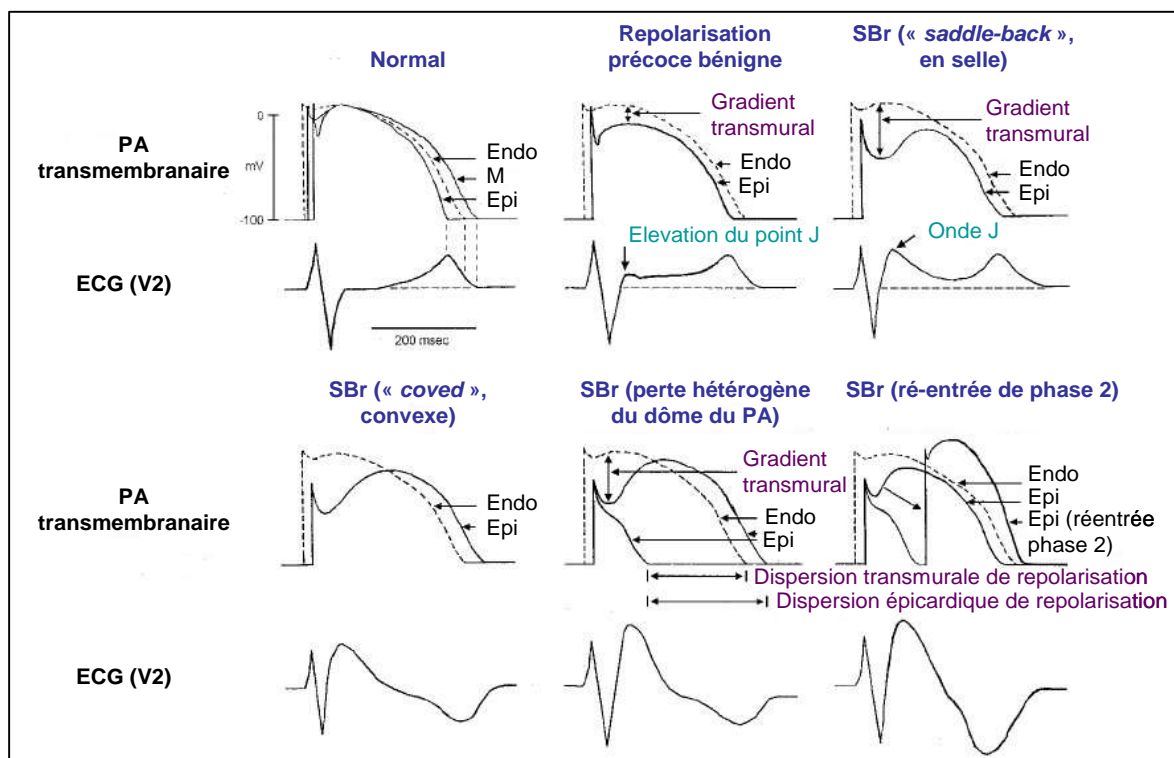
L'expressivité d'une même mutation est variable tant au niveau électrocardiographique qu'au niveau symptomatique. Enfin l'utilisation des bloqueurs pharmacologiques permettant de démasquer l'aspect ECG caractéristique n'apporte pas une réponse fiable à 100%. Toutes ces limites freinent les études pangénomiques familiales et l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires.

### III.1.8 Compréhension électrophysiopathologique

Le sus-décalage caractéristique du SBr reflète une hétérogénéité électrique transmurale accrue entre l'épicarde et l'endocarde. Cet aspect électrocardiographique est retrouvé, physiologiquement, chez certains rongeurs qui ont un courant  $I_{to}$  plus important. Chez les mammifères le segment ST est isoélectrique dans les conditions physiologiques. En effet le courant dépolarisant  $I_{Ca}$  est plus développé et atténue la repolarisation à la phase 1 due au courant  $I_{to}$ . Dans les conditions pathologiques, cette balance penche vers un courant  $I_{to}$  plus élevé causé comme dans le cas d'une ischémie ou vers une diminution des courants  $I_{Ca}$  et le gradient augmente. Le système nerveux autonome influe sur cette hétérogénéité par la

modulation de la densité de courant  $I_{Ca}$ . Le système sympathique augmente le courant  $I_{Ca}$  et va donc réduire le gradient  $I_{to}/I_{Ca}$  et par la même occasion réduire le sus-décalage du segment ST. A l'inverse le système parasympathique va diminuer le courant  $I_{Ca}$ , donc augmenter le gradient et va favoriser la survenue de réentrée de phase 2 [Litovsky *et al.* 1990]. Cela explique la propension d'évènements rythmiques à survenir pendant le sommeil ou la période postprandiale mais également au printemps période pendant laquelle le taux plasmatique de catecholamine diminue [Takigawa *et al.* 2008].

Dans le SBr, les mutations dans le gène *SCN5A* induisent une perte de fonction du canal et donc une diminution du courant sodique entrant lors de la phase 1. Une diminution du courant sodique entrant crée un déséquilibre de la balance entre courants entrants et sortants dans l'épicarde du ventricule droit. L'accentuation de l'encoche et la perte du dôme épïcardique causeraient un gradient de repolarisation accentué de l'endocarde à l'épicarde (gradient transmural) se manifestant à l'ECG par une élévation du point J et une surélévation du segment ST. L'aspect est en selle (types II et III) si la repolarisation des cellules épïcardiques précède la repolarisation des cellules endocardiques et des cellules M ou convexe (type I) si l'encoche au niveau du PA épïcardique est très prononcée et accompagnée d'une prolongation du PA, ce qui crée une onde T négative sur l'ECG de surface [Antzelevitch 2001b] (Figure 8).



**Figure 8 – Hypothèses sur la modification des PA dans le ventricule droit, expliquant la manifestation du syndrome de repolarisation précoce bénin et du SBr à l'ECG**

*PA* : Potentiel d'action, *Epi* : Epicarde, *Endo* : Endocarde. Dans le cas du syndrome de repolarisation précoce bénin, on observe un gradient de voltage qui se traduit à l'ECG par une élévation du point J sans être arythmogène. Dans le cas du SBr, l'hétérogénéité des PA dans l'épicarde crée une dispersion épïcardique transmurale de la repolarisation qui favorise les phénomènes de réentrée et les arythmies (TV, FV). Modifié d'après [Antzelevitch 2001b]

### III.1.9 Stratification du risque

La stratification du risque a pour but d'identifier les patients susceptibles de faire une mort subite et d'adapter la prise en charge en fonction de leur risque. D'après une étude menée par Brugada *et al.* parmi les patients ayant fait une mort subite, 69% ont eu de nouveau une arythmie, 19% parmi les patients ayant un antécédents de syncope et le risque est de 8 % chez les asymptomatiques. Les individus présentant un ECG de type I ont 7,7 fois plus de risque de développer un évènement 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]. Cependant une histoire familiale de SBr n'entraîne pas de risque supplémentaire [Antzelevitch *et al.* 2005a].

### III.1.10 Traitement et prise en charge

L'apport du diagnostic moléculaire dans la prise en charge des patients atteints du SBr demeure peu informatif. En effet, contrairement au Syndrome du QT long, la détection d'une mutation dans le canal  $Na_v1.5$  ne permet pas d'établir un pronostic. Cependant la réalisation de ce test reste recommandé afin de suivre le plus précocement possible les apparentés et vient renforcer le diagnostic clinique. Ce manque d'exploitation des mutations sodiques s'explique par l'absence d'une relation claire génotype/phénotype « mutation *SCN5A/SBr* », probablement due à un trop grand nombre de phénotopies et d'individus non pénétrants.

A ce jour, aucun traitement n'a été montré comme complètement efficace face à la prévention de la mort subite dans le SBr. Cependant plusieurs études montrent que la quinidine et l'hydroquinidine diminueraient le risque de fibrillations ventriculaires spontanées ou induites dans le SBr. La prise de quinidine dans ce dernier cas empêche la survenue d'arythmie dans 76% des cas [Belhassen *et al.* 2004; Watanabe *et al.* 2005]. Ce bloqueur est non spécifique du courant transitoire sortant  $I_{to}$  [Marquez *et al.* 2007] car il inhibe également le courant sodique ainsi que les courants potassiques  $I_{kr}$  et  $I_{kur}$ . De nouveaux agents pharmacologiques pourraient aider à la prise en charge des patients : le cilostazol et le tedisamil. Ces deux agents pharmacologiques réduisent le gradient entre les courants  $I_{to}$  et  $I_{Ca}$ .

Malgré les données de plus en plus encourageantes des traitements pharmacologiques seuls, ils ne semblent pas suffisamment efficaces pour se passer de l'implantation d'un défibrillateur automatique face à ces arythmies. Cependant l'intérêt de combiner les deux stratégies thérapeutiques est recommandé dans les cas d'individus implantés d'un défibrillateur et présentant de nombreuses syncopes et décharges [Priori *et al.* 2001].

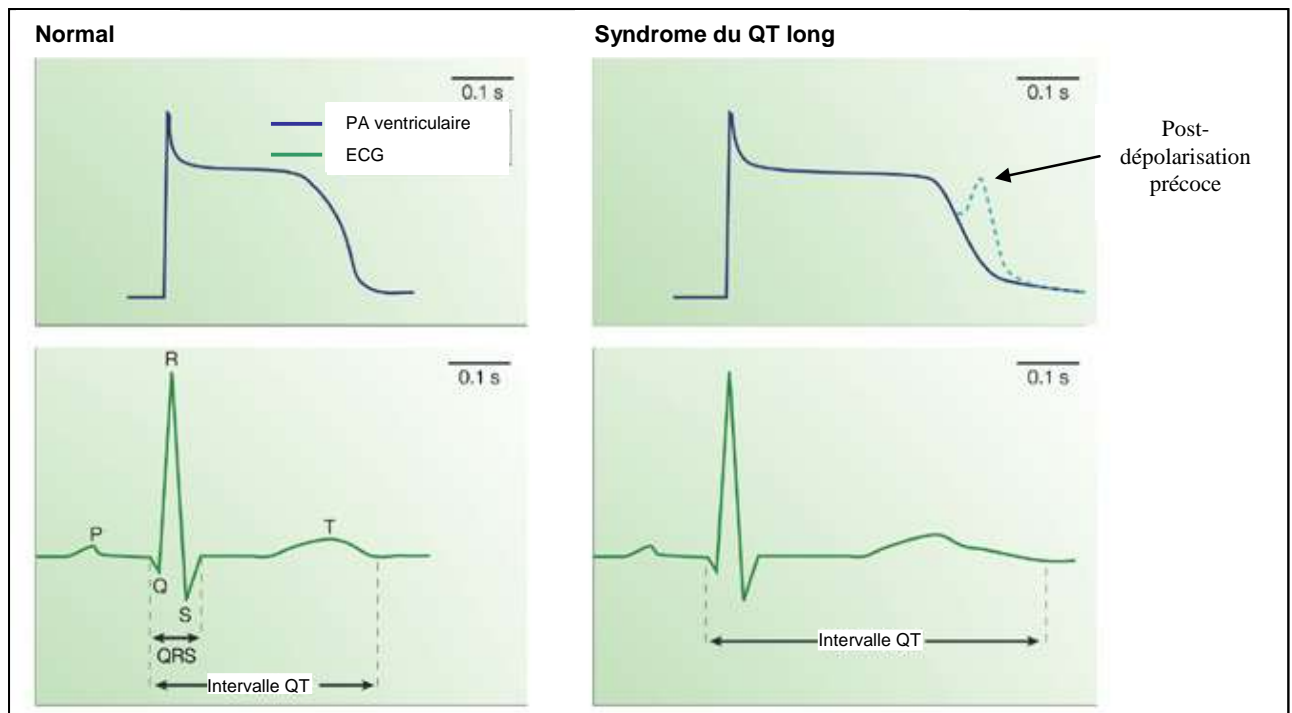
La prise en charge des patients atteints par le SBr est compliquée par un nombre important de médicaments susceptibles d'augmenter le risque rythmique chez ces personnes.

Ces molécules sont aujourd'hui répertoriées dans une revue accepté en juillet 2009 ainsi que sur le site : [www.brugadadrugs.org](http://www.brugadadrugs.org) [Postema *et al.* 2009].

Le SBr est une cause de mort subite importante chez les jeunes adultes dont le premier symptôme est le plus souvent la mort subite. Les traitements actuels n'offrent pas une totale efficacité notamment par le fait que le manque de marqueurs moléculaires fiables empêche une bonne stratification des risques et une prise en charge adaptée. Il reste un travail important d'identification des prédispositions (génétiques) aux arythmies capables d'aider à la prise de décision de l'implantation d'un défibrillateur, seule thérapie communément admise.

### III.2 Génétique du syndrome du QT long congénital

Le syndrome du QT long (SQTL) congénital est une entité clinique décrite il y a 50 ans, caractérisant un allongement de l'intervalle QT (temps entre le début du complexe QRS = dépolarisation des ventricules et la fin de l'onde T = repolarisation des ventricules) (cf. Annexe 1 : paragraphe I.3.2) reflétant une augmentation du temps de repolarisation ventriculaire. On observe alors un allongement de la durée du PA ventriculaire. Cette augmentation de la durée de repolarisation permet la survenue de post-dépolarisations précoces (*Early After Depolarization*) responsables d'arythmies ventriculaires polymorphes et en particulier des torsades de pointes pouvant aboutir à la mort subite par fibrillation (Figure 9) [Jervell et Lange-Nielsen 1957].



**Figure 9 – Schéma représentant un potentiel d'action ventriculaire et un tracé ECG dans une situation normale (à gauche) et chez un patient atteint d'un SQTL (à droite)**

Le PA ventriculaire correspond à la résultante de l'activité des canaux ioniques intervenant lors de la dépolarisation et de la repolarisation d'un cardiomyocyte ventriculaire. L'intervalle QT de l'ECG reflète l'activité électrique de surface lors de la repolarisation ventriculaire. Un allongement du PA et donc de l'intervalle QT permet la survenue de post-dépolarisations précoces pouvant entraîner des torsades de pointe et la mort subite. Modifié d'après [The Nature Reviews Drug Discovery Ion Channel Questionnaire Participants 2004]

### III.2.1 Epidémiologie et diagnostic du syndrome du QT long congénital

Sa prévalence est comprise entre 1 sur 5000 et 1 sur 2000 selon les études. La valeur de l'intervalle QT varie selon la fréquence cardiaque et doit être normalisée afin de pouvoir la comparer. Plusieurs formules permettent cette correction (QTc) mais la formule de Bazett reste la plus utilisée [Malik *et al.* 2008]. Les valeurs limites de la normale peuvent varier selon les publications : un QT peut être considéré comme anormal quand il sort des limites que sont 360 et 440 ms pour un homme et 370 et 460 ms pour une femme [Rautaharju *et al.* 1992; Viskin *et al.* 2004; Roden 2008b]. Le risque rythmique est d'autant plus important que la période QT est allongée.

Une prédominance féminine est observée dans toutes les études de grandes cohortes, environ 2/3 des patients atteints d'un QT long sont des patientes [Splawski *et al.* 2000; Tester *et al.* 2005; Imboden *et al.* 2006]. Physiologiquement leur intervalle QT est plus long que celui des hommes mais les causes de cette inégalité ne sont pas très bien connues. Dan Roden a démontré que les femmes avaient une réserve de repolarisation moins importante que les hommes, elles disposent de moins de potassium dans la cellules retardant ainsi la repolarisation [Roden 1998].

Une composante hormonale est également avancée puisque avant la puberté on ne constate pas de différence entre les intervalles QT des deux sexes [Rautaharju *et al.* 1992; Locati *et al.* 1998]. Un biais de transmission serait impliqué dans la forte prévalence féminine du SQT. L'équipe de Pascale Guicheney a en effet montré une hérédité non mendélienne des mutations dans les canaux potassiques. La transmission se fait préférentiellement vers les filles mais également par la mère [Imboden *et al.* 2006].

### III.2.2 Hétérogénéité génétique du syndrome du QT long congénital

Le SQT est sous-tendu par une grande hétérogénéité génétique : le SQT est appelé syndrome de Romano-Ward pour la forme dominante [Romano *et al.* 1963; Ward 1964], et syndrome de Jervell et Lange-Nielsen [Jervell *et Lange-Nielsen* 1957] pour la forme récessive plus grave et plus rare, où il est associé à une surdité [Schwartz *et al.* 2006]. Aujourd'hui plus de 600 mutations [Kapplinger *et al.* 2009] ont été décrites réparties sur 12 gènes : 5 codent des sous unités alpha de canaux ioniques *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNJ2* et *CACNA1C* et 7 codent des protéines régulatrices de ces mêmes canaux *ANKB*, *KCNE1*, *KCNE2*, *CAV3*, *SCN4B*, *AKAP9* et *SNTA1* (Tableau 4 ; Figure 10).



**Tableau 4 – Gènes identifiés dans le syndrome du QT long congénital (SQTL)**

	% patients SQTL	Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
<b>SQTL1</b>	30-35%	11p15.5 <sup>a</sup>	<i>KCNQ1</i> <sup>b</sup>	K <sub>v</sub> LQT1 ou K <sub>v</sub> 7.1 (canal potassique α), repolarisation/I <sub>Ks</sub>	- I <sub>Ks</sub>	AD, Sp, Acq
<b>SQTL2</b>	25-30%	7q35-q36 <sup>c</sup>	<i>KCNH2</i> <sup>d</sup>	hERG ou K <sub>v</sub> 11.1 (canal potassique α), repolarisation/I <sub>Kr</sub>	- I <sub>Kr</sub>	AD, Sp, Acq
<b>SQTL3</b>	5-10%	3p21 <sup>e</sup>	<i>SCN5A</i> <sup>e</sup>	Na <sub>v</sub> 1.5 (canal sodique α), dépolarisation/I <sub>Na</sub>	I <sub>Na</sub>	AD, Sp, Acq
<b>SQTL4</b>	rare	4q25-q27 <sup>f</sup>	<i>ANK2</i> <sup>g</sup>	ankyrine-B, ancrage/I <sub>Na/Ca</sub>	multiple	AD
<b>SQTL5</b>	~1%	21q22.12	<i>KCNE1</i> <sup>h</sup>	minK ou Isk (canal potassique β), repolarisation/I <sub>Ks</sub>	- I <sub>Ks/Kr</sub>	AD, Sp
<b>SQTL6</b>	rare	21q22.12	<i>KCNE2</i> <sup>i</sup>	MiRP1 (canal potassique β), repolarisation/I <sub>Kr</sub>	- I <sub>Kr</sub>	AD, Sp
<b>SQTL7</b>	rare	17q23.1-q24.2	<i>KCNJ2</i> <sup>j</sup>	Kir2.1 (canal potassique α), repolarisation/I <sub>K1</sub>	- I <sub>K1</sub>	AD, Sp
<b>SQTL8</b>	rare	12p13.3	<i>CACNA1C</i> <sup>k</sup>	Ca <sub>v</sub> 1.2 (canal calcique α1C), dépolarisation/I <sub>Ca-L</sub>	I <sub>Ca-L</sub>	AD, Sp
<b>SQTL9</b>	rare	3p25	<i>CAV3</i> <sup>l</sup>	cavéoline-3, signalisation intracellulaire et ancrage au niveau des cavéoles	I <sub>Na</sub>	Sp
<b>SQTL10</b>	rare	11q23.3	<i>SCN4B</i> <sup>m</sup>	Na <sub>v</sub> β4 (canal sodique β4), I <sub>Na</sub>	I <sub>Na</sub>	AD
<b>SQTL11</b>	rare	7q21-q22	<i>AKAP9</i> <sup>n</sup>	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao)	- I <sub>Ks</sub>	Sp
<b>SQTL12</b>	rare	20q11.2	<i>SNTA1</i> <sup>o</sup>	syntrophin, alpha 1	I <sub>Na</sub>	Sp
<b>JLN1</b>	rare	11p15.5	<i>KCNQ1</i> <sup>p,q</sup>	K <sub>v</sub> LQT1 ou K <sub>v</sub> 7.1 (canal potassique α), repolarisation/I <sub>Ks</sub>	- I <sub>Ks</sub>	AR
<b>JLN2</b>	rare	21q22.12	<i>KCNE1</i> <sup>r</sup>	minK ou Isk (canal potassique β), repolarisation/I <sub>Ks</sub>	- I <sub>Ks</sub>	AR

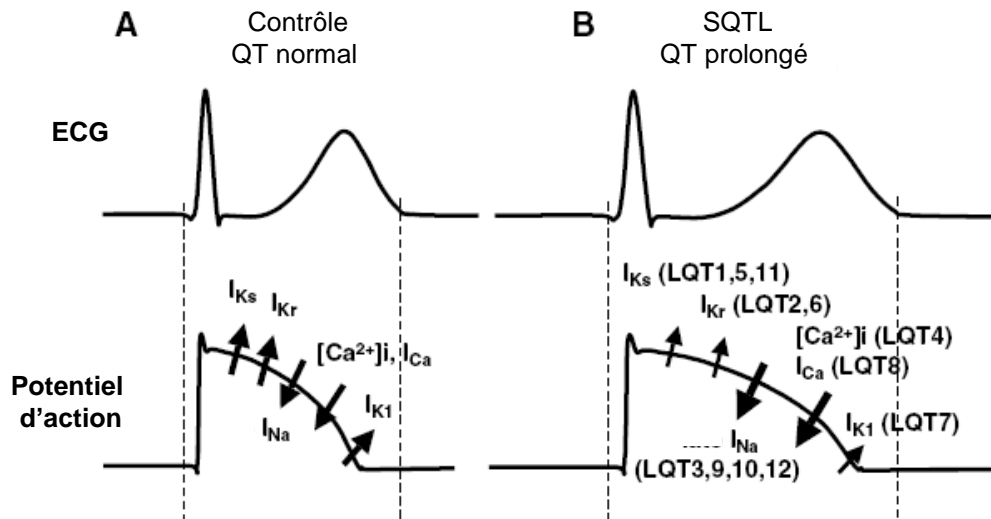
*JLN* : Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen, *AD* : Autosomique dominant, *AR* : Autosomique récessif, *Sp* : Sporadique, *Acq* : Acquis. **Références** : a = [Keating et al. 1991]; b = [Wang et al. 1996]; c = [Jiang et al. 1994]; d = [Curran et al. 1995]; e = [Wang et al. 1995b]; f = [Schott et al. 1995]; g = [Mohler et al. 2003]; h = [Splawski et al. 1997]; i = [Abbott et al. 1999]; j = [Plaster et al. 2001]; k = [Splawski et al. 2004]; l = [Vatta et al. 2006]; m = [Medeiros-Domingo et al. 2007]; n = [Chen et al. 2007]; o = [Ueda et al. 2008]; p = [Neyroud et al. 1997]; q = [Splawski et al. 1997]; r = [Schulze-Bahr et al. 1997].



**Figure 10 – Dessin représentant la douzaine de gènes associés au 12 formes de syndrome du QT long (SQTL1-12)**

Sont écrits en rose des trois principaux gènes impliqués dans le SQTL. La couleur des œufs correspond à la fonction du gène : rose pale : rôle dans un canal potassique, bleu : rôle dans un canal sodique, ivoire : rôle dans un canal calcique et vert : rôle dans le cytosquelette. Modifié d'après [Webster et Berul 2008]

Les études fonctionnelles de certaines de ces mutations ont montré des pertes ou des gains de fonction compatibles avec un allongement de la durée du potentiel d'action (Figure 11). Selon les études, on estime entre 50% et 80% la probabilité d'apporter un diagnostic génétique pour un patient [Splawski *et al.* 2000; Napolitano *et al.* 2005; Tester *et al.* 2005]. Près de 90% de ces mutations sont concentrées dans les gènes codant les sous unités alpha et bêta des canaux potassiques respectivement  $K_v$ LQT1 (42-50%), hERG (34-45%) et MinK (1-2%), MIRP (1%).

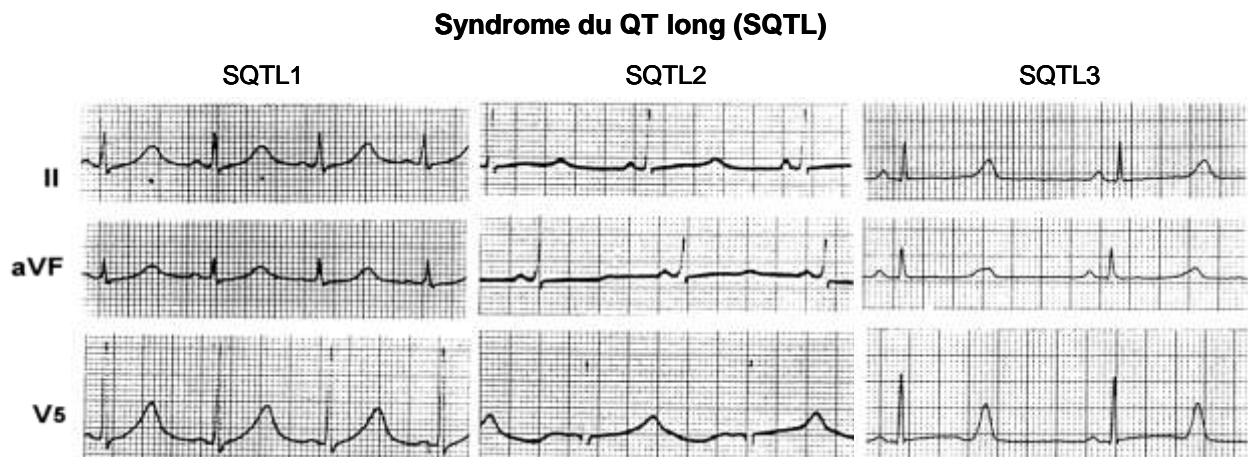


**Figure 11 – Mécanismes ioniques de la prolongation de l'intervalle QT des formes 1 à 12**

La diminution du courant potassique sortant ou augmentation du courant entrant sodique ou calcique prolonge la durée du potentiel d'action, résultant en un allongement de l'intervalle QT. ECG. Modifié d'après [Shimizu 2008]

Le SQTL est probablement la pathologie rythmique héréditaire où la relation génotype phénotype est la mieux établie. Cette connaissance des liens entre le gène impliqué et la maladie permet une meilleure prise en charge des patients symptomatiques mais aussi des apparentés « pré » symptomatiques. En effet, à chaque type de SQTL, de 1 à 12, un gène est associé, un élément déclencheur d'arythmie décrit et parfois une thérapie adaptée. Un tracé électrocardiographique typique peut orienter le diagnostic moléculaire vers le séquençage d'un

gène précis en première intention [Morita *et al.* 2008]. Trois types d'ECG sont présentés ci-dessous, chacun possèdent une morphologie de l'onde T particulière conduisant à 3 diagnostics moléculaires différents (Figure 12).



**Figure 12 – ECG caractéristiques du syndrome du QT long**

Types 1 (onde T à large base), 2 (onde T de faible amplitude en DII et léger aspect en double bosse), 3 (onde T tardive avec long segment ST). Modifié d'après [Moss *et al.* 1995]

### III.2.2.1 Les syndromes du QT long de type 1 et 5 : perte de fonction du courant $I_{Ks}$

Les SQTL de type 1 et 5 sont la conséquence de mutations dans les gènes *KCNQ1* et *KCNE1* respectivement. Le gène *KCNQ1*, cloné par Wang en 1996, a été isolé suite à une approche d'analyse de liaison par Keating en 1991 qui a mis en évidence une région co-ségrégant avec le phénotype chez 7 familles [Keating *et al.* 1991; Wang *et al.* 1996]. Le gène *KCNE1* a été découvert comme impliqué dans le SQTL par une approche gène candidat [Splawski *et al.* 1997] suite à deux études publiées dans la revue Nature en 1996 [Sanguinetti *et al.* 1996; Barhanin *et al.* 1996]. Elles montrent que la protéine MinK codée par *KCNE1* est la sous unité bêta associée à  $K_vLQT1$  responsable du courant  $I_{Ks}$ . Ce courant (I) potassique (K) rectifiant a une composante lente (Slow) et participe à la phase 3 de repolarisation du potentiel d'action cardiaque ventriculaire (Figure 11). Les mutations perte de fonction retrouvées dans ces deux gènes expliquent entre 25 et 30% des SQTL congénitaux [Splawski *et al.* 2000; Tester *et al.* 2005]. A l'état homozygote ou hétérozygote composite ces variants sont responsables d'un phénotype beaucoup plus sévère avec un allongement de l'intervalle QT très prononcé, un risque de mort subite accru et une surdité. Ce cas particulier de SQTL a été décrit antérieurement comme le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen. Le SQTL de type 1 ou 5 a un aspect électrocardiographique typique par son onde T très large ce qui permet de cibler l'analyse moléculaire vers les gènes *KCNQ1* et *KCNE1* (Figure 12). Un aspect caractéristique du SQTL de type 1 ou 5 est le déclenchement d'arythmies parfois fatales dans un contexte de

stress émotionnel ou à une activité sportive et plus particulièrement la natation. Un traitement médicamenteux permet de réduire de 90% le risque de survenu d'arythmie : il s'agit de la prise de bêta bloquant cohérent avec la sensibilité adrénargique du courant  $I_{ks}$  [Priori *et al.* 2004; Morita *et al.* 2008] limitant ainsi les décharges d'adrénaline déclencheurs d'arythmies. Les patients ne répondant pas à ce traitement se voient confrontés à la décision de l'implantation d'un défibrillateur automatique.

### III.2.2.2 Les syndromes du QT long 2 et 6 : perte de fonction du courant $I_{kr}$

Les courants  $I_k$  participent à la phase de repolarisation du coeur et permettent le retour du potentiel de membrane à sa valeur de repos (Figure 11). Sa composante rapide appelé  $I_{kr}$ , qui a pour origine le canal hERG codé par le gène *KCNH2* pour sa sous unité alpha et MIRP codé par *KCNE2* pour sa sous unité bêta est diminuée chez les patients atteints respectivement d'un SQTl de type 2 ou 6. Des mutations perte de fonction dans le gène *KCNH2* ont été décrites pour la première fois en 1995 [Curran *et al.* 1995] et dans le gène *KCNE2* en 1999 [Abbott *et al.* 1999]. Ces variants sont retrouvés aujourd'hui à une fréquence située entre 20 et 30 % chez les patients atteints d'un SQTl [Splawski *et al.* 2000; Tester *et al.* 2005]. Sur l'ECG, le SQTl de type 2 ou 6 se différencie par une onde T biphasique et sur un plan arythmogène les fibrillations sont déclenchées le plus souvent par des stimuli sonores comme les alarmes de réveil (Figure 12). La performance des  $\beta$ -bloquants dans ce cas est moins bonne puisque 23% des patients observent une récurrence de leur trouble du rythme.

### III.2.2.3 Les syndromes du QT long de type 3, 9, 10 et 12 : gain de fonction du courant $I_{Na}$

A l'image du SBr, la survenue de trouble du rythme et de mort subite s'observe majoritairement pendant le sommeil ou les périodes de repos [Schwartz *et al.* 2001]. A l'inverse, le mécanisme moléculaire déclenchant l'arythmie vient d'une augmentation de courant  $I_{Na}$  provoqué par des mutations gain de fonction dans le gène *SCN5A* codant la sous unité  $\alpha$  du canal sodique cardiaque [Wang *et al.* 1995b] (Figure 11). Ces mutations expliquent entre 5 et 8% des cas [Splawski *et al.* 2000; Tester *et al.* 2005]. Elles entraînent un courant sodique persistant prolongeant la phase de plateau du potentiel d'action qui se traduit par un allongement du segment ST et une apparence tardive de l'onde T sur l'ECG (Figure 12).

Des mutations dans des protéines partenaires et/ou régulatrices de  $Na_v1.5$  ont été décrites et mènent au même phénotype.

Quatre variants dans un gène codant une protéine non canalaire, la Cavéoline-3 (*CAV3*) (SQTl9) ont été associés à une augmentation du courant  $I_{Na}$  chez des patients souffrant de

SQTL. Le mécanisme d'altération du courant  $I_{Na}$  par la CAV3 n'est pas déterminé, cependant la co-immunoprécipitation de CAV3-WT ou mutée et  $Na_v1.5$  suggère que l'interaction directe ou indirecte n'est pas altérée [Vatta *et al.* 2006]. Une des hypothèses avancée est celle d'une modification de régulation au travers du récepteur  $\beta$  adrénergique de type 2 qui à la fois co-localise avec la CAV3 et phosphoryle au travers de la protéine kinase A le canal sodique cardiaque [Rybin *et al.* 2000]. En effet, chez une patiente, on observe une majoration de l'allongement de son QT après l'inhalation d'un agoniste  $\beta_2$  adrénergique traitant son asthme.

Medeiros-Domingo *et al.* ont montré en 2007 la morbidité du variant L179F dans le gène *SCN4B* (SQT10) codant la sous-unité  $\beta_4$  de  $Na_v1.5$ . Les études électrophysiologiques menées pour tester l'effet fonctionnel de ce variant montrent une perte de fonction de la sous-unité  $\beta_4$ , se traduisant par un gain de fonction de  $Na_v1.5$  et par conséquent une augmentation de courant  $I_{Na}$  [Medeiros-Domingo *et al.* 2007].

Trois patients atteints du SQTL présentent le variant p.A257G dans le gène *SNTA1* (SQT12) codant la syntrophine- $\alpha_1$ . Il s'agit d'une protéine cytoplasmique sous membranaire appartenant au complexe Dystrophine [Guglieri *et al.* 2005]. L'étude gène candidat menée sur le gène *SNTA1* vient du travail de Ou *et al.* qui montrent que la cinétique d'ouverture de  $Na_v1.5$  est modifiée par l'interaction avec la syntrophine- $\gamma_2$ . Cette dernière interagit avec le canal sodique par son domaine de fixation PDZ et possède des similarités avec *SNTA1* [Ou *et al.* 2003]. L'équipe d'Hugues Abriel est venue compléter ces données en démontrant des interactions entre  $Na_v1.5$  et des protéines du complexe dystrophine dont la syntrophine- $\alpha_1$  chez la souris *mdx<sup>5cv</sup>* [Gavillet *et al.* 2006]. La mutation *SNTA1*-p.A257 conduirait à une perte de fonction de la protéine, perdant ainsi sa capacité à pouvoir réguler négativement le courant  $I_{Na}$ .

Une étude de la fréquence des mutations dans ces trois derniers gènes permettront de conclure sur leur taux d'implication dans le SQTL congénital. Cependant, au vu du nombre de patients génotypés ces gènes ne semblent expliquer qu'une minorité de SQTL.

Les thérapies pour les SQTL de type 3, 9 10 et 12 restent délicates puisque l'usage de  $\beta$ -bloquants ne permet pas de réduire significativement le nombre de syncopes et de morts [Priori *et al.* 2004]. La décision d'utiliser des bloqueurs de canaux sodiques est difficile à prendre puisque la mexiletine ou la flécaïnide normalise la durée du QTc [Benhorin *et al.* 2000; Moss *et al.* 2005] mais augmente le risque de mort subite chez les patients possédant également un SBr [Priori *et al.* 2000b]. L'implantation de défibrillateur automatique est recommandée chez les patients à risque (QTc>500ms, symptomatiques et ne répondant pas aux traitements pharmacologiques).

#### III.2.2.4 Le syndrome du QT long de type 4

Le SQT4 possède un spectre phénotypique plus large que les précédents : au QT long atypique s'ajoutent une dysfonction sinusale se manifestant par une bradycardie marquée chez 90% des patients dès la naissance et une fibrillation auriculaire conséquente chez l'adulte, ainsi qu'une morphologie particulière de l'onde T, sinusoïdale [Schott *et al.* 1995]. Ce phénotype particulier est la conséquence de mutations dans une protéine intermédiaire, l'ankyrin B codée par le gène *ANK2*, qui fait le lien entre le cytosquelette et des protéines membranaires du type canaux ioniques, échangeurs, transporteurs et pompes [Hayashi *et Su* 2001; Cunha *et al.* 2007]. Un travail de Peter Mohler sur des cardiomyocytes de souris *Ankb<sup>+/-</sup>* a montré qu'une perte de fonction de ANKB modifiait la signalisation calcique [Mohler *et al.* 2003]. Plus précisément il s'agit d'une rupture de l'organisation cellulaire de la pompe sodium Na/K ATPase, de l'échangeur Na/Ca, et du récepteur à l'InsP(3) par une altération de leur ciblage et dans une moindre mesure de leur quantité (Figure 11).

Ces premières descriptions faisaient suite à la découverte de la première mutation (E1425G) de L' *ANK2* [Mohler *et al.* 2003]. Aujourd'hui 8 patients supplémentaires, touchés par des mutations de ce même gène, ont conduit à requalifier le SQT4 en « syndrome ankyrine-B » (OMIM 600919) du fait de l'hétérogénéité phénotypique rencontrée. En effet la présence d'un intervalle QT allongé n'est pas systématiquement constatée.

Les syncopes et morts subites constatées font suite à un stress émotionnel ou à de l'exercice. A ce jour aucun traitement pharmacologique spécifique n'a été indiqué pour les patients souffrant d'un « syndrome ankyrine-B », seule la pose d'un stimulateur cardiaque permet de pallier au caractère arythmogène de la bradycardie.

#### III.2.2.5 Le syndrome du QT long de type 7 : perte de fonction du courant $I_{K1}$

Le SQT7 est une forme syndromique, il est appelé également syndrome d'Andersen de type 1. Il se caractérise par une paralysie périodique, une prolongation de l'intervalle QT et des traits physiques particuliers : petite taille, scoliose, oreilles bas implantées, hypertélorisme, racine du nez large, micrognathie, clinodactylie, brachydactylie, syndactylie [Plaster *et al.* 2001; Tristani-Firouzi *et al.* 2002]. Le gène *KCNJ2* code la protéine Kir2.1 responsable du courant  $I_{K1}$ , utile en fin de repolarisation pour maintenir le potentiel de repos de la cellule. Les mutations de ce gène prolongent la durée du PA entraînant une surcharge de calcium et par conséquent, une activation de l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  capable de déclencher une post dépolarisation tardive à l'origine de torsade de pointe (Figure 11). Bêta-bloquants et bloqueurs de canaux calciques

sont utilisés en première intention et la décision d'implanter un défibrillateur automatique est prise chez les patients présentant des syncopes ou des morts subites récupérées.

#### *III.2.2.6 Le syndrome du QT long de type 8 : gain de fonction du courant $I_{Ca,L}$*

Le SQT8 est également dénommé syndrome de Timothy ; il rassemble un large spectre de malformations, parfois des signes d'autismes et des troubles du rythme. On retrouve chez ces patients un allongement de l'intervalle QT, parfois des blocs auriculo-ventriculaires 2 :1, des tachycardies ventriculaires polymorphes et des torsades de pointe. On estime à une vingtaine le nombre d'individus atteints du syndrome de Timothy avec une étonnante homogénéité génétique puisque le variant de novo *CACNA1C*-G406R est retrouvé systématiquement [Splawski *et al.* 2004]. Seul un patient, au phénotype cardiaque particulier car très sévère possède la mutation G402S [Splawski *et al.* 2005]. Ces 2 mutations gain de fonction retrouvées dans la même région du canal calcique  $Ca_v1.2$  soulignent l'importance de celle-ci dans la régulation de l'activité du canal. Splawski *et al.* suggèrent que cette région jouerait un rôle de charnière et donc de fermeture lors de l'inactivation du canal calcique  $Ca_v1.2$ . Sa mutation laisserait le pore du canal ouvert expliquant le gain de fonction (Figure 11). Cette surcharge de calcium intracellulaire peut induire des relargages de  $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique, l'activation des échangeurs  $Na^+/Ca^{2+}$  et le déclenchement de post-dépolarisations précoce et tardive à l'origine des torsades de pointe et de la mort subite. Des bloqueurs de canaux calciques ont été utilisés pour réduire cette surcharge mais ne permettent pas de diminuer l'allongement du QT [Napolitano *et al.* 2006]. Devant la sévérité des troubles du rythme, l'implantation d'un défibrillateur automatique est souvent requise.

#### *III.2.2.7 Diagnostic moléculaire négatif pour 25% des patients atteints par le SQT8 : hypothèses*

Après criblage des gènes connus à ce jour par les techniques de séquençage classique ou de recherche d'hétéroduplex, 25% des patients n'ont pas de diagnostic moléculaire associé à leur SQT8. Une des hypothèses est que la mutation soit bien dans un des gènes connus mais ne soit pas détectable par les techniques classiquement utilisées. Des mutations dans des régions non codantes [Zhang *et al.* 2004; Crotti *et al.* 2009] ou l'existence de réarrangements dans ces gènes pourraient expliquer une partie des phénotypes. A ce jour 4 grands réarrangements sans ségrégation familiale ont été décrits [Bisgaard *et al.* 2006; Eddy *et al.* 2008], seuls les travaux de Tamara Koopman ont permis de montrer une ségrégation d'une duplication en tandem de 2 exons [Koopmann *et al.* 2006]. La fréquence de ces variations génomiques reste à étudier. Une seconde hypothèse serait que les mutations soient situées

dans des gènes encore inconnus. Une 3<sup>ème</sup> explication serait la présence de polymorphismes au niveau des amorces de PCR qui empêchent l'amplification de l'allèle muté [Tester *et al.* 2006].

Enfin on ne peut exclure l'existence clinique d'un faux positif (QT long acquis) qui présenterait un intervalle QT long suite à une prise de médicament ou à un état physiopathologique transitoire [Roden *et Viswanathan* 2005].

### III.2.3 Relation génotype/phénotype

Les études familiales révèlent souvent une pénétrance incomplète des mutations, dès 1992 Vincent *et al.* observaient que la durée de l'intervalle QT entre le groupe porteur de la mutation et non porteur ne formait pas deux ensembles distincts [Vincent *et al.* 1992]. En effet les valeurs de la durée de l'intervalle QTc se chevauchaient de part et d'autres de la limite de la normale. Le groupe de Peter Schwartz a étudié la pénétrance de 4 mutations du gène *KCNQ1* dans 4 familles et de 4 mutations du gène *KCNH2* dans 5 familles. Dans 4 cas il s'agit d'une mutation de novo et dans les 5 cas restant la pénétrance oscille entre 25 et 60% [Priori *et al.* 1999]. Ce même groupe montre, dans un travail plus récent que la pénétrance est plus importante dans le SQT1 et SQT2, respectivement 70 et 79%, par rapport au SQT3 et SQT4, respectivement 55 et 33%, [Napolitano *et al.* 2005]. Ces données suggèrent que la prévalence du SQT est probablement sous estimée et serait plus proche de 1/2500 [Modell *et Lehmann* 2006].

La variabilité des phénotypes observés pose la question d'un modèle plus complexe que la simple relation génotype/phénotype égale « une mutation/un phénotype ». Une première explication est la mise en évidence d'hétérozygotes composites chez 3,5 à 5% des patients mutés et d'une forme de doubles hétérozygotes chez 6 à 8% [Napolitano *et al.* 2005; Tester *et al.* 2005]. Westenskow *et al.* ont montré que leur intervalle QT est encore plus allongé et qu'ils étaient sujets à de plus sévères troubles du rythme par rapport aux porteurs d'une seule mutation [Westenskow *et al.* 2004]. Le séquençage systématique des principales formes de SQT devrait-il être alors envisagé systématiquement ? Quelques centres de diagnostic génétique séquençent l'ensemble de leurs patients pour les 3 gènes majeurs : *KCNQ1*, *KCNH2* et *SCN5A* regroupant environ 95% des mutations retrouvées. Ce travail permet d'identifier une double mutation dans environ 10% des cas [Kapplinger *et al.* 2009]. Il aurait pour objectif d'optimiser la prise en charge du patient (adapter la thérapeutique en fonction des gènes impliqués) et la prévention chez les apparentés mutés pour un des deux voire pour les deux gènes ?



Ces variants à effet fort peuvent voir leurs conséquences phénotypiques modulées par des variants génétiques fréquents à effet faible. Cela constitue une des hypothèses pour expliquer l'héritabilité de la durée de l'intervalle QT : 25 à 60% [Russell *et al.* 1998; Carter *et al.* 2000; Newton-Cheh *et al.* 2005; Dalageorgou *et al.* 2008]. Plusieurs travaux montrent l'implication de variants à effet faible sur la durée du QT : la présence ou l'absence du variant fréquent SCN5A-p.H558R modifie de manière importante l'effet fonctionnel de la mutation SQT3 SCN5A-p.M1766L [Ye *et al.* 2003]. Une des approches pour rechercher ces variants à effet mineur est l'étude d'association à l'aide de puces pangénomiques SNP.

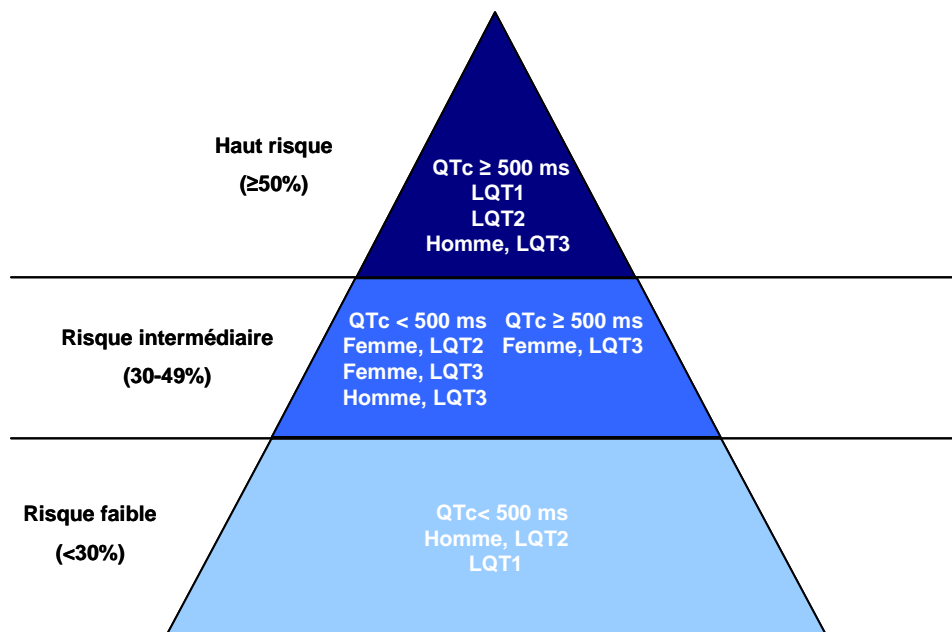
Par cette méthode, deux consortium ont recherché une corrélation entre des SNPs répartis sur l'ensemble du génome et la durée de l'intervalle QT dans la population générale. Le QTGen consortium regroupe 13685 individus (QTGen consortium regroupe les populations de la Framingham Heart Study, Rotterdam Study et Cardiovascular Health Study) et la QTSCD Study rassemble 15842 individus (QTSCD Study regroupe les populations ARIC, KORA, SardinIA, GenNOVA et HNR). Des résultats préliminaires d'une de ces études d'association de grandes cohortes avaient montré une corrélation entre des SNPs de la région du gène *NOS1AP* avec la durée de l'intervalle QT. L'effet de ce modulateur sur la variation de l'intervalle QT dans la population générale serait de 1,5% [Arking *et al.* 2006]. Depuis, 7 études ont répliqué et confirmé cette association et l'implication de la voie de signalisation de l'oxyde nitrique dans la fonction cardiaque [Aarnoudse *et al.* 2007; Post *et al.* 2007; Tobin *et al.* 2008; Marjamaa *et al.* 2009; Eijgelsheim *et al.* 2009; Raitakari *et al.* 2009; Arking *et al.* 2009]. En avril 2009, ont été publiées « back to back » dans la revue Nature Genetics l'ensemble des résultats de ces deux études d'associations. La taille des populations (environ 15000 individus) a permis d'isoler chacun 10 loci influençant la durée de l'intervalle QT. Huit loci sont partagés par les deux études seuls 2 sont propres à chacune. Sur ces 12 loci mis en évidence, 6 sont situés dans des régions de gènes déjà identifiés pour des variants à effets fort (*KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2*, *SCN5A* et *KCNJ2*) ou faible (*NOS1AP*) [Pfeufer *et al.* 2009; Newton-Cheh *et al.* 2009]. Une méta analyse de ces deux études est en cours afin d'augmenter la puissance de l'étude et d'isoler de nouveaux variants à effets, théoriquement, plus faible. Les premiers résultats ont été publiés en juillet dernier avec la confirmation de l'implication de SNPs dans le gène *NOS1AP* et *PLN* responsable respectivement de 0,82 et 0,74% de la variance de la durée de l'intervalle QT

### III.2.4 Stratification du risque

Le SQT3 est probablement la pathologie des troubles du rythme héréditaires la plus avancée concernant sa relation génotype/phénotype. Au-delà de ses 12 gènes décrits à ce jour, la prise en charge a également évolué en proposant une thérapie adaptée en fonction du gène

impliqué, ce qui a eu pour conséquence de diminuer considérablement le nombre de morts subites [Markiewicz-Loskot *et al.* 2009].

Le groupe d'Arthur Moss a stratifié le risque des patients selon la position des mutations dans les gènes *KCNQ1* et *KCNH2*. Pour les gènes codant des canaux ioniques, la présence de mutations dans le pore engendre un plus grand risque d'arythmies. L'effet dominant négatif dans le SQT1 multiplie par 2 le risque de survenue d'arythmies et conduit à un phénotype plus sévère [Moss *et al.* 2002; Moss *et al.* 2007]. Ce diagnostic moléculaire peut venir en aide à la prise de décision d'implanter un défibrillateur automatique. L'histoire clinique du patient oriente sa classification en 3 groupes : le premier groupe a une faible probabilité, le second a une probabilité intermédiaire et le dernier a une forte probabilité d'être symptomatique avant 40 ans et avant traitement [Priori *et al.* 2003] (Figure 13). Les critères de stratification sont le genre, les antécédents personnels de syncope ou de mort subite récupérée et la longueur de l'intervalle QT. Le risque rythmique n'est pas augmenté si un des apparentés a été victime d'une mort subite [Kaufman *et al.* 2008]. De même le risque n'est pas diminué après l'âge de 40 ans [Goldenberg *et al.* 2008].



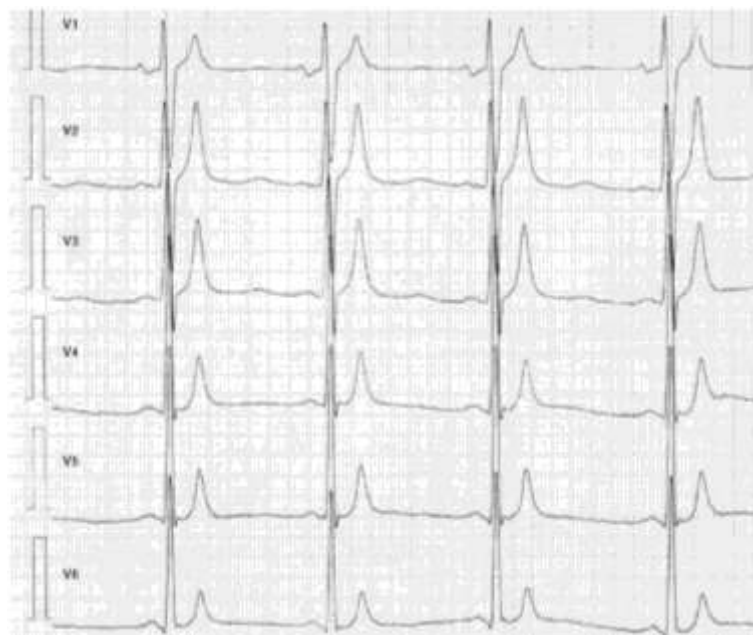
**Figure 13 – Stratification du risque parmi les patients atteints d'un syndrome du QT long selon leur génotype et le sexe**

Les groupes ont été définis sur la probabilité de survenue d'un premier évènement cardiaque (syncope, arrêt cardiaque ou mort subite) avant l'âge de 40 ans et avant traitement. Une probabilité de 50% ou plus définit le groupe à haut risque, un risque compris entre 30 et 49% définit le groupe au risque intermédiaire et un risque inférieur à 30% constitue le groupe à faible risque. Modifié d'après [Priori *et al.* 2003].

### III.3 Génétique du syndrome du QT court congénital

#### III.3.1 Epidémiologie et diagnostic du syndrome du QT long congénital

Physiologiquement, la durée de l'intervalle QT diminue avec l'augmentation du rythme cardiaque. Les patients souffrant d'un syndrome du QT court (SQTC) n'ont plus cette adaptabilité. Cette diminution de l'intervalle QT observé sur l'ECG reflète un raccourcissement de la période de repolarisation et du potentiel d'action ventriculaire. En cela le SQTC est l'image miroir du SQTl congénital. Sur un plan clinique également, les valeurs de QT sont situées à l'extrémité opposée de celles du QT long. Aucun consensus n'est encore admis, on parle d'intervalle QT raccourci en dessous de 360 ms et d'un intervalle QT court quand il est inférieur à 320 ms [Viskin 2009]. Une des causes probables de cette discussion est la rareté de ce syndrome. Dans la population générale l'incidence d'un QT raccourci inférieur à 350 ms varie de 0.01 à 2.5% [Rautaharju *et al.* 1992; Moriya *et al.* 2007; Anttonen *et al.* 2007]. Un intervalle QT raccourci ne permet pas de prédire à lui seul le risque rythmique. Cependant lorsqu'il est accompagné de fibrillation auriculaire, de syncope inexplicquée, de fibrillation ventriculaire ou d'une histoire familiale de mort subite alors le SQTC peut être évoqué. La corrélation entre un raccourcissement de l'intervalle QT, les arythmies et la mort subite date seulement de 2000 [Gussak *et al.* 2000]. L'aspect électrocardiographique est caractéristique, en plus du QTc inférieur à 360 ms, on observe un court voire une absence du segment ST, une onde T singulière : haute, étroite et symétrique dans les dérivations précordiales (Figure 14).



**Figure 14 – ECG caractéristiques du syndrome du QT court**

Onde T singulière : haute, étroite et symétrique dans les dérivations précordiales. D'après [Schimpf *et al.* 2008]

### III.3.2 Hétérogénéité génétique du syndrome du QT court congénital :

#### image miroir du SQT

Les formes de SQTc ayant une explication moléculaire sont rares, 7 mutations différentes ont été décrites à ce jour. Elles forment l'hétérogénéité du syndrome puisqu'elles sont réparties sur 5 gènes déjà identifiés dans le SQT.

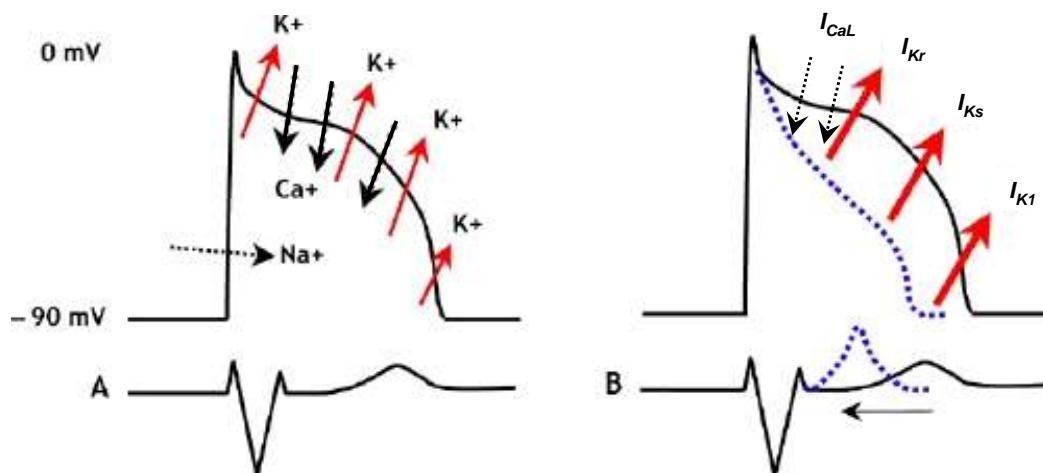
La mutation p.N588K dans le gène *KCNH2* (SQTc1) fut la première décrite, elle entraîne un gain de fonction de la protéine hERG et une augmentation du courant  $I_{kr}$ . La conséquence est un raccourcissement du PA et de la période réfractaire. Cette mutation touche deux familles dans lesquelles on retrouve une fibrillation auriculaire et une histoire familiale de mort subite [Brugada *et al.* 2004]. A noter que le SQT compte parmi ses mutations la substitution d'une asparagine en acide aspartique en position 588 (N588D) menant à une perte de fonction du courant  $I_{kr}$  et un SQT2 [Curran *et al.* 1995] (Figure 15).

En collaboration avec l'équipe de Connie Bezzina, nous avons pu associer le SQTc d'un patient isolé à la mutation p.V307L du gène *KCNQ1* (SQTc2). La réexpression de ce variant montre une augmentation du courant  $I_{ks}$  qui explique le QTc du patient à seulement 302ms [Bellocoq *et al.* 2004]. Un variant *de novo* dans ce gène p.V141M a été rapporté comme responsable de la fibrillation auriculaire et le SQTc par un gain de fonction du courant  $I_{ks}$  [Hong *et al.* 2005] (Figure 15).

Le pendant du SQT7 a été publié par Priori *et al.*, la mutation *KCNJ2*-p.D172N (SQTc3) a été retrouvée chez un homme et sa fille au QTc inférieur ou égal à 320 ms. L'étude électrophysiologique montre un gain de fonction du courant  $I_{k1}$  repolarisant expliquant le phénotype [Priori *et al.* 2005] (Figure 15).

En 2007, un projet mené par Charles Antzelevitch a abouti à l'identification de deux gènes supplémentaires *CACNA1C* (SQTc5) et *CACNB2* (SQTc4) codant respectivement la sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$ . Trois mutations (*CACNA1C*-p.A36V, *CACNA1C*-p.G490R et *CACNB2*-p.S481L), au phénotype particulier ont été rapportées car les patients présentent en plus de leur raccourcissement de leur intervalle QT un SBr. Cette fois-ci la perte de fonction du canal  $Ca_v1.2$  fait opposition au SQT8 où des mutations gain de fonction expliquent l'extrême longueur de l'intervalle QT [Antzelevitch *et al.* 2007] (Figure 15).

L'hétérogénéité du raccourcissement du PA dans le myocarde généré par ces défauts génétiques peut être le substrat d'un gradient transmural à l'origine d'arythmie ventriculaire pouvant conduire à la mort subite.



**Figure 15 – Potentiel d'action ventriculaire chez un sujet sain et atteint d'un SQTC**

A. Représentation schématique d'un potentiel d'action normal et des flux ioniques. B. Avec un gain de fonction des courants potassiques ou une perte de fonction du courant calcique  $I_{CaL}$  la durée du potentiel d'action se raccourcit et l'intervalle QT diminue. Modifié d'après [Brugada et al. 2005].

### III.3.3 Traitement

Schimpf *et al.* ont passé en revue les différentes tentatives de thérapie pharmacologique [Schimpf *et al.* 2008]. Les bloqueurs du courant  $I_{kr}$  tels le sotalol ou l'ibutilide ne prolongent pas l'intervalle QT. Les flécaïnides, bloqueurs des canaux sodiques, sont connus pour avoir également une action sur les courants  $I_{kr}$  et  $I_{to}$ , mais ne permettent qu'une petite augmentation de l'intervalle QT. Seule la quinidine, antiarythmique de classe Ia, permet une réadaptation de la durée du QT au rythme cardiaque, une prolongation de la période réfractaire, et de l'intervalle QT peut-être par son action sur  $I_{ks}$  [Gaita *et al.* 2004; Wolpert *et al.* 2005b]. Malgré le faible nombre de patients et le manque de compréhension du mécanisme d'action de la quinidine, son utilisation semble être un bon complément à l'implantation du défibrillateur automatique.

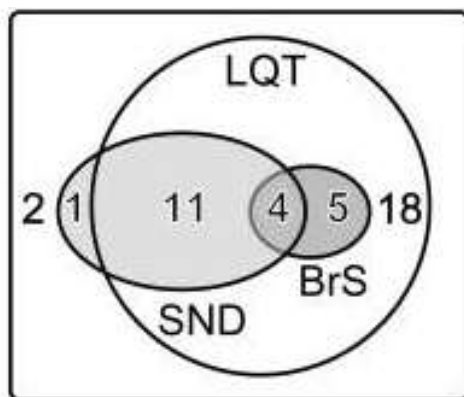
### III.3.4 Syndrome du QT court acquis

Le risque arythmogène du SQTL a conduit à caractériser l'impact de nombreux médicaments sur l'allongement de l'intervalle QT. Le travail de revue de Shah comptabilise plus de 160 médicaments pouvant prolonger la durée du QT [Bezzina *et al.* 2003; Shah 2009]. La preuve récente du risque de mort subite par le raccourcissement de l'intervalle QT oblige une recherche des pharmacopées réduisant cet intervalle. Ce travail est important pour exclure les faux positifs et éviter d'induire un substrat arythmogène, d'autant plus que certains patients présentent une prédisposition génétique qui s'exprime par un intervalle QT raccourci mais restant dans les limites de la normale [Bezzina *et al.* 2003].

### III.4 Les syndromes chevauchants

Sur un plan moléculaire, le SBr, le SQTL et le SQTC possèdent des zones de chevauchement. Plusieurs études portant sur le gène *SCN5A* font état de phénotypes différents pour une même mutation. Plus surprenant encore, ce phénomène peut se rencontrer au sein d'une même famille. Sont présentés ci-dessous quelques exemples de ces chevauchements cliniques revus par Makita [Makita 2009].

- SBr + SQTL de type 3 + dysfonction sinusale (Figure 16)
- SBr + SQTL de type 3 + trouble de la conduction (Figure 17)
- SBr + SQTL de type 3 + trouble de la conduction + dysfonction sinusale
- SBr + dysfonction sinusale
- SBr + paralysie atriale
- SBr + trouble de la conduction
- SQTL de type 3 + trouble de la conduction

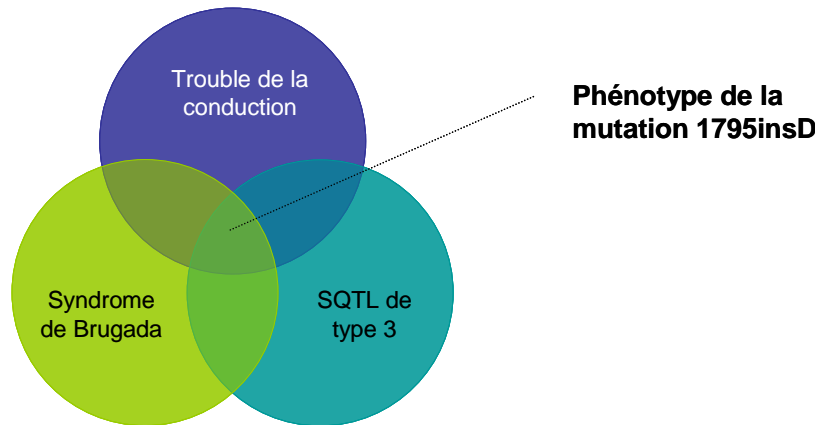


**Figure 16 – Diagramme de Venn représentant le phénotype de 41 patients porteurs de la mutation *SCN5A-E1784K***

Trente huit ont un allongement de leur intervalle QT (LQT), 11 associé à une dysfonction sinusale (SND), 5 à un syndrome de Brugada (BrS) et 4 possèdent les trois phénotypes. Un seul patient possède uniquement une dysfonction sinusale. D'après [Makita et al. 2008]

L'association des phénotypes SBr et SQTL est surprenante du fait que les mutations du canal  $Na_v1.5$  impliquées dans le SBr sont des pertes de fonction du canal et que dans le cas du SQTL il s'agit de mutations gain de fonction. Des études de la mutation *SCN5A-1795insD* par différentes approches, modèle informatique et modèle de souris hétérozygote « *Knock-In* » ont montré que la mutation à elle seule est suffisante pour causer plusieurs phénotypes (Figure 17) [Clancy et Rudy 2002; Remme et al. 2006].

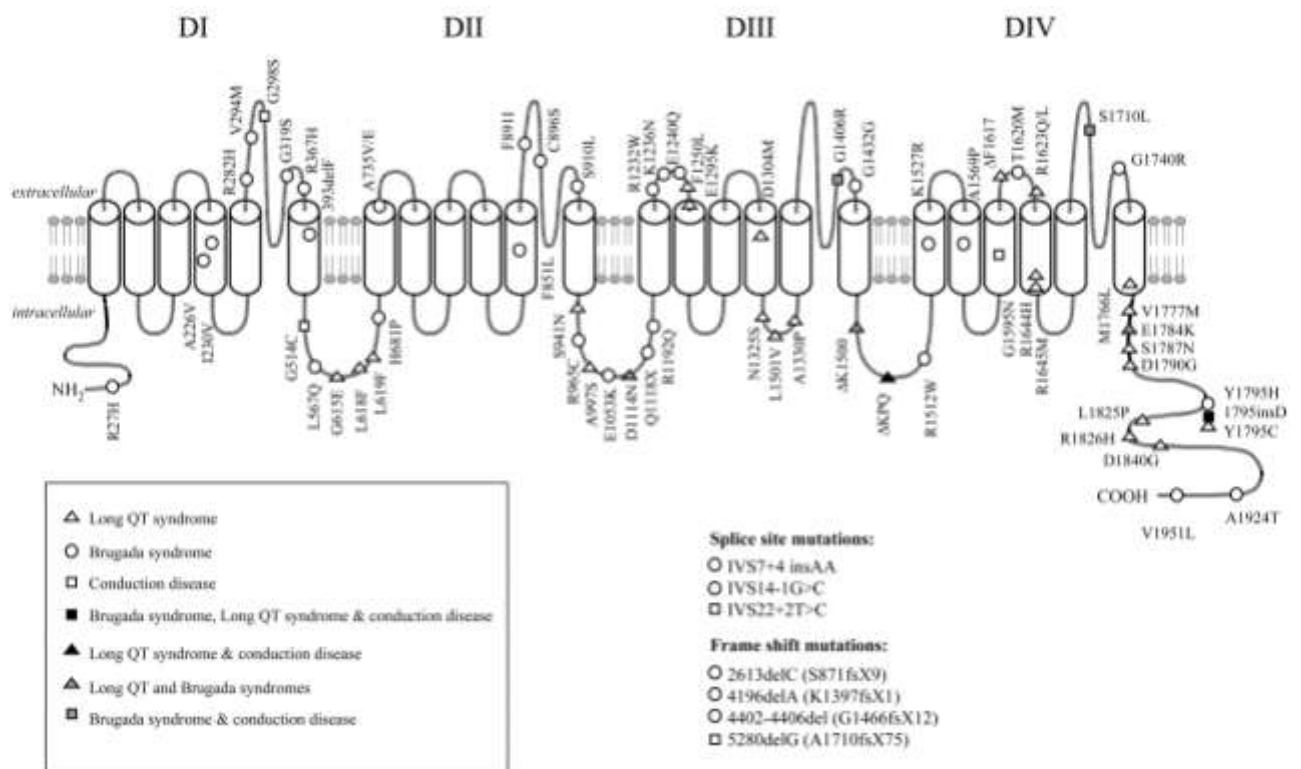
Par ailleurs des variations d'expression phénotypique pourraient être attribuées en partie à des effets génétiques modulateurs influant par exemple sur le taux de transcription des ARNm du canal  $Na_v1.5$ , à l'intérieur même du gène [Bezzina et al. 2006; Yang et al. 2008].



**Figure 17 – Diagramme de Venn représentant le caractère chevauchant du phénotype des patients porteurs de la mutation *SCN5A* - 1795insD**

La mutation *SCN5A*-1795insD est présente chez des patients atteints de trouble de la conduction, du syndrome de Brugada et du syndrome du QT long de type3. Modifié d'après [Bezzina et al. 1999; Bezzina et al. 2001]

Une étude de la répartition des mutations dans le gène *SCN5A* montre qu'il n'existe pas de région associée spécifiquement à un phénotype [Tan et al. 2003] (Figure 18).



**Figure 18 – Représentation schématique de  $Na_v1.5$  et de la répartition des mutations associées à leur phénotype**

Ce diagramme montre qu'il n'y a pas de localisation spécifique des mutations *SCN5A* en fonction du phénotype (SBr, Trouble de la conduction, SQTL de type 3 ou syndromes chevauchants). DI : domaine I; DII : domaine II; DIII : domaine III; DIV : domaine IV. D'après [Tan et al. 2003]

En plus du SBr et du SQTL, les mutations *SCN5A* ont également été trouvées dans d'autres arythmies ou des anomalies structurales cardiaques telles que :

- Les FV idiopathiques [Akai *et al.* 2000]
- La mort subite du nourrisson [Wang *et al.* 2007]
- La dysfonction sinusale [mutations récessives, Benson *et al.* 2003]
- La paralysie auriculaire associée à un SBr [Takehara *et al.* 2004]
- La cardiomyopathie dilatée associée à des anomalies du système de conduction [McNair *et al.* 2004] ou de la fibrillation auriculaire [Olson *et al.* 2005],
- Les TV monomorphes et anomalies structurales du ventricule droit [mutation homozygote, Frigo *et al.* 2007]
- L'association d'un orage rythmique dans un contexte d'infarctus du myocarde [Hu *et al.* 2007]

Une étude à laquelle j'ai participé, suggère un nouveau phénotype associé à la mutation *SCN5A*-p.R222Q (cf. Annexe 3 : paragraphe III.2). Elle est responsable de contractions ventriculaires prématurées, de tachycardies non soutenues et de cardiomyopathie dilatée.

Antzelevitch *et al.* a également montré l'implication du gène *CACNA1C* chez des patients présentant uniquement un SBr mais aussi chez des patients associant SBr et intervalle QT court [Antzelevitch *et al.* 2007].

Ces syndromes chevauchants augmentent la difficulté pour les cliniciens à choisir un traitement adapté. En effet un traitement à la flécaïnide (antiarythmique de classe Ic) pour diminuer la durée de l'intervalle QT dans le cadre d'un SQTL 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.* 2000b].



## **Objectifs de la thèse**

### **Génétique des troubles de la repolarisation ventriculaire, nouveaux concepts**

Le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long et le syndrome du QT court forment trois entités cliniques distinctes. Ces trois syndromes montrent une hétérogénéité génétique mais partagent un certain nombre de gènes et donc des voies de signalisation. La description de syndromes chevauchants suggère fortement que la génétique et la physiopathologie de ces syndromes forment un continuum. Cette nouvelle vision de ces syndromes, loin du modèle « un gène une maladie » voire « une mutation une maladie », nous amène à imaginer d'autres concepts et à utiliser d'autres approches technologiques pour appréhender leurs mécanismes.

Je me suis intéressé lors de mon premier projet à la génétique du SBr. Mon premier travail a porté sur l'étude génotype/phénotype de 13 grandes familles associant mutation dans le gène *SCN5A* et le phénotype syndrome de Brugada. Cette étude s'est prolongée par la recherche de nouveaux gènes morbides par des approches familiales et gènes candidats. L'objectif de ce premier projet est de caractériser le modèle génétique du syndrome de Brugada.

Mon second projet a consisté à rechercher de nouvelles variations moléculaires, grâce à de nouvelles technologies, afin d'expliquer l'absence de diagnostic moléculaire dans près de 25% des patients atteints du SQTl congénital.

Enfin mon dernier projet avait pour objectif d'identifier les bases moléculaires d'un nouveau mécanisme conduisant au SQTc.

L'ensemble de mes projets vise à identifier de nouveaux marqueurs de façon à améliorer et à adapter la prise en charge des patients en fonction de leur génotype. Cette recherche pourrait servir de médecine prédictive et ainsi mieux prévenir la survenue de morts subites cardiaques dans nos populations.

## ***B- RESULTATS ET DISCUSSIONS***

## **Projet 1**

### **Syndrome de Brugada : un nouveau modèle génétique ?**

## I. Projet 1 : syndrome de Brugada : un nouveau modèle génétique ?

Le SBr est décrit comme une pathologie héréditaire monogénique à transmission autosomique dominante. Actuellement 7 gènes ont été identifiés : *SCN5A*, *GPD1L*, *CACNA1C*, *CACNB2*, *SCN1B*, *KCNE3* et *SCN3b*. Les mutations dans le gène *SCN5A* sont retrouvées chez environ 15% des patients mais la pénétrance de ces mutations n'est que de 30% [Priori *et al.* 2000a; Schulze-Bahr *et al.* 2003]. Une étude multicentrique internationale a estimé la prévalence des mutations du gène *SCN5A* à 21% des cas. En effet, sur 2111 patients colligés atteints d'un SBr, 438 (21%) sont mutés pour le canal sodique représentant 293 mutations distinctes (193 faux-sens, 32 non-sens, 38 décalent le cadre de lecture, 21 affectent des sites d'épissage et 9 sont des délétions ou des insertions ne décalant pas le cadre de lecture). Deux cents nouvelles mutations ont été ainsi recensées (soumis à Heart Rhythm). On estime aujourd'hui à plus de 300 le nombre de mutations dans le gène *SCN5A* associées au SBr.

Le gène *SCN5A* a été identifié par une approche gène candidat, aucune grande famille n'a été recensée montrant une ségrégation parfaite entre une mutation et le phénotype. La description originale du SBr associait des troubles de la conduction au sus décalage du segment ST [Brugada *et Brugada* 1992]. A l'inverse, l'analyse de liaison a permis de mettre en évidence l'implication du gène *SCN5A* dans les troubles de la conduction isolés [Schott *et al.* 1999]. De plus plusieurs travaux montrent que parmi les individus atteints par le SBr, les porteurs d'une mutation *SCN5A* présentent des troubles de la conduction marqués [Smits *et al.* 2002; Probst *et al.* 2006; Yokokawa *et al.* 2007]. La relation génotype/phénotype complexe des mutations du gène *SCN5A* et du SBr suggère que d'autres bases moléculaires de ce syndrome sont à identifier.

Six autres gènes (*GPD1L*, *CACNA1C*, *CACNB2*, *SCN1B*, *KCNE3* et *SCN3b*) ont été décrits comme impliqués dans le SBr. Les premières études montreraient que des mutations dans ces 6 gènes n'expliqueraient que de rares cas mais la prévalence de ces gènes dans le SBr n'est pas connue. Notre expérience tend à confirmer ces premiers résultats chez les individus négatifs en séquence pour le gène *SCN5A* (Tableau 5). Le gène *GPD1L*, comprenant 8 exons, a été séquencé au laboratoire chez 60 propositus ou cas sporadiques de type I mais aucun variant significatif n'a été mis en évidence.

Un travail identique a été mené sur quarante cinq patients sur la sous unité  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$ , tous présentaient un SBr de type I avec une durée de l'intervalle QT dans les limites de la normale ( $360 \text{ ms} \leq \text{QTc} < 440$  chez les hommes et 460 ms pour les femmes). Le séquençage direct des 73 amplicons représentant l'ensemble des exons et régions bordantes exoniques des gènes *CACNA1C* et *CACNB2* a été réalisé. Aucun variant n'a permis de montrer la morbidité de la protéine  $Ca_v1.2$  et de sa sous unité  $\beta 2$ . La fréquence des mutations dans le gène *SCN1b* (SBr5) a été évaluée à une pour 282 patients testés (0.35%)

[Watanabe *et al.* 2008]. La littérature décrit une mutation dans le gène *KCNE3* parmi 105 propositus [Delpon *et al.* 2008]. Cependant aucun variant n'a été identifié pouvant expliquer le SBr parmi 288 de nos patients. Enfin aucun variant n'a été retrouvé dans le gène *SCN3b* parmi 60 patients.

**Tableau 5 – Prévalence des mutations dans les gènes du SBr2-7 parmi les propositus de Nantes**

Gènes	Nombre de Patients séquencés	Nombre de mutations trouvées	Prévalence du gène dans le SBr
<i>GPD1L</i>	60	0	0%
<i>CACNA1C</i>	45	0	0%
<i>CACNB2</i>	45	0	0%
<i>SCN1b</i>	282	1	0.35%
<i>KCNE3</i>	288	0	0%
<i>SCN3b</i>	60	0	0%

Dans notre expérience, la prévalence de ces 6 derniers gènes candidats (SBr2-7) pour le SBr est extrêmement rare et ne peut par conséquent pas expliquer le manque de diagnostic moléculaire dans environ 80% des cas. Depuis la description du SBr en 1992, aucun marqueur moléculaire majeur n'a été mis en évidence permettant d'identifier les patients à risque de mort subite. Le gène *SCN5A* retrouvé muté dans 15 à 21% des patients, nécessite des études supplémentaires afin de caractériser sa relation avec le phénotype du SBr.

## **I.1           Projet 1a - Mutations dans le gène *SCN5A* et rôle du fond génétique dans la physiopathologie du syndrome de Brugada**

### **I.1.1       Article 1 : objectifs**

A défaut d'un marqueur moléculaire pertinent, le gène *SCN5A* est considéré comme le gène majeur du SBr avec une prévalence de 15 à 21%. Cependant plusieurs particularités de sa relation génotype/phénotype suscitent des interrogations quant à son rôle dans la physiopathologie du SBr, comme sa faible pénétrance environ 30% et son absence d'identification par analyse de liaison. A l'inverse, des mutations du gène *SCN5A* ont été impliquées, dans les troubles de la conduction par analyse de liaison, phénotype souvent associé au SBr. Des défauts de ségrégation de la mutation *SCN5A* ont été constatés dans les familles atteintes du SBr que nous étudions. Ce constat a également été réalisé dans les familles étudiées par les équipes du docteur Pascale Guicheney (Inserm U582, Paris) et du professeur Arthur Wilde (Amsterdam). Le regroupement des données des 3 équipes a permis d'étudier la relation génotype/phénotype des mutations *SCN5A* dans 13 grandes familles (minimum 5 atteints) atteintes par le SBr. Parmi ces 13 familles, 10 ont été étudiées à Nantes, 2 à Amsterdam et une à Paris. Dans cette étude j'ai réalisé l'analyse génétique du gène *SCN5A* de 3 patients des familles nantaises ainsi que 3 autres de la famille parisienne.

## **SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome**

Vincent Probst\*, MD, PhD <sup>1,2,3,4</sup>, Arthur A.M. Wilde\*, MD, PhD <sup>5</sup>, Julien Barc, MS <sup>1,2,3</sup>, Frederic Sacher, MD <sup>6</sup>, Dominique Babuty, MD <sup>7</sup>, Philippe Mabo, MD <sup>8</sup>, Jacques Mansourati, MD <sup>9</sup>, Solena Le Scouarnec, PhD <sup>1,2,3</sup>, Florence Kyndt, PharmD, PhD <sup>1,2,3,10</sup>, Cedric Le Caignec, MD, PhD <sup>10</sup> Pascale Guicheney, PhD <sup>11</sup>, Laetitia Gouas, PhD<sup>11</sup>, Juliette Albuissou, MD <sup>10</sup>, Paola G. Meregalli, MD,<sup>5</sup> Hervé Le Marec, MD, PhD <sup>1,2,3,4</sup>, Hanno L. Tan, MD, PhD <sup>5</sup>, and Jean-Jacques Schott, PhD <sup>1,2,3,4</sup>.

\*contribution équivalente

**Sous presse dans *Circulation : Cardiovascular Genetics***

<sup>1</sup>INSERM, UMR915, Nantes, F-44000 France ;

<sup>2</sup>CNRS, ERL3147, Nantes, F-44000 France

<sup>3</sup>Université de Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France ;

<sup>4</sup>CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de cardiologie, Nantes, F-44000 France ;

<sup>5</sup>Department of Cardiology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, the Netherlands

<sup>6</sup>Service de rythmologie, Hôpital cardiologique du Haut Leveque, Bordeaux, France

<sup>7</sup>Service de cardiologie B, Hôpital Trousseau, Tours, France

<sup>8</sup>Département de cardiologie, Hôpital Pontchaillou, Rennes, France

<sup>9</sup>Service de cardiologie, centre hospitalo-universitaire de Brest, Brest, France

<sup>10</sup>Service de Génétique Médicale, Institut de Biologie, CHU de Nantes, France

<sup>11</sup>INSERM, U582, Institut de Myologie, Paris (F-75013), France and AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75013, France

## ABSTRACT

**Background:** Mutations in SCN5A are identified in about 20-30% of probands affected by Brugada syndrome (BrS). However, in familial studies the relationship between SCN5A mutations and BrS remains poorly known. The aim of this study was to investigate the association of SCN5A mutations and BrS in a group of large genotyped families.

**Methods and results:** Families were included if at least 5 family members were carriers of the SCN5A mutation identified in the proband.

Thirteen large families composed of 115 mutation carriers were studied. The signature type I ECG was present in 54 mutation carriers (BrS-ECG+) (47%). In 5 families, we found 8 individuals affected by BrS, but with a negative genotype (mutation-negative BrS-ECG+). Among these 8 mutation-negative BrS-ECG+ individuals, 3, belonging to 3 different families, had a spontaneous type I ECG, while 5 had a type I ECG only after administration of sodium channel blockers. One of these 8 individuals had also experienced syncope. Mutation carriers had, on average, longer PR and QRS intervals than non-carriers, demonstrating that these mutations exerted functional effects.

**Conclusions:** Our results suggest that SCN5A mutations are not directly causal to the occurrence of a BrS-ECG+ and that genetic background may play a powerful role in the pathophysiology of BrS. These findings add further complexity to concepts regarding the causes of BrS, and are consistent with the emerging notion that the pathophysiology of BrS includes various elements beyond mutant sodium channels.

**Key Words:** Brugada syndrome; SCN5A mutation, genetics; arrhythmia.

## INTRODUCTION

Brugada syndrome (BrS) is an inherited arrhythmia syndrome with an increased risk of sudden death resulting from polymorphic ventricular tachycardia (VT) and/or ventricular fibrillation (VF) in the absence of gross structural abnormalities.<sup>1</sup> BrS is associated with ST-segment elevation in the right precordial ECG leads, which have such a characteristic shape (so-called type I ECG, here abbreviated as "BrS-ECG+", see Methods) that their presence is required for the diagnosis. A BrS-ECG+ may occur spontaneously or be provoked by sodium channel blocking drugs. Although BrS and a BrS-ECG+ are intimately linked, not all patients with a BrS-ECG+ are at risk of ventricular fibrillation, as individuals with a BrS-ECG+ exhibit marked phenotypic variability, ranging from sudden death victims to individuals in whom a BrS-ECG+ is found by chance, but who remain asymptomatic.<sup>2</sup> The phenotypic variability has spawned studies aimed at finding modifying factors such as gender, age and other environmental factors.<sup>3,4</sup> Recent experimental studies support a role of the genetic background, although clinical observations indicate that the risk of sudden death of a BrS patient is not increased if otherwise unexplained sudden death has occurred in his/her family.<sup>5,6</sup>

Mutations in the SCN5A gene, which encodes the pore-forming subunit of the cardiac voltage-gated sodium channel, are found in 20-30% of BrS patients.<sup>7,8</sup> Five other genes (*GPD1L*, *CACNA1C*, *CACNB2*, *SCN1B*, *KCNE3*) have been associated with BrS, but the prevalence of variants in these genes is yet unknown.<sup>9-12</sup> SCN5A mutations may also lead to progressive cardiac conduction defects (PCCD), long QT syndrome type 3, or atrial standstill.<sup>13-15</sup> Cardiac conduction defects (PCCD) and BrS are both associated with a loss of function of the mutant sodium channel. Accordingly, "overlap" families who present a mixed phenotype with features of both diseases exist.<sup>16-18</sup> The causality of SCN5A mutations in PCCD was proven

by linkage analysis.<sup>13,16,19</sup> In contrast, SCN5A mutations in BrS were discovered by a candidate gene approach<sup>20</sup> and linkage data are still lacking, with the exception of a large overlap family in which the causal mutation is linked with a mixed phenotype.<sup>21</sup> Of note, not only is the proportion of SCN5A mutation carriers low, but, conversely, BrS-ECG+ were reported among members of SCN5A-positive BrS families who did *not* carry the familial SCN5A mutation.<sup>22,23</sup> Clearly, the association between BrS and SCN5A mutations is complex. In the present study, we set out to investigate this association in a larger group of families.

## METHODS

This retrospective study was conducted at the center of reference for rare arrhythmic diseases of Nantes University Hospital and at the Academic Medical Center, University of Amsterdam, in accordance with the local guidelines for genetic research and with the approval of the local medical ethics committees. Informed written consent was obtained from all patients.

Large genotyped BrS families in which five or more family members carried a SCN5A mutation were included for the present investigation. An individual was defined as affected by BrS if he/she displayed a BrS-ECG at baseline or after provocation with a class I antiarrhythmic drug (BrS-ECG+).<sup>24</sup> A BrS-ECG+ was defined as a coved-type ST-segment elevation  $\geq 0.2$ mV at its peak followed (without isoelectric separation) by a negative T-wave in two or more right precordial leads.<sup>25</sup> Either intravenous ajmaline (1 mg/kg body weight at a rate of 10 mg/min) or flecainide (2 mg/kg body weight in 10 min with a maximum of 150 mg) were used for drug testing. Drug challenge was not performed in patients younger than 16 years of age and in those showing severe conduction defect at rest. Underlying structural heart disease was excluded by echocardiography, chest roentgenogram, and exercise testing. Laboratory tests excluded acute ischemia and metabolic or electrolyte disturbances. ECG parameters that were analyzed, before and after drug testing, were: heart rate (HR), PQ interval (in lead II), QRS duration, maximal ST elevation



(right precordial leads) and QTc duration in V4 (Bazett's formula).

### Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using standard protocols. All 28 exons of *SCN5A* were amplified by polymerase chain reaction utilizing intronic primers.<sup>26</sup> Polymerase chain reaction products were screened for a *SCN5A* mutation using denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC)-DNA sequencing. DNA variants were disease causing mutations, rather than polymorphisms, if they were present in highly conserved regions of *SCN5A* and absent in 200 control individuals. Annotation of mutations was based on the cDNA reference sequence GenBank NM\_198056. Sequencing of the *SCN5A* gene was performed in probands and in all mutation-negative BrS-ECG+ patients.

### Statistical analysis

ECG parameters were compared with Student's *t*-test. Clinical data are expressed as mean value  $\pm$  SD for continuous data or proportions for categorical data. A *p* value  $<0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Clinical and electrocardiographic results.

Among a total of 444 genotyped probands with BrS-ECG+ in whom molecular screening was conducted in our international multicenter database, 118 (26%) carried a *SCN5A* mutation. Thirteen of them, each with a different mutation (Table 1), belonged to large families with  $\geq 5$  *SCN5A*-positive members. For the present analysis, all the screened members of these thirteen families were included and constitute the study population ( $n=264$ ) (Table 2). A history of sudden cardiac death at young age was present in 3 families. In the 13 probands, the workup which led to the diagnosis of BrS was conducted because of: 1) unexplained syncopal episode ( $n=4$ ), 2) ECG performed due to chest pain ( $n=2$ ), 3) ECG performed because of palpitations ( $n=2$ ), 4) ECG performed for other reason ( $n=4$ ), 5) ECG performed because of a family history of sudden death ( $n=1$ ). Eleven out of 13 probands had a spontaneous BrS-ECG+ (type I), while one showed a BrS-ECG+ only after drug provocation (family D) (Figure 1). The last proband (family L) suffered from sudden cardiac death during car racing; his brother also died during car racing from sudden cardiac death and that second event initiated familial screening.

Genetic analysis of the probands' relatives identified a total of 115 carriers (Figure 1) of the familial *SCN5A* mutation and 149 mutation negative relatives (mutation negative unaffected individuals not shown in Figure 1). Totally, a spontaneous BrS-ECG+ was present in 21 of 115 mutation carriers (18%) and in 3 of the non-carriers. Provocation testing, performed in 67 mutation carriers and 63 non-carriers, was positive in 33 additional mutation carriers and in 5 non-carriers. Thus, among carriers of the familial mutation the penetrance of the BrS phenotype increased from 18% at baseline to 61% after drug testing (54/88 patients). Twenty-five

mutation carriers received an implantable cardioverter/defibrillator (ICD).

At baseline, mutation carriers had, on average, significantly longer PR ( $193\pm 37$  vs.  $162\pm 29$  ms,  $p<0.00001$ ) and QRS intervals ( $113\pm 20$  vs.  $95\pm 14$  ms,  $p<0.0001$ ), compared with the non-carriers (Table 2). There was a higher proportion of patients affected by a first degree AV block among carriers (27/115, 23%) than among non-carriers (4/149, 3%,  $p<0.001$ ) and a higher proportion of patients affected by a complete right bundle branch block among carriers (23/115, 20%) than among non-carriers (5/149, 3%,  $p<0.001$ ).

### Results in the families with individuals who had a BrS-ECG+ but did not carry the familial mutation (mutation negative BrS ECG+)

In 5 of the 13 studied families, 8 individuals showed a BrS-ECG+, but did not carry the familial mutation (mutation negative BrS-ECG+ individuals) (Figure 2). Among them, 3 (each from a different family) had a spontaneous BrS-ECG+, whereas 5 had a BrS-ECG+ only after drug testing. One was symptomatic (syncope) (d2), while the other 7 were asymptomatic (3 men and 4 women). Drugs or factors leading to acquired BrS-ECG+ have been excluded in these 8 individuals.<sup>24,27</sup>

These 5 families were composed of 44 mutation positive and 61 mutation negative subjects in total (mutation negative BrS subjects not shown in Figure 1). Also in this subgroup, mutation positive individuals had, on average, significantly longer PR intervals ( $180\pm 32$  ms vs.  $158\pm 25$  ms,  $p=0.001$ ) and QRS durations ( $107\pm 18$  ms vs.  $94\pm 15$  ms,  $p<0.0001$ ) than mutation negative individuals. Among the non-carriers of these families there were no significant differences in conduction parameters between the subjects showing a BrS ECG and the ones without ST segment elevation (PR:  $165\pm 18$  ms vs.  $157\pm 26$  ms,  $p=0.3$ ; QRS:  $98\pm 14$  ms vs.  $94\pm 15$  ms,  $p=0.4$ ).

EPS was performed in 5 BrS-ECG non-mutation patients. The mean HV interval was 50 ms. Ventricular tachyarrhythmias were inducible in 3 (1 with a spontaneous BrS-ECG and 2 with a BrS-ECG induced by ajmaline). Signal averaged ECG was performed in all the mutation negative BrS-ECG+ patients and was negative in all. An ICD was implanted in these 3 patients. No arrhythmic event was registered during a  $52\pm 42$  months follow-up period.

### Genetic analysis in the mutation negative BrS-ECG+ patients.

To make sure that the Brugada syndrome phenotype identified in these patients was not related to another mutation of the *SCN5A* gene we have performed a complete sequencing of the *SCN5A* gene. This sequencing failed to identify any mutation.

## DISCUSSION

We set out to investigate the association between the occurrence of a BrS-ECG+ and carriership of a *SCN5A* mutation. For this purpose, we studied 13 families with BrS-ECG+ in whom at least 5 family members carried the familial *SCN5A* mutation. We found that this association is complex, as BrS-ECG+ were only found in 18% of mutation carriers at baseline and in 61% after drug testing, and conversely, 8 individuals had a BrS-ECG, but did not carry the familial mutation.

These observations may suggest that carriership of a *SCN5A* mutation is not causal to the occurrence of a BrS-ECG+. Historically, the putative role of *SCN5A* mutations in BrS is derived from the identification of loss-of-function mutations in many BrS syndrome patients throughout the world.<sup>20</sup> In general, affected families are small and genetic linkage data are lacking, with exception of a large family with an overlap syndrome where a sodium channel mutation co-segregated with a complex phenotype.<sup>21</sup> If gene-negative, phenotype-positive patients (as present in 5 of these 13 families) would have been found in the initial years of the genotyping efforts in this disease entity, a causal role for *SCN5A* would have been probably refuted. Biophysical (patch-clamp) studies of the aberrant gene products (cardiac sodium channels) have consistently demonstrated that their altered functional properties are compatible with the BrS phenotype.<sup>28</sup> All BrS-associated *SCN5A* mutants reported at present exhibit net loss-of-function which is generally regarded as the inciting pathophysiological mechanism of BrS (yet, whether reduced sodium channel function acts by exacerbating spatial inhomogeneities in depolarization or in repolarization to cause the signature ST elevations of BrS is still controversial).<sup>29</sup> Among mutations found in our 13 families (Table 1), two mutations introduce wrong splice sites (c.612-2A>G and c.3963+2T>C), two are frameshift mutations (c.3816delG and c.1983-1993dup), one mutation introduces a premature stop codon (p.Arg535X), and one mutation causes an in-frame insertion (p.1570-Phe1571insIle). These mutations are all likely to produce non-functional sodium channels as usually identified in the Brugada syndrome. The seven remaining mutations are missense mutations, four of which have been biophysically studied (p.Glu161Lys<sup>23,30</sup>, p.Gly752Arg<sup>30,31</sup>, p.Gly1408Arg<sup>32</sup>, p.Arg225Trp<sup>33</sup>) and have shown to produce a strong decrease in peak sodium current. Although no functional data is available for the remaining 3 missense mutations (p.Ser1382Ile, p.Leu839Pro, p.Asn1722Asp), we found that mutation carriers have, on average, longer PR intervals and QRS durations than non-carriers. These findings are consistent with previous reports<sup>17,30</sup> and suggest that the mutant channels produce less sodium current, as sodium current reduction causes cardiac conduction slowing. Thus, the apparent lack of association between carriership of a *SCN5A* variant and a BrS-ECG+, as observed in our study population, cannot be explained by the fact that these *SCN5A* variants are no disease-causing mutations. Then the mutations identified in the There is also no reason to believe that the

subjects with BrS-ECG+ who do not carry the familial *SCN5A* mutation, have no true BrS. Indeed, among the genotype-negative phenotype-positive patients, 3 in 3 different families had a spontaneous BrS-ECG+, whereas 5 had a BrS-ECG+ only after sodium channel blockers. We have found no other clinical abnormalities to explain the electrocardiographic aspect of BrS. One of these individuals was symptomatic with syncope before the study. Finally, the EPS induced VF in 3/5 of these patients as previously reported in BrS.<sup>8,34,35</sup>

A novel notion to emerge from our observation that some patients have a BrS-ECG+, but do not carry the familial *SCN5A* mutation, is that modulating factors within the studied families (genetic background) are sufficiently powerful to evoke a BrS-ECG+. These observations are in line with emerging experimental studies which indicate that disparate genetic backgrounds confer disparate susceptibilities to the effects of a single loss-of-function mutant sodium channel.<sup>6</sup> Clearly, the relevant elements in the genetic background may encompass all proteins and molecules that play a role in the pathophysiology of BrS. For instance, such genes may include not only those that encode ion channel subunits, but also those that encode molecules that modify cardiac structure (e.g., fibrosis), thereby facilitating arrhythmias. Hence, it seems conceivable that the genetic background in some families is so strongly conducive to the occurrence of a BrS-ECG+ that a BrS-ECG+ occurs even in the absence of a *SCN5A* mutation or drug provocation (spontaneous BrS-ECG+). This might point to the fact that a loss-of-function *SCN5A* mutation, on its own, might not be sufficient to cause BrS but could act like a revelatory factor as sodium channel blocker challenge.

## Limitations

All the genes known to be involved in the occurrence of the Brugada syndrome have not been sequenced. Then it is possible that other gene mutations are responsible for the Brugada within the families presented in the study. A provocation testing has not been performed in all the family members, then it is possible that we have underestimated the frequency of the Brugada syndrome within these families.

## CONCLUSION.

We provide novel clinical evidence to suggest that genetic background may play a powerful role in the pathophysiology of BrS. These findings add further complexity to concepts regarding the causes of BrS, and are consistent with the emerging notion that the pathophysiology of BrS includes various elements beyond mutant sodium channels that produce reduced sodium current.

## Acknowledgments

The authors are greatly indebted to the patients and their families. We thank Christine Fruchet, Christine Poulain, Patricia Bouillet and Maïder Bessouet for assistance in the family screening. We thank Anne Ponchaux, Jerome Buscaïl and Thierry Marsaud for

technical assistance. We also thank Dr Denjoy, Lupoglazoff and Gaudel.

### **Funding sources**

P.H.R.C. 2001 R20/03 and 2004 R20/07 from CHU de Nantes, France

Société française de cardiologie

A fondation Leducq Trans-Atlantic Network of Excellence grant (05 CVD 01, Preventing Sudden death)

Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences KNAW and Netherlands Organization for Scientific Research NWO, ZonMW VICI 918.86.616 (to H.L Tan).

Agence Nationale de la Recherche grants 05-MRAR-028 and 06-MRAR-022 (to J.-J. Schott & P. Guicheney)

Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (PhD grant to J. Barc)

### **Disclosures**

None.

## REFERENCES

1. Brugada P, Brugada J: Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol.* 1992;20:1391-6.
2. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Shimizu W, Gussak I, Perez Riera AR: Brugada syndrome: a decade of progress. *Circ Res.* 2002;91:1114-8.
3. Benito B, Sarkozy A, Mont L, Henkens S, Berruezo A, Tamborero D, Arzamendi D, Berne P, Brugada R, Brugada P, Brugada J: Gender differences in clinical manifestations of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1567-73.
4. Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Perez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C: Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation.* 2002;106:2004-11.
5. Gehi AK, Duong TD, Metz LD, Gomes JA, Mehta D: Risk stratification of individuals with the Brugada electrocardiogram: a meta-analysis. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006;17:577-83.
6. Remme C, Engelen M, Van Brunschot S, van Ginneken AC, Belterman CN, van Rijen HV, Wilde A, Veldkamp MW, de Bakker JM, Bezzina C: Severity of conduction disease and development of cardiac structural abnormalities in sodium channel disease depends on genetic background. *Heart rhythm society meeting.* 2007;4[5], S60.
7. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, Brignole M, Giordano U, Giovannini T, Menozzi C, Bloise R, Crotti L, Terreni L, Schwartz PJ: Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: A prospective evaluation of 52 families. *Circulation.* 2000;102:2509-15.
8. Eckardt L, Probst V, Smits JP, Bahr ES, Wolpert C, Schimpf R, Wichter T, Boisseau P, Heinecke A, Breithardt G, Borggrefe M, LeMarec H, Bocker D, Wilde AA: Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada syndrome. *Circulation.* 2005;111:257-63.
9. London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan PC, Pfahl AE, Shang LL, Madhusudanan M, Baty CJ, Lagana S, Aleong R, Gutmann R, Ackerman MJ, McNamara DM, Weiss R, Dudley SC, Jr.: Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na<sup>+</sup> current and causes inherited arrhythmias. *Circulation.* 2007;116:2260-8.
10. Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP, Jr., Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haissaguerre M, Schimpf R, Borggrefe M, Wolpert C: 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.* 2007;115:442-9.
11. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeuffer A, Kaab S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR: Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest.* 2008;118:2260-8.
12. Delpon E, Cordeiro JM, Nunez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C: Functional Effects of KCNE3 Mutation and its Role in the Development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008;1:209-218.
13. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H: Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet.* 1999;23:20-1.
14. Benson DW, Wang DW, Dyment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL, Jr.: Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest.* 2003;112:1019-28.
15. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT: SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell.* 1995;80:805-11.
16. Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu JN, Mialet G, Demolombe S, Schott JJ, Baro I, Escande D, Le Marec H: Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:643-52.
17. Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, Le Marec H: Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006;17:270-5.
18. Six I, Hermida JS, Huang H, Gouas L, Fressart V, Benammar N, Hainque B, Denjoy I, Chahine M, Guicheney P: The occurrence of Brugada syndrome and isolated cardiac conduction disease in the same family could be due to a single SCN5A mutation or to the accidental association of both diseases. *Europace.* 2008;10:79-85.
19. Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbil V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S,

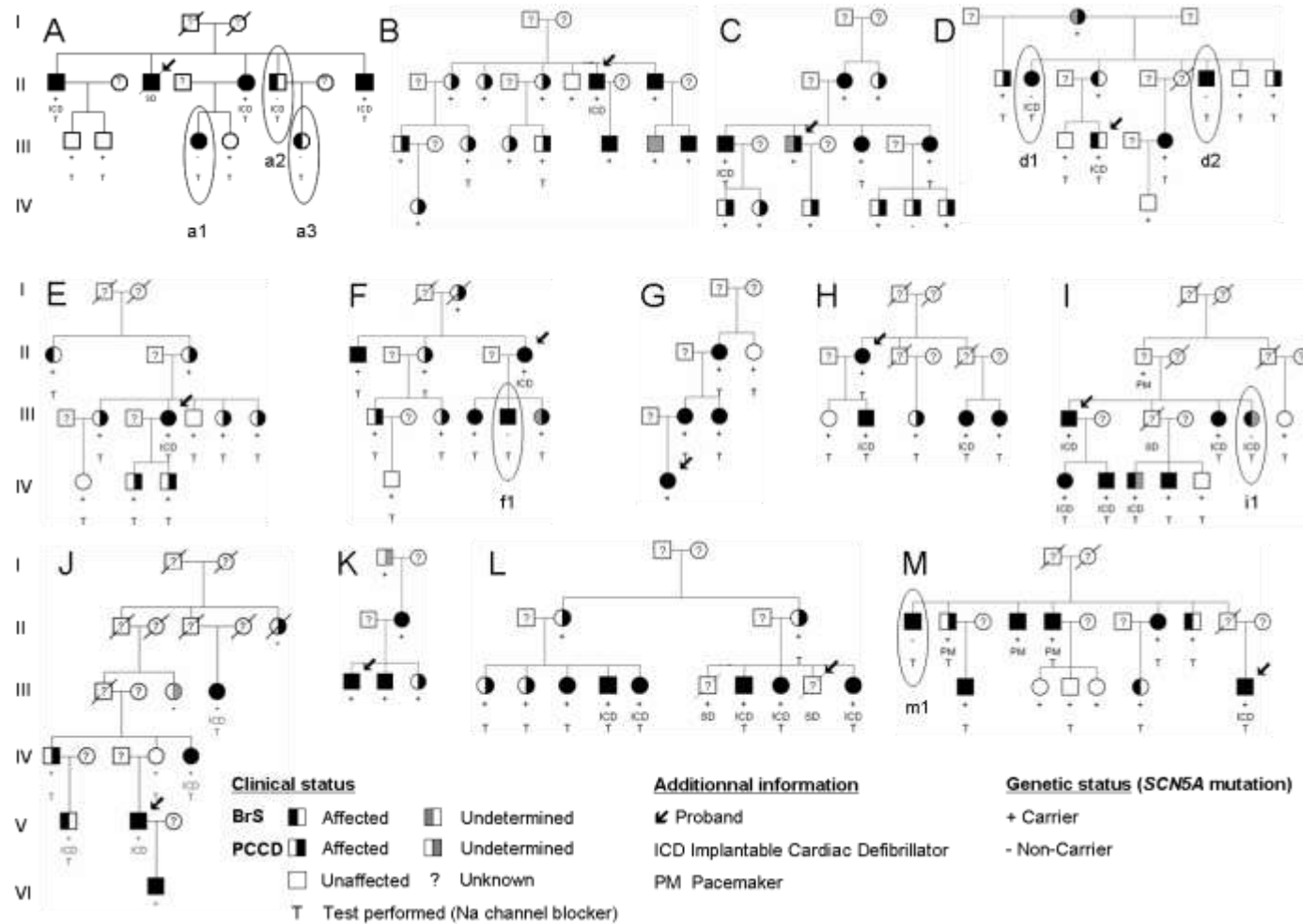
- Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F: Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 2005;111:1738-46.
20. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q: Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. 1998;392:293-6.
21. Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, van Der Hout AH, Mannens MM, Wilde AA: A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res*. 1999;85:1206-13.
22. Hong K, Berruezo-Sanchez A, Pongvarin N, Oliva A, Vatta M, Brugada J, Brugada P, Towbin JA, Dumaine R, Pinero-Galvez C, Antzelevitch C, Brugada R: Phenotypic characterization of a large European family with Brugada syndrome displaying a sudden unexpected death syndrome mutation in SCN5A. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2004;15:64-9.
23. Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Opthof T, Bhuiyan ZA, Mannens MM, Balser JR, Tan HL, Bezzina CR, Wilde AA: A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:969-81.
24. Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A: Brugada syndrome: report of the second consensus conference. *Heart Rhythm*. 2005;2:429-40.
25. Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA: Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome. *Eur Heart J*. 2002;23:1648-54.
26. Wang Q, Li Z, Shen J, Keating MT: Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics*. 1996;34:9-16.
27. Shimizu W. Acquired forms of Brugada syndrome. In: Futura B, ed. *The Brugada Syndrome: From bench to bedside*; 2004:166-177.
28. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R: Brugada syndrome: from cell to bedside. *Curr Probl Cardiol*. 2005;30:9-54.
29. Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL: Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res*. 2005;67:367-78.
30. Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H, Wilde AA: Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:350-6.
31. Potet F, Mabo P, Le Coq G, Probst V, Schott JJ, Airaud F, Guihard G, Daubert JC, Escande D, Le Marec H: Novel brugada SCN5A mutation leading to ST segment elevation in the inferior or the right precordial leads. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:200-3.
32. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H: Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001;104:3081-6.
33. Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, van der Wal AC, Lam J, Jongsma HJ, Wilde AA, Mannens MM: Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ Res*. 2003;92:159-68.
34. Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Bella PD, Giordano U, Bloise R, Giustetto C, De Nardis R, Grillo M, Ronchetti E, Faggiano G, Nastoli J: Natural History of Brugada Syndrome: Insights for Risk Stratification and Management. *Circulation*. 2002;105:1342-1347.
35. Brugada P, Geelen P, Brugada R, Mont L, Brugada J: Prognostic value of electrophysiologic investigations in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001;12:1004-7.

**Table 1:** Summary of the phenotype-genotype relationship in the study group (n=13 families). BrS: Brugada Syndrome

Family number	Mutation (nucleotide)	Mutation (amino acid)	Mutation carriers	Mutation positive BrS-ECG+	Mutation positive not BrS-ECG+	Mutation positive, phenotype undetermined	Mutation negative BrS-ECG+	Type of mutation
A	c.612-2A>G	-	6	3	3	0	3	wrong splice
B	c.4222G>A	p.Gly1408Arg	14	4	9	1	0	Missense <sup>31</sup>
C	c.673C>T	p.Arg225Trp	11	4	6	1	0	Missense <sup>32</sup>
D	c.5164A>G	p.Asn1722Asp	9	3	5	1	2	missense
E	c.3963+2T>C	-	10	2	8	0	0	wrong splice <sup>16</sup>
F	c.4145G>T	p.Ser1382Ile	9	3	5	1	1	Missense <sup>29</sup>
G	c.2516T>C	p.Leu839Pro	5	4	1	0	0	Missense
H	c.2254G>A	p.Gly752.Arg	6	4	2	0	0	Missense <sup>29,30</sup>
I	c.1983-1993dup	p.Ala665GlyfsX16	9	6	2	1	1	frame shift, stop
J	c.1603C>T	p.Arg535X	9	5	4	0	0	non sense <sup>29</sup>
K	c.3667delG	p.Ala1223ProfsX7	5	3	2	0	0	frame shift, stop
L		p.1570-Phe1571insIle	11	6	4	1	0	Insertion
M	c.481G>A	p.Glu161Lys	11	7	4	0	1	Missense <sup>23,29</sup>
<b>Total</b>			115	54	55	6	8	

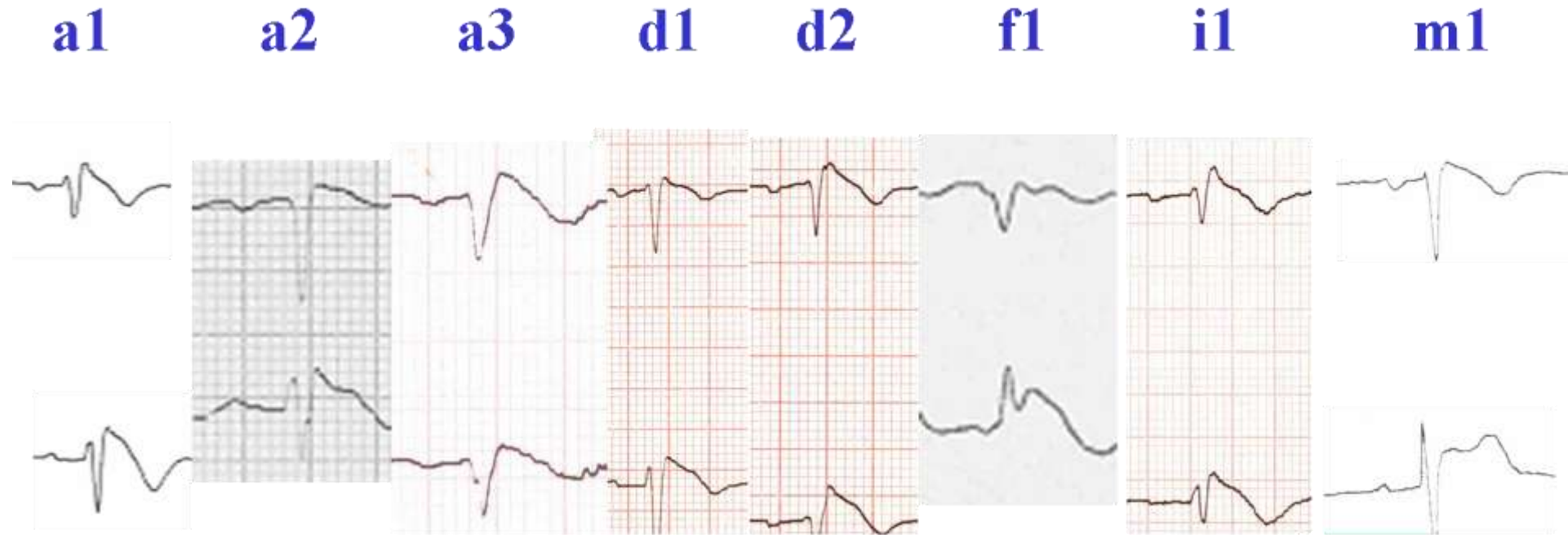
**Table 2:** PR and QRS duration in the 13 families (264 members). BrS: Brugada Syndrome

	n	PR interval (ms)	QRS interval (ms)
Mutation positive BrS-ECG+	54	194±37	113±18
Mutation positive not BrS-ECG+	61	193±37	113±21
Mutation carriers (total)	115	193±37*	113±20**
Mutation negative BrS-ECG+	8	158±25	94±15
Mutation negative not BrS-ECG+	141	162±31	94±14
Mutation negative subjects (total)	149	162±29*	95±14**
total = 264		*p<0.00001	**p<0.001



**Figure 1 : Pedigrees of the 13 SCN5A-related Brugada syndrome families.**

Squares represent males, circles females. Probands are indicated by an arrow. Family members affected by the Brugada syndrome phenotype (BrS-ECG+) before or after provocation challenge are represented with a left-half filled symbol. Family members affected by progressive cardiac conduction disease (PCCD) are represented with a right half-filled symbol. Mutation carriers without Brugada syndrome phenotype (mutation negative BrS-ECG -) are in white. Patients with undetermined phenotype are shown with grey symbol and unknown genotype is indicated by ?. Family members carriers of a SCN5A mutation are indicated with + and non-carriers with -. The non-carriers of the SCN5A mutation but affected by the Brugada syndrome are circled (mutation negative BrS-ECG +). Patients who underwent sodium channel blocker testing are indicated with a T. Unaffected mutation-negative individuals are not shown.



**Figure 2 : Electrocardiographic patterns in the mutation negative members affected by the Brugada syndrome phenotype (mutation negative BrS-ECG+).** Only leads V1 and V2 are reported for each patient. Patients a1, a2 and m1 had a spontaneous Brugada syndrome phenotype and the ECG presented here has been recorded before sodium channel blocker challenge, while a type 1 BrS-ECG was revealed after sodium channel blocker administration in patients a3, d1, d2, f1 and i1 (ECGs were recorded at maximum dose of sodium channel blocker)



### Commentary for the clinician

This study focused on the complexity of the genetic background in Brugada syndrome. Mutations in *SCN5A* are present in about 20-30% of probands affected by Brugada syndrome (BrS). However, in familial studies, the relationship between *SCN5A* mutations and BrS remains to be demonstrated.

In this article, we investigated the relationship between the presence of *SCN5A* mutations and BrS ECG in thirteen families in which the proband and at least 4 other family members were carrier of a *SCN5A* mutation. We demonstrated that the penetrance of the BrS is low. We also confirmed that mutation carriers had, on average, longer PR and QRS intervals than non-carriers, demonstrating that these mutations exerted functional effects.

The major finding of this study is that in 5 out of these 13 families, 8 family members affected by BrS were not carrier of the *SCN5A* mutation. This result demonstrated that *SCN5A* mutations alone are probably not sufficient to cause BrS. *SCN5A* mutations probably act as a major modulating factor revealing the syndrome but it is likely that another factor like genetic background plays a important role in the occurrence of the disease. Our results clearly indicate that BrS is not a monogenic mendelian disease but probably an oligogenic disease. The low penetrance of the disease and the presence of so-called phenocopies demonstrated that there is not a direct link between the presence of the *SCN5A* mutations and Brugada syndrome. These results have to be take in account for the genetic counselling of the patients.

### I.1.2 Article 1 : Principaux résultats et discussion

La relation génotype/phénotype *SCN5A*/SBr de 13 familles composées de 115 patients mutés a été étudiée. Parmi ces patients, 54 (47%) ont un aspect électrocardiographique compatible avec un SBr de type 1 (SBr-ECG+). Au sein de 5 familles, 8 individus SBr-ECG+ n'ont pas de mutation dans le gène *SCN5A*. Parmi ces 8 patients, 3 ont un SBr-ECG de type 1 spontané et 5 après injection d'un bloqueur des canaux sodiques. Trois de ces patients ont été implantés d'un défibrillateur suite à une induction d'une TV par une stimulation programmée. On note que les patients mutés pour le gène *SCN5A* (n=115) ont en moyenne un intervalle PR et QRS plus long que les non-porteurs (n=148) ce qui démontre que ces mutations ont un effet fonctionnel. Ces données sont cohérentes avec la description de mutations dans le gène *SCN5A* corrélées à un ralentissement de la conduction cardiaque [Smits *et al.* 2002; Probst *et al.* 2006; Yokokawa *et al.* 2007].

L'étude génotype/phénotype de ces 13 familles révèle que toutes présentent un défaut de ségrégation entre la mutation familiale du gène *SCN5A* et le phénotype du SBr. La pénétrance des mutations du gène *SCN5A* dans cette population est de 18% à l'état de base et 61% après un test pharmacologique. Douze d'entre elles comptent au moins un patient non pénétrant pour le SBr malgré un test provocatif par un bloqueur des canaux sodiques. De plus, 5 d'entre elles (40%) comportent des individus atteints phénotypiquement sans posséder le variant *SCN5A* familial. Les familles A et D comptent respectivement 6 et 5 membres atteints par le SBr mais 3 (50%) et 2 (40%) d'entre eux ne possèdent pas de mutation dans le gène *SCN5A* (cf. Article 1, Figure 1). L'association « SBr et *SCN5A* » apparaît plus complexe que la relation perte de fonction du courant  $I_{Na}$  et ralentissement de la conduction cardiaque. Les variants retrouvés dans le gène *SCN5A* ne semble pas suffisants à expliquer le SBr. Ce travail rétrospectif montre que le modèle monogénique, initialement décrit, ne permet pas de comprendre le mécanisme électrophysiologique et empêche une bonne prédiction du risque rythmique. D'autres facteurs (génétiques) doivent intervenir dans l'expressivité phénotypique du SBr.

Un travail de séquençage de l'ensemble des gènes décrits dans le SBr (*GPD1L*, *CACNA1C*, *CACNB2*, *SCN1B*, *KCNE3* et *SCN3b*) va être entrepris chez les 8 patients SBr-ECG+ et négatif pour la mutation dans le gène *SCN5A* afin d'explorer la possibilité d'un deuxième évènement génétique pouvant conduire à un SBr. De plus ces 8 patients ne présentent pas de différences de durée de leurs intervalles PR et QRS par rapport aux patients non mutés et non atteints du SBr. Ces données pourraient suggérer que les troubles de la conduction seraient la conséquence des mutations du gène *SCN5A* et que le SBr aurait une origine génétique différente.

## I.2 **Projet 1b – Elucidation de la cause moléculaire d’une famille atteinte par le SBr où une mutation du gène *SCN5A* ne ségrége pas**

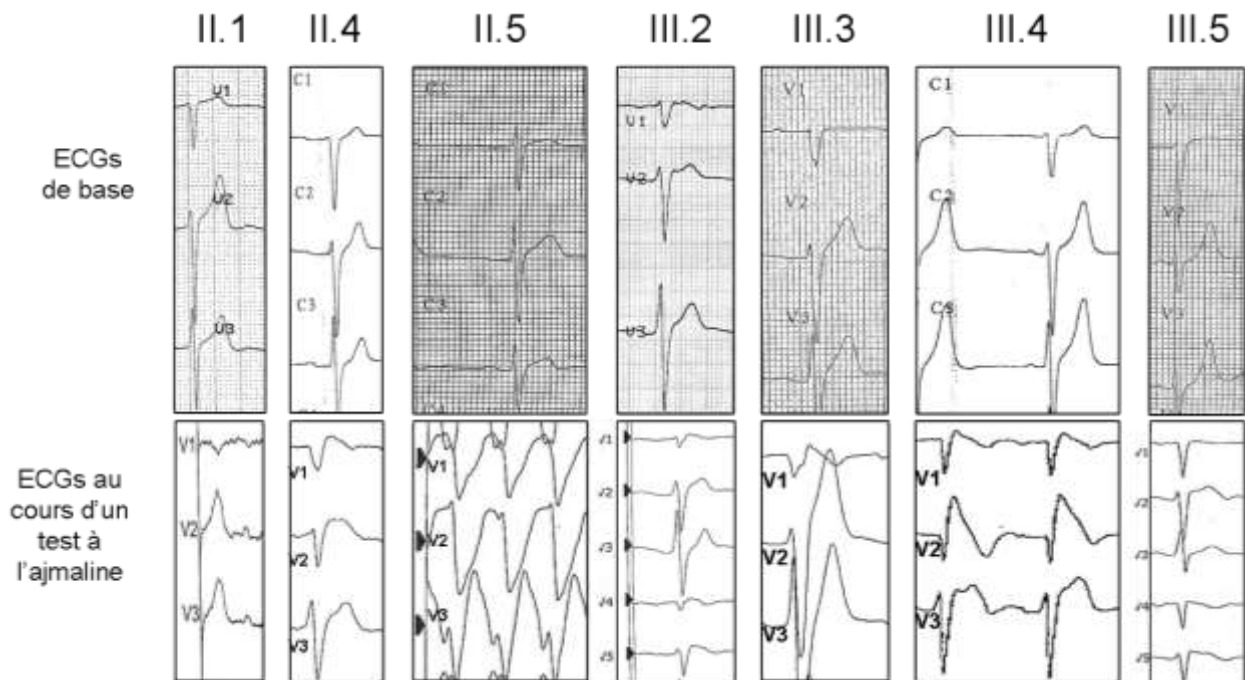
### I.2.1 Recrutement et étude clinique de la famille P

Un jeune homme de 22 ans a été admis au CHU de Rennes pour une mort subite récupérée sur fibrillation ventriculaire et une tachycardie ventriculaire monomorphe a pu être documentée (Figure 19).

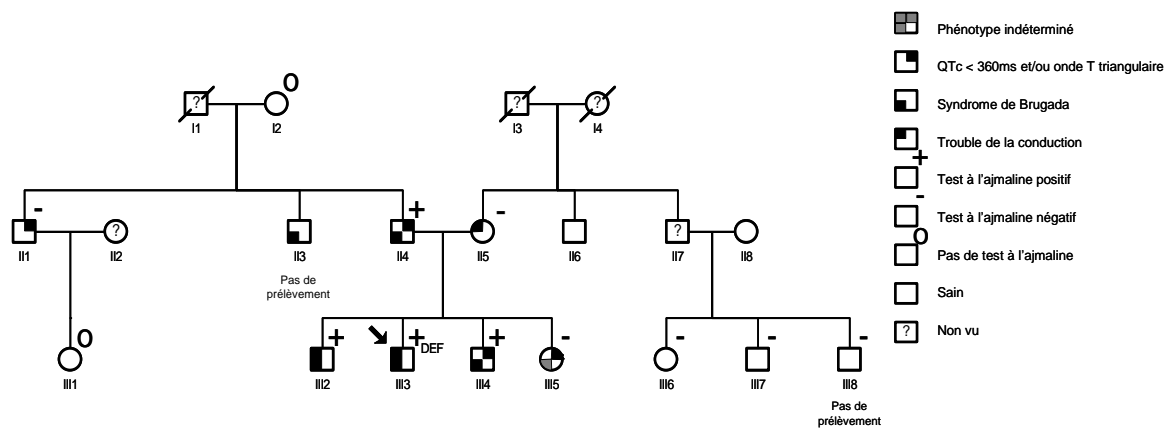


**Figure 19 – Electrocardiogramme du propositus de la famille P montrant une tachycardie ventriculaire monomorphe**

Un test utilisant un antiarythmique de classe I a permis de démasquer un aspect de SBr (Figure 20, III.3). Ce cas index a permis de recruter la famille P, elle comprend 5 membres atteints (II.3, II.4, III.2, III.3 et III.4) pour le phénotype SBr (Tableau 6; Figure 21). Nous n’avons pas pu inclure cette famille dans l’étude présentée précédemment car elle ne remplissait pas le critère d’inclusion du nombre de patients atteints (n=5) ayant un prélèvement. En effet, nous n’avons pu obtenir ni ADN ni ECG de l’individu II.3 pris en charge dans un autre centre. Une échocardiographie réalisée chez ce propositus et sur ses apparentés du premier degré n’a pas révélé d’anomalie structurelle.



**Figure 20 – Electrocardiogrammes de base et au cours d'un test à l'ajmaline, des individus II.1, II.4, II.5, III.2, III.3, III.4 et III.5 de la famille P**  
 ECGs de base des dérivations précordiales V1 à V3 (haut), ECGs au cours d'un test à l'ajmaline des dérivations précordiales (bas)



**Figure 21 – Arbre généalogique et caractéristiques cliniques de la famille P**  
 Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Les symboles barrés indiquent les individus décédés. Le propositus est indiqué par une flèche. DEF : DEFibrillateur automatique implantable

Chez les apparentés du premier degré on compte 3 membres atteints (II.4, III.2 et III.4) et un possédant un phénotype à la limite de la normale (III.5). Les individus II.4, III.4 et III.5 montrent un aspect électrocardiographique associant un SBr, un intervalle QT raccourci (< 360 ms) et une onde T étroite et triangulaire (Tableau 6; Figure 20). Le père (II.4), transmetteur des phénotypes « SBr et QT court » possède une histoire familiale de ces pathologies chez ses deux frères (Figure 21 II.1 et II.3).

**Tableau 6 – Caractéristiques cliniques et moléculaires de la famille P**

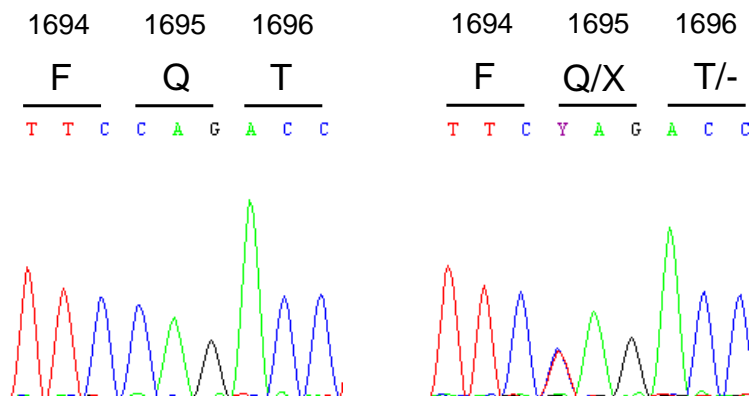
	ECG de base			Aspect onde T en V2	Trouble de conduction à l'ECG de base	Test à l'ajmaline	Sus. décalage du segment ST (en mm)	Aspect du ST	Mutation Na <sub>v</sub> 1.5	Variant Ca <sub>v</sub> 1.2	Antécédents
	QTc (ms)	PR (ms)	QRS (ms)								
II.1	369	180	80	Haute, étroite et symétrique	0	-	0	0	non muté	N300D	0
II.4	347	220	100	Étroite et symétrique	0	+	3	Convexe	non muté	N300D	FV lors d'une stimulation ventriculaire programmée
II.5	382	197	108	normale	HBAG	0	TV	0	Q1695X	non mutée	TV monomorphe lors du test à l'ajmaline. IDM
II.6	410	160	80	normale	0	0	0	0	non muté	non muté	0
III.2	394	201	121	normale	BBD	+	3	Convexe	Q1695X	N300D	0
III.3	377	206	108	Haute et large	BID	+	3	Convexe	Q1695X	N300D	syncope au repos
III.4	337	143	99	Haute, étroite et symétrique	0	+	9	Convexe	non muté	N300D	0
III.5	348	150	75	Haute, étroite et symétrique	0	-	2	en Selle	non mutée	N300D	0
III.6	425	157	85	normale	0	-	0	0	non mutée	non mutée	0
III.7	381	149	87	normale	0	-	0	0	non muté	non muté	0

BBD : Bloc de Branche Droit; BID : Bloc Incomplet Droit, HBAG : Héli-Bloc Antérieur Gauche ; IDM : Infarctus Du Myocarde ; + : positif ; - : négatif ; 0 : pas d'information ; TV : Tachycardie Ventriculaire ; FV : Fibrillation Ventriculaire.

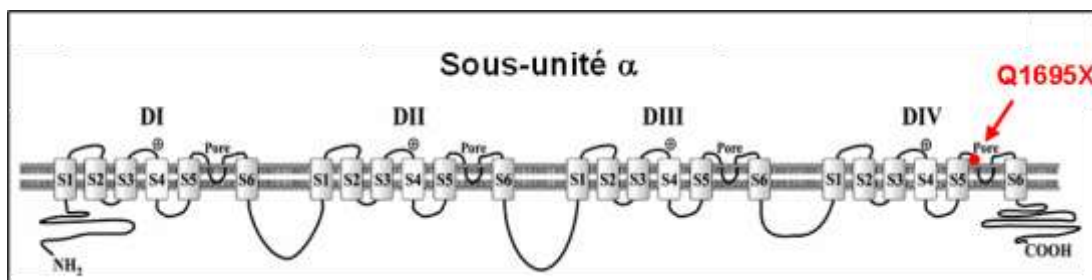
### I.2.2 Etude génotype/phénotypique SCN5A-Q1695X/SBr de la famille P

L'analyse moléculaire du gène SCN5A a été réalisée au CHU de Nantes et nous a permis de mettre en évidence, chez le propositus, la mutation non-sens p.Q1695X.

Il s'agit d'une substitution c.5277C>T créant un codon stop en position 1695 (p.Q1695X ; NP\_932173) (Figure 22). La protéine Na<sub>v</sub>1.5 est tronquée de 75% de sa boucle DIV-S5-S6 (contenant la boucle du pore et le domaine de régulation par la sous unité β [Makita *et al.* 1996]), de son segment DIV-S6 et de sa queue C-terminale (Figure 23).

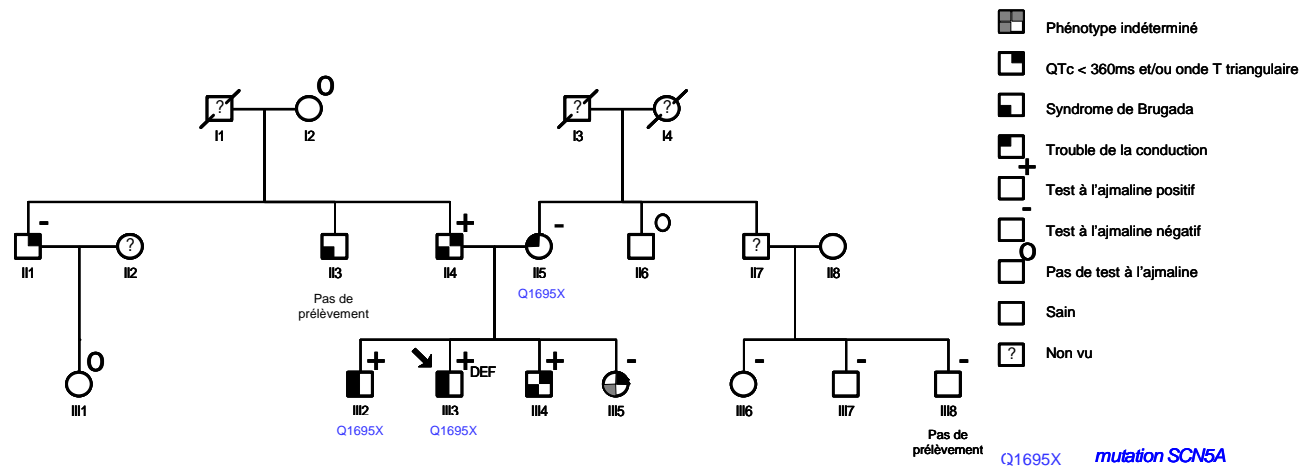


**Figure 22 – Electrophorégramme de la séquence d'un individu contrôlé (gauche) et du propositus de la famille P muté pour le gène SCN5A : p.Q1695X (droite)**  
 Substitution c.5277C>T conduisant à la création d'un codon stop en position 1695 (p.Q1695X)



**Figure 23 – Représentation schématique de la sous unité α du canal sodique Na<sub>v</sub>1.5 et de la mutation non-sens p.Q1695X**  
 La sous-unité α de Na<sub>v</sub>1.5 est constituée de quatre domaines DI-DIV à six segments transmembranaires S1-S6. Modifié d'après [Moric *et al.* 2003]

Deux autres membres de la famille : son frère (III.2) et sa mère (II.5) sont également porteurs de cette mutation. Cependant, la mutation n'a pas été retrouvée chez deux autres individus atteints du SBr (Figure 24 II.4 et III.4). Cette famille vient s'ajouter à celles décrites dans le projet 1a où la mutation du gène SCN5A ne ségrège pas avec le phénotype SBr. Deux patients possèdent un SBr sans partager la mutation familiale sodique.



**Figure 24 – Arbre généalogique de la famille P : ségrégation de la mutation *SCN5A* p.Q1695X**

Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Les symboles barrés indiquent les individus décédés. Le *propositus* est indiqué par une flèche. DEF : DEFibrillateur automatique implantable

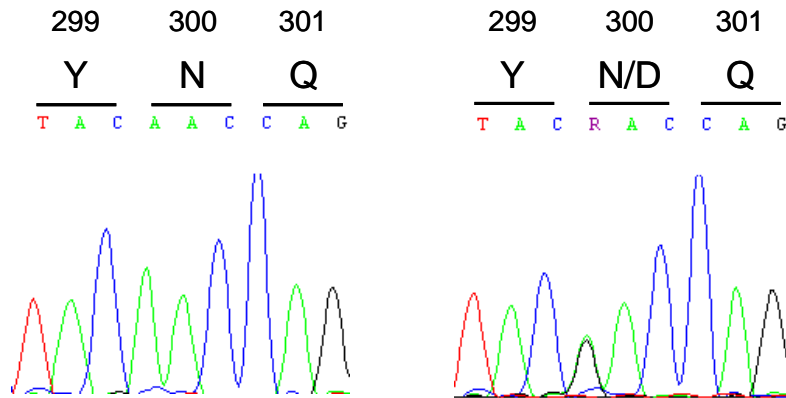
Ce variant est transmis par la mère (II.5) qui ne présente a priori pas de SBr après un test à l'ajmaline bien qu'elle ait fait une tachycardie ventriculaire au cours de ce test (Figure 20 II.5). Elle ne présente pas d'histoire familiale de la pathologie et une recherche du variant p.Q1695X dans la branche maternelle s'est révélée négative. Cette mutation ne ségrège pas avec le phénotype « SBr » (2 individus porteurs de la mutation *SCN5A*-p.Q1695X / 4 individus atteints) mais avec celui du « trouble de la conduction » (3 individus porteurs de la mutation *SCN5A*-p.Q1695X / 3 individus atteints) (Figure 24). La relation génotype/phénotype *SCN5A*/SBr montre des discordances suggérant l'existence d'autres bases moléculaires.

L'absence d'une bonne corrélation génotype/phénotype nous a conduit à rechercher d'autres marqueurs moléculaires pour expliquer la ségrégation du SBr dans cette famille. D'un côté le travail réalisé par l'équipe de Charles Antzelevitch décrivant des mutations dans les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$  associées à un phénotype chevauchant SBr et SQTC [Antzelevitch *et al.* 2007] et de l'autre la présence de deux individus présentant ce double phénotype (II.4 et III.4), nous a orienté vers le séquençage des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$ .

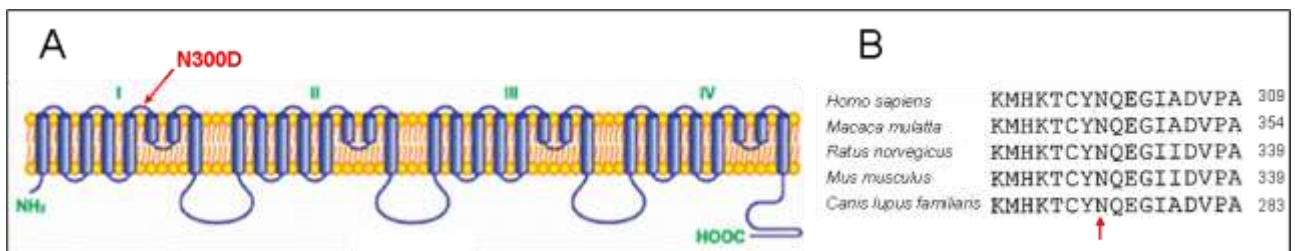
### I.2.3 Variant dans le gène *CACNA1C* codant pour le canal calcique voltage dépendant $Ca_v1.2$

Suite à la publication de Charles Antzelevitch associant des mutations dans le gène *CACNA1C* et le phénotype SBr et SQTC [Antzelevitch *et al.* 2007], nous avons identifié un variant dans la sous unité alpha du canal calcique  $Ca_v1.2$  chez l'individu (III.4) présentant les deux phénotypes. Il s'agit d'une substitution c.898A>G conduisant à la mutation faux-sens p.N300D (NP\_000710) (Figure 25). Elle se situe dans la boucle extracellulaire entre les

segments S5 et S6 du domaine I (Figure 26A). Ce variant est rare puisque non retrouvé parmi 576 allèles contrôles et conservé au travers des espèces (Figure 26B).



**Figure 25 – Electrophorégramme de la séquence d’un individu contrôle (gauche) et de l’individu III.4 de la famille P muté pour le gène *CACNA1C* : p.N300D (droite)**  
 Substitution c.898A >G conduisant à la mutation faux-sens p.N300D



**Figure 26 – A Représentation schématique du canal calcique  $Ca_v1.2$  et du variant faux-sens p.N300D. B Conservation de l’acide aminé asparagine (N) en position 300 du gène *CACNA1C* (NP\_000710) au travers des espèces de mammifères**  
 Modifié d’après [Yang et Berggren 2005]

Ce variant ségrège chez deux individus au phénotype SBr (III.2 et III.3), chez une patiente au phénotype compatible avec un SQTC et indéterminé pour le SBr (III.5), chez un patient au phénotype compatible avec un SQTC (II.1) et chez 2 individus présentant les deux phénotypes (II.4). Tous les individus négatifs pour ce variant ne présentent pas d’anomalie électrocardiographique (I.2, II.6, III.1, III.6, III.7 et III.8) (Figure 27).





On note une bonne corrélation entre le phénotype SBr et le variant *CACNA1C*-p.N300D (Figure 27). Les patients II.4, III.4 et III.5 de la famille P présentent un intervalle QTc raccourci rappelant les travaux de Charles Anztelevitch associant des mutations dans le canal  $Ca_v1.2$  et un syndrome chevauchant QT court et SBr. On a observé que les patients portant le variant *CACNA1C*-p.N300D possèdent un raccourcissement significatif de leur intervalle QT par rapport aux non porteurs ( $p=0.024$ ) et par rapport aux individus *SCN5A<sup>N</sup>* et *CACNA1C<sup>N</sup>* ( $p=0.009$ ). De plus les individus porteurs exclusifs du variant *CACNA1C*-p.N300D (Figure 20 II.1, II.4, III.4 et III.5) ont une onde morphologie de l'onde T particulière : souvent de grande amplitude, étroite et symétrique. Le variant *CACNA1C*-p.N300D ne semble pas affecter la conduction cardiaque puisqu'on ne constate pas de différence de durée des intervalles PR et QRS entre les groupes *CACNA1C*-p.N300D vs *CACNA1C<sup>N</sup>* respectivement  $p=0.39$  et  $p=0.3$  et *CACNA1C*-p.N300D vs *CACNA1C<sup>N</sup>* et *SCN5A<sup>N</sup>* respectivement  $p=0.18$  et  $p=0.25$ .

### I.2.5 Discussion du projet 1b

Le défaut de ségrégation des mutations du gène *SCN5A* dans le SBr observé dans le projet 1a est retrouvé dans la famille P. Le variant *SCN5A*-p.Q1695X ne ségrège pas avec le phénotype SBr (2 individus porteurs de la mutation *SCN5A*-p.Q1695X / 4 individus atteints), il est hérité de l'individu (II.5) asymptomatique alors que le conjoint (II.4) est symptomatique après stimulation ventriculaire programmée. Compte tenu de la rareté du SBr, il est peu probable que les deux parents en soient transmetteur. La bonne ségrégation entre le variant *CACNA1C*-p.N300D et les phénotypes SBr et/ou SQTC conforte l'hypothèse que le variant du gène *SCN5A*-Q1695X ne suffit pas à provoquer le SBr. Le variant *SCN5A*-p.Q1695X corrèle avec les troubles de la conduction observés dans cette famille et ceux observés dans d'autres mutations stop situées dans la même région : p.S1710+75X et p.S1812X [Schott *et al.* 1999; Schulze-Bahr *et al.* 2003]. L'allongement significatif des intervalles PR et QRS des porteurs de la mutation *SCN5A*-p.Q1695X vs les individus *SCN5A<sup>N</sup>* et *CACNA1C<sup>N</sup>* vient confirmer l'implication de cette mutation dans les troubles de la conduction.

La corrélation *CACNA1C*-N300D/SBr et/ou SQTC confirmerait également l'implication du canal calcique  $Ca_v1.2$  dans un phénotype complexe associant SBr et SQTC. Cependant les porteurs des deux variants (*SCN5A*-Q1695X et *CACNA1C*-N300D) semblent avoir un raccourcissement modéré de l'intervalle QT (individus : III.2 : 394 ms et III.3 : 377 ms) et une normalisation de la morphologie de leur onde T ce qui suggèrent que l'effet fonctionnelle de ces mutations ne sont pas indépendantes.

L'étude fonctionnelle du variant *CACNA1C*-p.N300D est actuellement réalisée dans l'équipe d'électrophysiologie du laboratoire. Elle permettra de comprendre le mécanisme physiopathologique aboutissant au SBr mais également d'appréhender l'interaction

fonctionnelle des canaux sodiques et calciques observés chez les porteurs des deux variants (*SCN5A*-p.Q1695X et *CACNA1C*-p.N300D). On pourra alors tenter d'expliquer les différents phénotypes retrouvés au sein de cette famille.

De toute évidence, la mutation stop p.Q1695X retrouvée dans le gène *SCN5A* ne permet pas d'expliquer le SBr. A l'image de la famille P, il faudra peut être revenir sur des diagnostics moléculaires (mutation dans le gène *SCN5A*) posés pour des patients atteints d'un SBr et rechercher de nouveaux variants afin d'améliorer la relation génotype/phénotype de ce syndrome. Il est possible qu'une proportion de ces nouveaux variants se combine ou s'additionne à ceux préalablement identifiés et forment ainsi un nouveau modèle génétique pour le SBr du type oligogénique.

L'individu II.1 ne présente pas de SBr malgré un test provocatif à l'ajmaline. Il semble non pénétrant pour le SBr mais on observe chez lui une morphologie de l'onde T compatible avec un SQTC et un QTc raccourci à 369 ms. De manière intéressante, en plus de la description du syndrome chevauchant SBr et SQTC, l'équipe de Charles Anztelevitch a publié le cas d'une mutation dans la sous unité  $\beta$  du canal  $Ca_v1.2$  associé à un SBr isolé [Cordeiro *et al.* 2009]. Sur ce schéma, il serait intéressant d'étudier la prévalence des gènes codant les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  du canal  $Ca_v1.2$  chez des patients atteints d'un SQTC isolé.

### **I.3                   Projet 1c – Identification d'un nouveau locus pour le SBr**

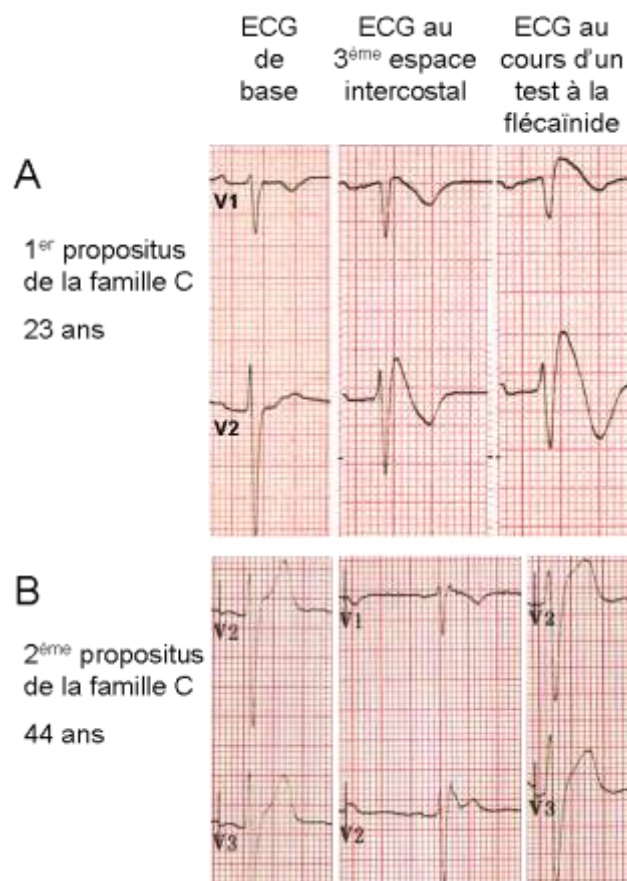
Le projet 1a montre que outre le fait que l'on retrouve une mutation dans le gène *SCN5A* chez environ 15 à 21% des patients atteints du SBr, ce gène ne suffit pas à lui seul à provoquer le phénotype du SBr. Le projet 1b a permis de démontrer qu'une famille, atteinte par le SBr où une mutation non-sens *SCN5A* n'expliquait pas la ségrégation du phénotype, pouvait être touchée par une autre mutation dans un autre gène. La prévalence des autres gènes du SBr semble faible et ne permettront pas d'expliquer la majorité des patients au diagnostic moléculaire négatif pour le SBr. Un travail d'identification de nouveaux gènes et/ou la description d'un nouveau modèle génétique pour ce syndrome doit être entrepris afin de mieux prévenir la survenue d'arythmies et de mort subite chez ces patients.

L'une des approches les plus puissantes pour la découverte de nouveaux marqueurs moléculaires est l'étude familiale par son analyse de liaison. Nous avons à Nantes l'opportunité unique d'explorer la population de l'Ouest de la France, population génétiquement isolée comparable à celle de l'Islande (dont la généalogie est entièrement connue) et caractérisée par de grandes familles s'étendant sur plusieurs siècles.

#### **I.3.1 Recrutement et étude clinique d'une grande famille de syndrome de Brugada**

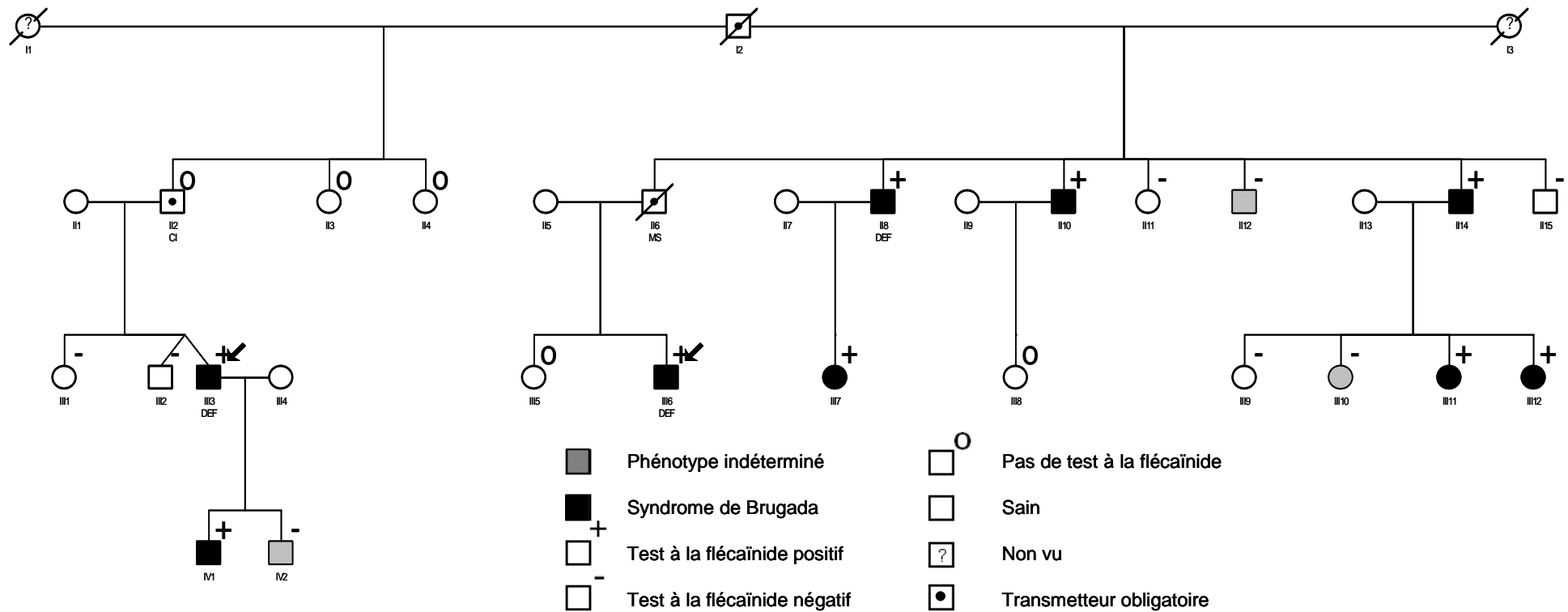
En 2002, un homme de 23 ans a été hospitalisé au CHU de Nantes pour l'exploration d'une syncope à l'emporte-pièce. Le diagnostic du SBr a été posé devant un aspect électrocardiographique de type I dans les dérivations précordiales droites au 3<sup>ème</sup> espace intercostal alors que les examens cliniques, biologiques et échocardiographiques étaient normaux. Un test provocatif à la flécaïnide est venu confirmer le diagnostic de SBr (Figure 28A).

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 28B). 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.



**Figure 28 – Electrocardiogrammes de base, au 3<sup>ème</sup> espace intercostal et au cours d'un test à la flécaïnide A du premier probandus et B du deuxième probandus de la famille C**  
ECGs des dérivation précordiales V1 et V2 ou V2 et V3

Le dépistage familial a finalement été accepté permettant de recruter une famille (Famille C) de 24 individus apparentés dont 9 étaient atteints du SBr, 9 sont sains, 3 ont un phénotype indéterminé, 3 sont considérés comme transmetteur obligatoire (Figure 29). Entre temps, le père (II.6) du premier probandus (III.6) était décédé d'une mort subite possiblement liée à un trouble du rythme ventriculaire. Parmi les 9 atteints, on note une nette prédominance masculine 6 hommes pour 3 femmes. A l'ECG de base, 4 individus sur les 9 atteints possédaient un aspect électrocardiographique indéterminé (SBr de type 2 ou 3), en plaçant les électrodes précordiales droites au 3<sup>ème</sup> espace intercostal (au lieu du 4<sup>ème</sup>) 6 ont un phénotype indéterminé et le premier probandus (III.6) a un aspect de type 1 (d'après les recommandations de la 2<sup>ème</sup> conférence de consensus du SBr [Antzelevitch *et al.* 2005a]). Le test provocatif à la flécaïnide a permis de démasquer un SBr de type 1 chez 8 individus et de confirmer celui du premier probandus (III.6). La durée moyenne des intervalles QRS, PR et QTc des 9 individus atteints est de, respectivement, 98, 163 et 408 ms (Tableau 7).



**Figure 29 – Arbre généalogique de la famille C**

Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Les symboles barrés indiquent les individus décédés. Les probandus sont indiqués par une flèche. La famille C compte 24 individus apparentés dont 9 sont atteints par le SBr, 9 sont sains, 3 ont un phénotype indéterminé, 3 sont considérés comme transmetteur obligatoire. Dix sept patients ont subi un test provocatif à la flécaïnide : 9 répondent positivement et 8 négativement. DEF : DEFibrillateur automatique implantable, MS : Mort Subite, CI : Cardiopathie Ischémique.

Tableau 7 – Caractéristiques cliniques de la famille C

individu	Phénotype (N: Normal, 1: SBr de type 1, 2: SBr de type 2 et 3: SBr de type 3)			Statut phénotypique	QRS (ms)	PR (ms)	QTc (ms)
	ECG de base (électrodes précordiales droites placées au 4 <sup>ème</sup> espace intercostal)	ECG de base (électrodes précordiales droites déplacées au 3 <sup>ème</sup> espace intercostal)	ECG après un test provocatif à la flécaïnide				
II.8	2	2	1	Atteint	100	180	409
II.10	N	N	1	Atteint	94	186	400
II.14	3	2	1	Atteint	96	150	420
III.3	2	2	1	Atteint	86	136	401
III.6	N	1	1	Atteint	92	142	409
III.7	N	3	1	Atteint	104	200	433
III.11	N	3	1	Atteint	106	156	393
III.12	N	N	1	Atteint	94	138	433
IV.1	2	2	1	Atteint	112	176	374

Phénotype : N : Normal (vert : sain) ; 1 : SBr de type 1 (rouge : atteint) ; 2 : SBr de type 2 et 3 : SBr de type 3 (orange : indéterminé)

Trois membres de la famille ont été implantés d'un défibrillateur : les 2 propositus (III.3 et III.11) symptomatiques (syncopes) et l'individu II-8 suite à une stimulation ventriculaire programmée positive ayant déclenché une fibrillation ventriculaire soutenue.

La transmission de la pathologie suit un modèle autosomique dominant comme décrit dans la littérature. Le travail moléculaire a commencé par l'exclusion de l'ensemble des gènes associés au SBr.

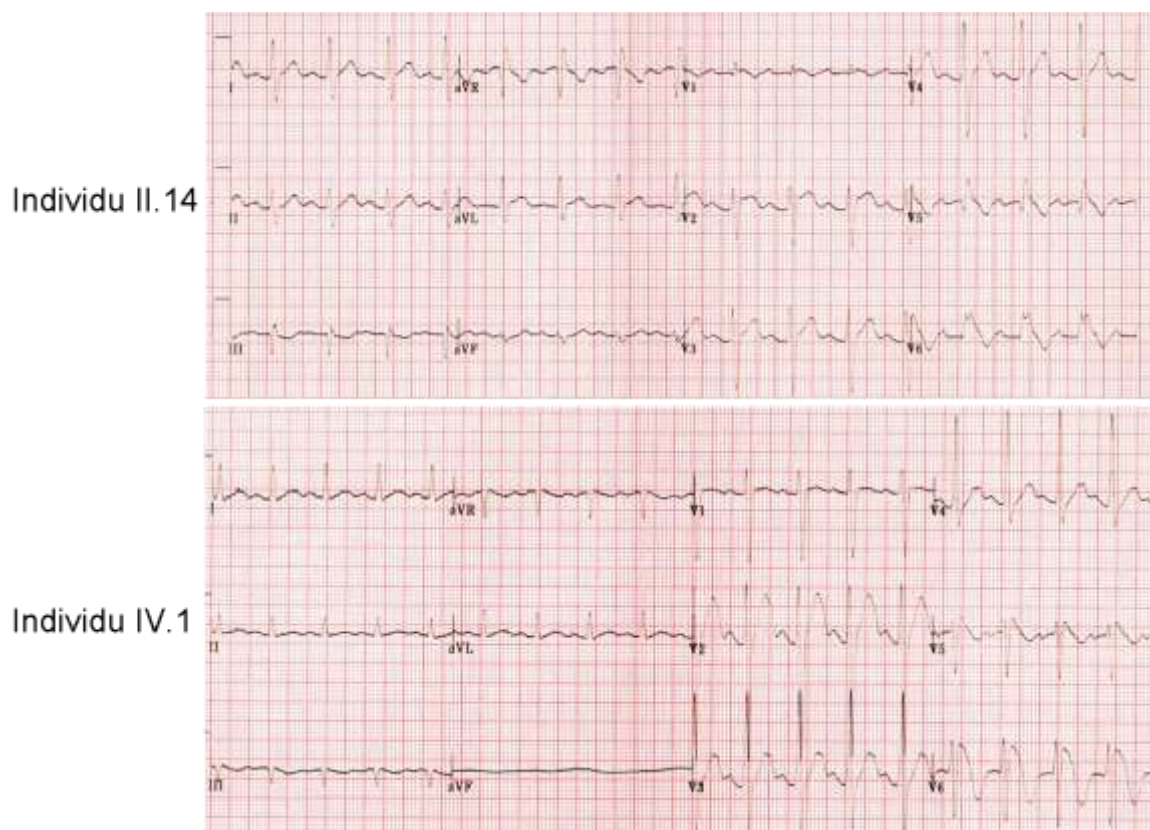
### I.3.2 Séquençage direct des gènes candidats du syndrome de Brugada

Le séquençage du gène *SCN5A* a été réalisé chez les 2 propositus (III.3 et III.11) et chez deux atteints de la deuxième génération (II.8 et II.14). Une recherche de variant a été effectuée dans le promoteur (2 Kb en amont de l'ATG), dans les régions codantes ainsi que dans celles bordant les exons. Un variant de *SCN5A* a été retrouvé chez le premier propositus (III.11). Ce variant p.D1275N est une substitution d'une guanine par une adénine en position c.3823 dans l'exon 21 de *SCN5A*. Il aboutit au remplacement d'un acide aspartique par une asparagine en position p.1275 dans le segment transmembranaire S3 du domaine III de la sous unité  $\alpha$  du canal sodique cardiaque  $Na_v1.5$ . Ce variant n'a été retrouvé chez aucun autre membre atteint de la famille. Le séquençage de *SCN5A* chez la mère asymptomatique (II-5) (II n'y avait pas de prélèvement sanguin pour le père qui était mort un an avant le dépistage familial) a montré qu'elle avait transmis le variant p.D1275N au propositus. Elle ne possède pas de lien de parenté avec le reste de la famille. Enfin aucun réarrangement de grande taille n'a été mis en évidence par la technique de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Le séquençage des gènes *GPD1L*, *SCN1b*, *KCNE3*, *SCN3B* et *SCN4b* n'a pas permis

d'identifier de variant co-ségrégeant avec la maladie et m'a donc orienté vers une analyse de liaison pangénomique.

### I.3.3 Analyse de liaison pangénomique

Le LOD score théorique maximal de la famille C a été estimé à 5.72 (FastSLink v2.51). J'ai donc réalisé l'analyse de liaison à l'échelle du génome à l'aide de 400 marqueurs microsatellites. De façon surprenante, j'ai identifié une liaison significative ( $Z(\max) = 3,31$ , à  $\theta = 0\%$ ) au marqueur D3S1266 compatible avec le locus SBr2 et celui de la DAVD5 et proche du locus SBr1. La construction d'un haplotype pour chaque membre de la famille a permis de délimiter une région, grâce aux recombinaisons méiotiques, à 24 Mb en 3p22.3-p25.3 comprenant 139 gènes. La borne télomérique est définie par l'individu II.14 par le marqueur D3S1263 et la borne centromérique est délimitée par l'individu IV.1 par le marqueur D3S3512. Ces deux individus présentent un SBr de type 1 après un test provocatif à la flécaïnide (Figure 30). L'individu IV.1 permet d'exclure de la zone de liaison le gène *SCN5A*, 4Mb séparent la borne basse de ce locus et le gène codant le canal sodique cardiaque majoritaire. Cette zone chromosomique inclue le locus SBr2 et donc le gène *GPD1L* (Figure 31).



**Figure 30 – Electrocardiogramme des individus II.14 et IV.1 de la famille C montrant un aspect de SBr de type 1 au cours d'un test provocatif à la flécaïnide**

Les ECGs de ces 2 patients montrent un sus-décalage du segment ST supérieur à 2 mm dans au moins 2 dérivations précordiales consécutives. Le phénotype de ces 2 individus a donc été considéré comme « atteint »



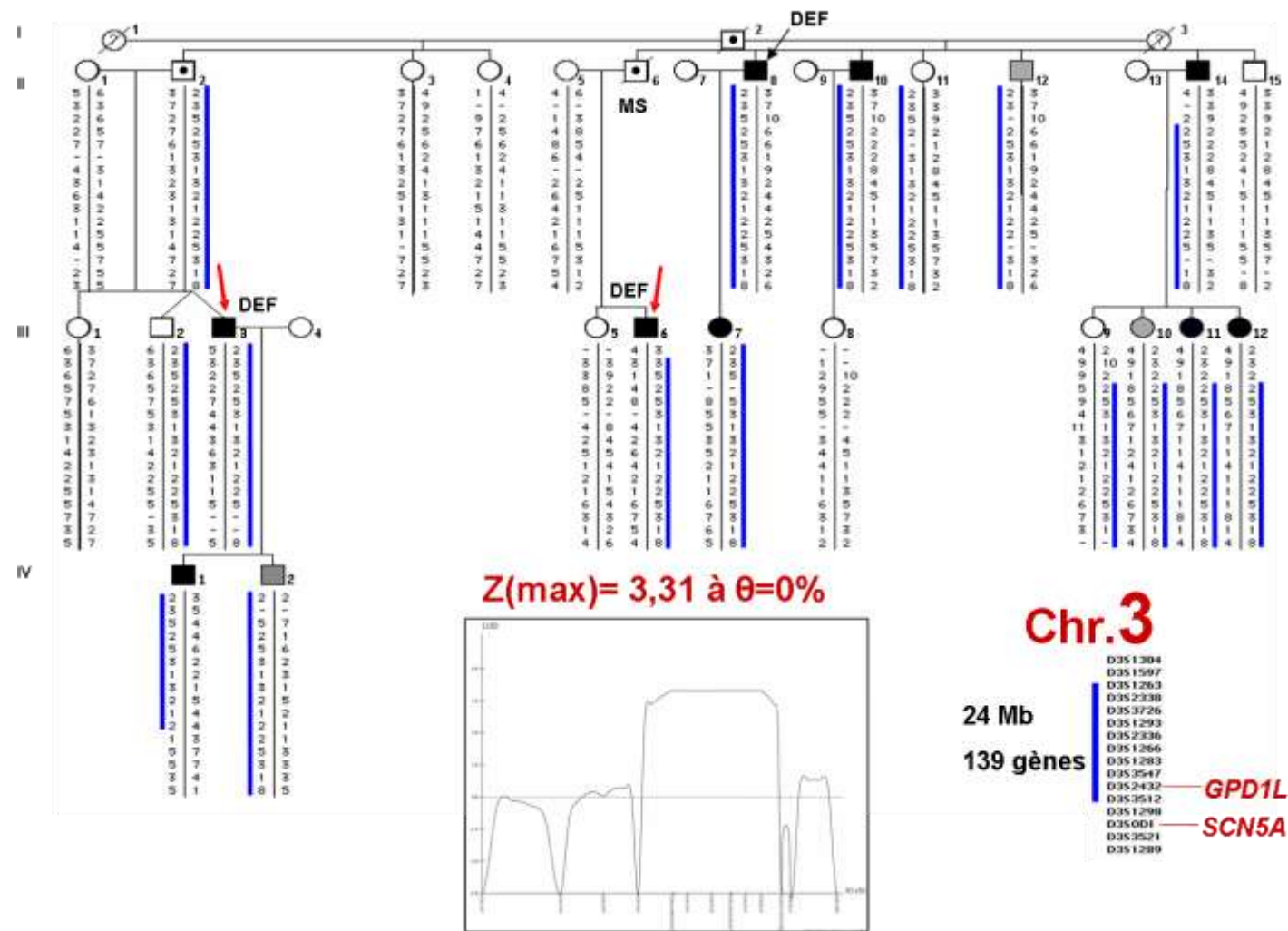


Figure 31 – Arbre généalogique de la famille C (haut) montrant un haplotype commun aux individus atteints en 3p22.3-p25.3. Représentation graphique du Lod Score (bas) multipoints obtenu  $Z(\max)= 3,31$  à 0% de recombinaison et à une pénétrance de 100% (GeneHunter). Seize marqueurs microsatellites ont été utilisés pour génotyper ce locus : D3S1304, D3S1597, D3S1263, D3S2338, D3S3726, D3S1293, D3S2336, D3S1266, D3S1283, D3S3547, D3S2432, D3S3512, D3S1298, D3SOD1 (microsatellite non répertorié, intragénique au gène SCN5A), D3S3521 et D3S1289. La barre bleue représente la partie de l'haplotype commun avec l'haplotype morbide ancestral. DEF : DEFibrillateur automatique implantable automatique, MS : Mort Subite. Chr. : Chromosome. Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Les symboles barrés indiquent les individus décédés. Les propositus sont indiqués par une flèche. La légende utilisée pour caractériser le phénotype des individus est la même que dans la Figure 29

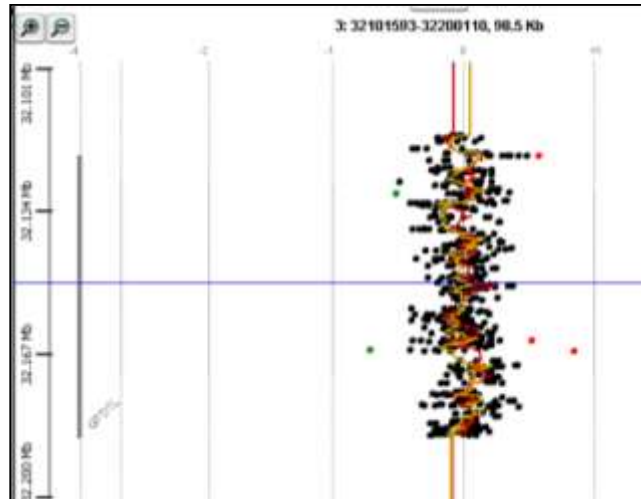
### I.3.4 Recherche du variant morbide dans les gènes du locus 3p22.3-p25.3

Cette région chromosomique partagée par tous les membres atteints de la famille compte 139 gènes. Parmi eux le gène *GPD1L* semblait le meilleur candidat mais déjà exclu auparavant par séquençage direct. J'ai entrepris de séquencer sa région promotrice ainsi que la partie 3' UTR. Aucune mutation ponctuelle ni petit réarrangement n'a été identifié. Une nouvelle hypothèse serait l'existence d'un grand réarrangement non détecté par le séquençage. L'existence d'un marqueur microsatellite intragénique (D3S2432) hétérozygote situé entre l'exon 1 et 2 démontre que le gène *GPD1L* n'est pas délété dans son ensemble. Afin de tester l'hypothèse d'un réarrangement, de type délétion ou duplication, de plus petite taille, une puce CGH (« Custom HD-CGH Microarrays 2 x 105K ») dédiée aux gènes candidats des arythmies cardiaques a été réalisée. La composition de la puce a été menée de façon à obtenir une couverture pangénomique (105K soit un pas d'environ 30Kb) et une densification des oligonucléotides dans 117 gènes candidats.

**Tableau 8 – Listes des 117 gènes candidats aux arythmies cardiaques densifiés en oligonucléotides sur la puce à façon HD-CGH Microarrays 2 x 105K**

<i>ABCB6</i>	<i>ATP2A1</i>	<i>CACNA2D2</i>	<i>CLCA1</i>	<i>FKBP1B</i>	<i>KCNA2</i>	<i>KCNE2</i>	<i>KCNJ5</i>	<i>LMNA</i>	<i>SCN1B</i>	<i>SLC8A1</i>	<i>TRPC6</i>
<i>ABCC8</i>	<i>ATP2A2</i>	<i>CACNA2D4</i>	<i>CLCN2</i>	<i>FLNA</i>	<i>KCNA4</i>	<i>KCNE3</i>	<i>KCNJ8</i>	<i>NEDD4L</i>	<i>SCN2B</i>	<i>SNTA1</i>	<i>TRPC7</i>
<i>ABCC9</i>	<i>ATP2B4</i>	<i>CACNB2</i>	<i>CLCN3</i>	<i>GJA1</i>	<i>KCNA5</i>	<i>KCNE4</i>	<i>KCNK1</i>	<i>NOS1AP</i>	<i>SCN3A</i>	<i>TGFB1</i>	<i>TRPM4</i>
<i>ADRB1</i>	<i>BEST2</i>	<i>CALM1</i>	<i>DCTN2</i>	<i>GJA5</i>	<i>KCNAB1</i>	<i>KCNH2</i>	<i>KCNK10</i>	<i>PIAS3</i>	<i>SCN3B</i>	<i>TNC</i>	<i>TRPM5</i>
<i>ADRB2</i>	<i>CACNA1C</i>	<i>CAMK2D</i>	<i>DERL1</i>	<i>GJA7</i>	<i>KCNAB2</i>	<i>KCNIP2</i>	<i>KCNK2</i>	<i>PKP2</i>	<i>SCN4A</i>	<i>TNR</i>	<i>TUBB</i>
<i>AKAP9</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>CASQ2</i>	<i>DPP6</i>	<i>GPD1L</i>	<i>KCNB2</i>	<i>KCNJ11</i>	<i>KCNK3</i>	<i>PLN</i>	<i>SCN4B</i>	<i>TRDN</i>	<i>YWHAE</i>
<i>ALG10</i>	<i>CACNA1E</i>	<i>CAV3</i>	<i>DSC2</i>	<i>HCN1</i>	<i>KCND2</i>	<i>KCNJ12</i>	<i>KCNK4</i>	<i>PPP3CA</i>	<i>SCN5A</i>	<i>TRPC1</i>	<i>YWHAH</i>
<i>ANK2</i>	<i>CACNA1G</i>	<i>CDH12</i>	<i>DSG2</i>	<i>HCN2</i>	<i>KCND3</i>	<i>KCNJ2</i>	<i>KCNK5</i>	<i>RYR2</i>	<i>SCN7A</i>	<i>TRPC3</i>	
<i>ANK3</i>	<i>CACNA1H</i>	<i>CDH13</i>	<i>DSP</i>	<i>HCN3</i>	<i>KCNE1</i>	<i>KCNJ3</i>	<i>KCNK6</i>	<i>SCN10A</i>	<i>SCN8A</i>	<i>TRPC4</i>	
<i>ASPH</i>	<i>CACNA2D1</i>	<i>CDH2</i>	<i>FHL2</i>	<i>HCN4</i>	<i>KCNE1L</i>	<i>KCNJ4</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>SCN1A</i>	<i>SLC6A2</i>	<i>TRPC5</i>	

La région du gène *GPD1L* compte 310 sondes soit une sonde tous les 200pb. Aucun réarrangement génomique n'a été détecté (Figure 32).



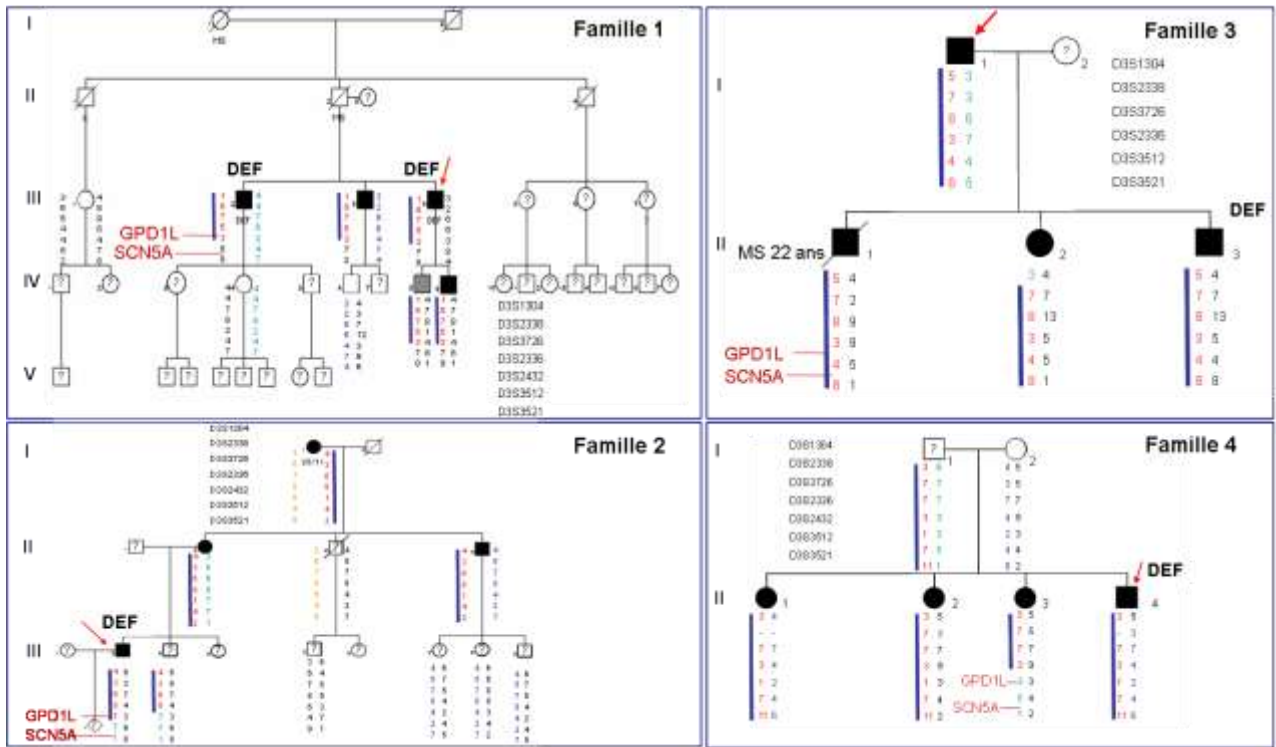
**Figure 32 – Représentation graphique du résultat de la puce Custom HD-CGH Microarrays 2 x 105K interrogant la région du gène GPD1L du propositus de la famille C en « dye-swap »**

Le logiciel CGH Analytics 3.4 montre les ratios de fluorescence pour chaque sonde oligonucléotidique (points noirs, verts et rouges). Les sondes sont positionnées selon le Build 36 du NCBI. Au niveau du gène GPD1L, visualisation de la moyenne des variations en jaune et en rouge car l'expérience a été menée en dye swap. « Dye Swap » : hybridation de chaque ADN avec chacun des deux fluorophores Cy3 et Cy5 afin d'éliminer les faux-positifs dus à la différence de fluorescence des 2 fluorophores. (Principe et protocole de la CGH array : cf. annexe -III.1)

Parmi les 138 autres gènes de l'intervalle, se trouvent les gènes *KCNH8* et *TMEM43* qui codent respectivement un canal potassique sensible au voltage et une protéine transmembranaire impliqué dans la DAVD. Aucune mutation n'a été identifiée dans ces deux gènes par séquençage direct.

### **I.3.5 Génotypage de 10 familles non mutées pour le gène *SCN5A* pour le locus 3p22.3-p25.3**

Des analyses de liaisons à l'aide de marqueurs microsatellites ont été menées dans les familles les plus informatives afin d'évaluer la fréquence et la compatibilité de cette région avec le SBr. J'ai réalisé ce travail sur 10 familles exclues pour les gènes *SCN5A* et *GPD1L* par séquençage direct et comprenant au minimum 4 membres atteints. J'ai sélectionné un ensemble de 7 marqueurs microsatellites répartis dans le locus 3p22.3-p25.3 comprenant les loci SBr1 (3p21), SBr2 (3p24) et DAVD5 (3p23). Ce dernier a été génotypé du fait de sa localisation entre deux loci du SBr et des similitudes cliniques observées entre la DAVD et le SBr (cf. Introduction-III.1.5). Quatre familles sont compatibles avec le locus 3p22.3-p25.3 dont deux excluent le gène *SCN5A* (familles 1 et 2 Figure 33) et une exclut les gènes *SCN5A* et *GPD1L* (famille 4 Figure 33).



**Figure 33 – Arbres généalogiques montrant 4 familles compatibles avec le locus 3p22.3-p25.3**

L'analyse de liaison des familles 1 et 2 exclue le gène SCN5A tandis que celle de la famille 4 exclue les gènes SCN5A et GPD1L. Les microsatellites utilisés sont D3S1304, D3S1597, D3S2338 (sauf pour la famille 3), D3S3726, D3S2336, D3S3512 et D3S3521. DEF : DEFibrillateur automatique implantable, MS : Mort Subite. Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Les symboles barrés indiquent les individus décédés. Le propositus est indiqué par une flèche. La légende utilisée pour caractériser le phénotype des individus est la même que dans la Figure 29

### I.3.6 Discussion du projet 1c

La liaison génétique de la famille C avec le locus 3p22.3-p25.3 montre qu'il existerait un variant à effet fort proche physiquement mais excluant le gène historiquement décrit *SCN5A*. Cette hypothèse repose sur la recombinaison de l'individu IV.1 dont l'aspect électrocardiographique de SBr de type 1 est typique (Figure 30). Il a été observé lors d'un test pharmacologique à la flécaïnide. L'utilisation de flécaïnide est considérée comme moins sensible que l'ajmaline et pouvant mener à de faux négatifs [Wolpert *et al.* 2005a]. La positivité de ce test conforte donc le diagnostic de SBr pour cet individu. De plus, les membres atteints de cette famille ne présentent pas des durées d'intervalle PR et QRS allongées contrairement aux patients atteints par le SBr et mutés pour le gène *SCN5A* [Article 1; Yokokawa *et al.* 2007]. La faible sensibilité du test à la flécaïnide pourrait expliquer les 3 non pénétrants (individus II.11, III.2, III.9). Par ailleurs, deux de ces trois non pénétrants sont des femmes dont l'implication dans le SBr n'est que de 20 à 30% [Eckardt 2007; Benito *et al.* 2008]. Une influence hormonale (testostérone) a déjà été montrée dans l'apparition plus fréquente des caractéristiques électrocardiographique du SBr chez les hommes [Shimizu *et al.* 2007]. Cela expliquerait la faible fréquence de femmes présentant l'aspect électrocardiographique du SBr malgré une transmission des mutations équivalente [James *et al.* 2007].

La compatibilité de ce locus dans 4 autres familles sur 10 étudiées, malgré leur faible informativité, montre que cette région peut être impliquée à une fréquence non négligeable. Le séquençage de deux des meilleurs gènes candidats de l'intervalle n'ont pas révélé de variant. Devant le grand nombre de gènes contenus dans ce locus, une approche de re-séquençage de l'ensemble des exons a été choisie. Ce projet s'inscrit dans un projet pilote mené en collaboration avec le Sanger Institute dans le but de séquencer l'ensemble des exons du génome de 10 propositus atteints par le SBr à l'aide des nouvelles technologies de séquençage très haut débit. Le principe est, dans un premier temps, d'augmenter le nombre de copies des régions d'intérêts (exons) par des techniques d'amplification sur puce ou en phase liquide. Puis vient la phase de séquençage réalisée par la technique de terminateur réversible (cf. <http://www.nature.com/nrg/posters/sequencing>).

La présence d'un variant proche du locus SBr1 (*SCN5A*) permet d'imaginer un modèle génétique plus complexe avec une coségrégation de variants ( fréquent ou rare en cis ou en trans) pouvant être à l'origine des défauts de pénétrance observés dans les familles mutées pour le gène *SCN5A* [Spilianakis *et al.* 2005]. En effet, le locus 3p22.3-p25.3 montre qu'il existe un variant à effet fort dans une région proche des gènes *SCN5A* et *GPD1L*. Ce variant pourrait appartenir à une région chromosomique en déséquilibre de liaison avec une mutation du gène *SCN5A*. Cette mutation pourrait être dans ce cas un marqueur moléculaire du variant morbide

contenu dans le locus 3p22.3-p25.3. Cette double transmission de variants expliquerait les échecs d'analyses de liaison génétique entre la région chromosomique codant le canal sodique  $Na_v1.5$  et le SBr notamment par des évènements de recombinaison entre ces variants.

La proximité de ce locus 3p22.3-p25.3 avec celui des SBr1 (*SCN5A*) et 2 (*GPD1L*) pourraient laisser supposer à un modèle génétique plus complexe que le modèle monogénique décrit initialement. En effet la présence de deux variants ségrégeant ensemble formerait un modèle digénique. Ce modèle génétique plus complexe pourra peut être nous aider à la compréhension de la relation génotype/phénotype du SBr.

## I.4 Discussion générale du projet 1

La découverte de déterminants génétiques du SBr, à l'exception du gène *GPD1L*, s'est faite par des approches gènes candidats. On sait aujourd'hui que cette approche est peu puissante. On retrouve en effet un grand nombre de variants rares exoniques allant jusqu'à la perte d'une copie de gène en passant par des variants stop sans avoir d'impact phénotypique [Tarpey *et al.* 2009]. Ce travail dirigé par Mickael Stratton montre que le séquençage des exons du chromosome X de 18 patients mène à l'identification de 983 substitutions faux-sens et plus de 1000 variants si l'on ajoute les substitutions non-sens et les délétions ou insertions décalant le cadre de lecture [Tarpey *et al.* 2009]. En faisant l'approximation qu'il existe 1000 gènes sur le chromosome X, on a alors une chance sur 18 (6%) d'identifier un variant modifiant la structure primaire d'une protéine. L'impact fonctionnel de ces variants sur le phénotype exige une étude de leur fréquence dans la population générale, de leur conservation au travers des espèces et des travaux fonctionnels dans des modèles de réexpression.

Six des 7 gènes impliqués dans le SBr ont été identifiés par cette approche, les études fonctionnelles de 5 d'entre eux n'expliquent que de très rares cas. Seul le gène *SCN5A* est retrouvé muté dans environ 15 à 21% des cas, mais aucune confirmation n'est venue d'une analyse de liaison. De plus il faut lui ajouter une pénétrance faible et une relation génotype/phénotype tendant à montrer qu'il est insuffisant à lui tout seul pour provoquer un SBr (Projet 1a).

La première description du SBr associait trouble de la conduction et sus décalage du segment ST [Brugada *et Brugada* 1992]. Puis en 1999 notre équipe a montré que le gène *SCN5A* pouvait être à l'origine de troubles de la conduction isolés par une perte de fonction du canal  $Na_v1.5$  [Schott *et al.* 1999]. Enfin les patients atteints par le SBr et possédant une mutation dans le gène *SCN5A* avaient des troubles de la conduction marqués [Article 1; Yokokawa *et al.* 2007]. Les projets 1a, 1b et 1c tendent à prouver que le gène *SCN5A* expliquerait les troubles de la conduction et que le SBr aurait une origine génétique (partiellement) différente. Les travaux menés chez la souris *SCN5A<sup>+/-</sup>* décrivent également des troubles de la conduction sévères mais le modèle atteint ses limites lors des études électrocardiographiques pour le SBr [Royer *et al.* 2005]. Il n'existe pas de modèle animal muté pour le gène *SCN5A* et présentant l'aspect caractéristique électrocardiographique du SBr, ce qui renvoie les études génotype/phénotype vers les formes familiales ou les études de grandes cohortes.

Ce manque de marqueur moléculaire fiable pour ces patients à risque de mort subite suggère 2 hypothèses. Il pourrait s'agir d'un syndrome pour lequel les gènes majeurs n'ont pas encore été découverts mais qui conserverait son modèle génétique monogénique.

On peut également imaginer que le SBr réponde à un modèle génétique plus complexe de type digénique ou oligogénique. En effet la mauvaise corrélation génotype/phénotype entre le gène *SCN5A* et le phénotype SBr laisse supposer l'existence de variants capables d'influencer l'expressivité de la maladie. Ce nouveau modèle génétique pourrait être un modèle digénique comme le suggère la présence d'un locus proche du gène *SCN5A* et de *GPD1L*. Cette proximité physique faciliterait une co-transmission de variants ou une régulation du gène codant le canal sodique cardiaque à distance en cis ou en trans. Une autre hypothèse serait un modèle oligogénique « bi-modal » (à deux distributions : une regroupant un variant rare à effet fort et une autre regroupant les variants fréquents à effet faible). Dans ce dernier modèle il faudra quantifier l'implication de chaque variant et notamment ceux retrouvés dans le gène *SCN5A*. On peut supposer qu'une proportion des variants identifiés dans le gène *SCN5A* serait des variants à effets forts et qu'ils seraient combinés à des polymorphismes contenus dans les gènes déjà identifiés du SBr. A l'inverse une catégorie de variants considérés comme des polymorphismes du gène *SCN5A* seraient les composantes à effet faible d'un modèle oligogénique où le variant à effet fort se trouverait par exemple dans le gène *CACNA1C* ou au sein du locus 3p22.3-p25.3.



## **Projet 2**

**Recherche de variation du nombre de copies dans les gènes impliqués dans le syndrome du QT long: implication clinique**

## II. Projet 2 : Recherche de variation du nombre de copies dans les gènes impliqués dans le syndrome du QT long: implication clinique

### II.1 Article 2 : objectifs

Le SQTL est une cardiopathie à haut risque de mort subite par arythmies ventriculaires. L'apport du diagnostic moléculaire a permis de réduire et de prévenir la survenue de mort subite. Dans notre expérience, le taux de mort subite chez les patients atteints d'un SQTL a été réduit significativement après prescription d'un traitement adapté en fonction du diagnostic moléculaire. Cependant ce dernier ne peut pas être posé chez environ 25% des patients. A cela plusieurs hypothèses, l'existence de phénocopies : il s'agirait de formes acquises, la seconde serait l'existence de variants dans des gènes encore non identifiés, une autre hypothèse met en cause les régions non explorées (régions non codantes : promotrices, 3' UTR, introniques) qui pourraient renfermer les variants morbides. Enfin une fréquence non négligeable de réarrangements génomiques indétectables par les techniques classiques de criblage ou de séquençage pourrait constituer une explication pour ces 25%.

Nous avons voulu évaluer sur une grande série de 93 patients négatifs pour le séquençage des 3 principaux gènes *KCNQ1*, *KCNH2* et *SCN5A* la fréquence de ces réarrangements par la technique de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Cette technique permet de quantifier le nombre de copies d'un fragment d'ADN donné en utilisant des amorces complémentaires de la région cible. Nous avons utilisé un kit commercial interrogeant 20 régions du gène *KCNQ1* (16 exons), 9 du gène *KCNH2* (15 exons) et 3 du gène *SCN5A* (28 exons). Le SQTL engendré par ces gènes sont la conséquence de pertes de fonction des canaux potassiques codés par les gènes *KCNQ1* et *KCNH2* et un gain de fonction du gène *SCN5A*. La conséquence fonctionnelle des réarrangements attendus serait donc des invalidations des canaux potassiques par une délétion ou une duplication en tandem décalant le cadre de lecture, menant à une haploinsuffisance et à une diminution du courant  $I_{Ks}$  ou  $I_{Kr}$ . L'autre possibilité serait une duplication de l'ensemble du gène *SCN5A* afin d'obtenir une ou des nouvelles copies fonctionnelles et entraîner un gain de fonction du courant  $I_{Na}$ .

Des travaux précédents ont montré que des CNVs existaient parmi les gènes du SQTL. Une délétion de 217 gènes a été décrite associée à un retard mental, un intervalle QT allongé chez ce patient a été attribué à la délétion du gène *KCNH2* inclus parmi ces 217 gènes [Bisgaard *et al.* 2006]. Dans la même année, Tamara Koopmann a identifié une duplication en tandem de 3.7Kb invalidant le gène *KCNH2* et entraînant le phénotype du SQTL au sein d'une famille hollandaise [Koopmann *et al.* 2006]. Plus récemment une nouvelle étude sur 26 cas de

SQTL a identifié 3 réarrangements dans les gènes *KCNQ1* et *KCNH2* mais sans en étudier leur ségrégation ni leur taille [Eddy *et al.* 2008].

Mon projet a pour objectifs d'évaluer la fréquence et la taille des CNVs dans les principaux gènes du SQTL grâce à la plus grande série de patients testés jusqu'à présent (n=93) et d'établir leur implication clinique par une étude génotype/phénotype. Ce projet de recherche s'inscrit, dans une démarche de transfert vers le service de diagnostic génétique pour une médecine prédictive.

## Screening for copy number variation in genes associated with the Long QT Syndrome: clinical relevance

Julien Barc\*, MS<sup>1,2,3</sup>; François Briec\*, MD<sup>1,2,3,4</sup>; Sébastien Schmitt\*, MD<sup>5</sup>; Florence Kyndt, PharmD, PhD<sup>1,2,3,5</sup>; Martine Le Cunff, BS<sup>1,2,3</sup>; Estelle Baron, BS<sup>1,2,3</sup>; Claude Vieyres, MD<sup>6</sup>; Frederic Sacher, MD<sup>7</sup>; Richard Redon, PhD<sup>1,2,3</sup>; Cédric Le Caignec, MD, PhD<sup>1,2,3,5</sup>; Hervé Le Marec, MD, PhD<sup>1,2,3,4</sup>; Vincent Probst, MD, PhD<sup>1,2,3,4</sup>; Jean-Jacques Schott, PhD<sup>1,2,3,4</sup>

**Soumis à *Circulation: Cardiovascular Genetics***

*\*these authors contributed equally to this work.*

<sup>1</sup> Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, UMR 915, F-44000 Nantes, France

<sup>2</sup> CNRS ERL3147, F-44000 Nantes, France

<sup>3</sup> Université de Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France

<sup>4</sup> Service de Cardiologie, L'Institut du Thorax Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, F-44000 Nantes, France<sup>4</sup>

<sup>5</sup> Laboratoire de génétique moléculaire, CHU de Nantes, France;

<sup>6</sup> Cabinet de cardiologie, Angoulême, France;

<sup>7</sup> Service de rythmologie, Hôpital cardiologique du Haut Leveque, Bordeaux, France ;

**Short title: Copy number variation in LQTS genes**

**ABSTRACT**

**Background:** Long-QT Syndrome (LQTS) is an inherited cardiac arrhythmia characterized by a prolonged QTc interval associated with sudden cardiac death. Recent studies suggested the involvement of duplications or deletions in the occurrence of LQTS. However, their frequency remains unknown in LQTS patients. The aim of this study was to investigate, in a set of 93 mutation-negative LQTS probands, the frequency of copy number variants (CNV) in LQTS genes and to evaluate their segregation within the families.

**Methods and results:** Point mutations in *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* genes were excluded by dHPLC-DNA sequencing or direct sequencing. We applied Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) to detect CNVs in exons of these three genes. Abnormal exon copy numbers were confirmed by Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragment (QMPSF). Array based Comparative Genomic Hybridization (array CGH) analysis was performed using Agilent Human Genome 244K Microarrays to further map the genomic rearrangements. We identified 3 different deletions in 3 unrelated families: one in *KCNQ1* and two involving *KCNH2*. We showed in the largest family that the deletion involving *KCNH2* is fully penetrant and segregates with the long QT phenotype in 7 affected members.

**Conclusions:** Our study demonstrates that CNV in *KCNQ1* and *KCNH2* explain around 3% of LQTS in patients with no point mutation in these genes. This percentage is likely higher than the frequency of point mutations in *ANKB*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *CACNA1C*, *CAV3*, *SCN4B*, *AKAP9* and *SNTA1* together. Thus, we propose that CNV screening in *KCNQ1* and *KCNH2* should be performed routinely in LQTS patients.

**Keywords:** Long QT syndrome, MLPA, CNV, deletion, sudden death.

**INTRODUCTION**

Long-QT Syndrome (LQTS) is an inherited cardiac arrhythmia characterized by a prolonged QTc interval, which is associated with syncope and sudden death (SD) caused by "torsades de pointes" or polymorphic ventricular tachycardia [Jervell et LANGE-NIELSEN 1957]. It affects between 1 in 5000 and 1 in 2000 individuals [Schwartz et al. 2003; Tester et al. 2005]. Molecular diagnosis is an important tool to guide diagnosis, treatment and prevention strategies in LQTS patients. To date, more than 600 mutations [Fondazione Salvatore Maugeri. 2007] have been identified among 12 different genes: 5 genes encoding ion channel alpha subunits (*KCNQ1* [Wang et al. 1996], *KCNH2* [Curran et al. 1995], *SCN5A* [Wang et al. 1995a], *KCNJ2* [Plaster et al. 2001] and *CACNA1C* [Splawski et al. 2004]) and 7 genes encoding ion channel regulatory proteins (*ANKB* [Mohler et al. 2003], *KCNE1* [Splawski et al. 1997], *KCNE2* [Abbott et al. 1999], *CAV3* [Vatta et al. 2006], *SCN4B* [Medeiros-Domingo et al. 2007], *AKAP9* [Chen et al. 2007] and *SNTA1* [Ueda et al. 2008]). In total molecular diagnosis can resolve up to 70% of cases. More of 90% of those cases are due to mutations in *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* corresponding to LQT1, LQT2 and LQT3 respectively [Napolitano et al. 2005; Kapplinger et al. 2009]. The lack of mutation detection in the remaining cases has been attributed to phenotyping errors, incomplete sensitivity of screening methods (dHPLC and direct sequencing), mutations in non-coding regions or mutations in as yet unknown genes.

Another source of negative molecular screening can be the presence of copy number variants affecting the major genes for LQTS and not detectable using capillary sequencing. Interestingly, Bisgaard et al. described in 2006 a large deletion (217 genes) including *KCNH2* in a patient with mental

retardation and a long QT Syndrome [Bisgaard et al. 2006]. In addition, Koopmann et al. detected a 3.7 kb intragenic *KCNH2* duplication in a Dutch family affected by LQTS [Koopmann et al. 2006]. More recently, Eddy et al. identified two deletions, one in *KCNQ1*, a second in *KCNH2* and a duplication in *KCNH2* [Eddy et al. 2008] in LQTS patients. These different studies suggest that gene duplications or deletions can explain LQTS. However, the precise frequency of copy number variants involving the

main LQTS genes in patients with LQTS remains unknown. In this study, we investigated the frequency of deletions and duplications affecting *KCNH2* and *KCNQ1* in 93 probands with LQTS including one large family, for which no point mutation had been identified.

**METHODS****LQTS patients**

This study was in agreement with the local guidelines for genetic research and has been approved by the local ethical committee. Two experts for rare arrhythmic diseases at the University Hospital of Nantes defined the LQTS phenotype by independent ECG readings. QTc duration was calculated according to Bazett formula. A prolongation of the QTc duration was defined as  $\geq 440$  ms for men (borderline between 430-439 ms) and as  $\geq 460$  ms for females (borderline between 450-459 ms) [Roden 2008a]. Each patient underwent full medical examination to rule out syndromic forms of QT prolongation. Blood samples were collected after written informed consent.

Mutations in coding regions and exon-intron boundaries for the three main LQTS-causing genes - *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* – were excluded by dHPLC-DNA sequencing or direct sequencing.

#### MLPA, QMPSF and qPCR analyses

MLPA was performed using the SALSA P114 MLPA kit and according to the MRC Holland Protocol ([http://www.mrc\\_holland.com](http://www.mrc_holland.com)). SALSA P114 MLPA kit contains 20 probes interrogating *KCNQ1* gene, 9 for *KCNH2* gene and 3 for *SCN5A* gene. Abnormal profiles in MLPA analysis were completed with a locus-specific QMPSF [Casilli *et al.* 2002]. Oligonucleotide complementary sequences to exon 5 and 15 of *KCNH2* or exon 7, intron 7-8 and exon 8 of *KCNQ1* were co-amplified by PCR with an additional fragment, corresponding to exon 14 of *MLH1*, a gene located on chromosome 11 used as a control. The QMPSF conditions and primer sequences are available upon request. QPCR experiments were performed using the LightCycler 480 (Roche Molecular Systems) to validate genes with variable copy number. PCR reactions were prepared using the Power SYBR-Green PCR reagent kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol.

#### Array CGH

Array CGH analysis was performed using the Agilent Human Genome Microarray Kit 244A (Agilent Technologies). Labeling, hybridization, washes and data analysis were performed according to the protocol provided by Agilent (Protocol v4.0, June 2006). Graphical overviews were obtained using the CGH Analytics software (v.3.4) (Agilent Technologies). DNA sequence information refers to the public UCSC database (Human Genome Browser, Mar. 2006 Assembly).

#### Linkage Analysis

Two-point linkage analysis was performed with easy LINKAGE Plus software (version 5.02), by using an autosomal-dominant model of inheritance with complete penetrance and a disease allele frequency of 0.001. The allele frequency was given as 0.001 for the morbid allele.

## RESULTS

Ninety-three patients with LQTS were included in this study, for whom no mutation had been identified by dHPLC-DNA sequencing or direct sequencing for *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A*. The patients (63% women) presented with an average QTc of 556 ms +/- 60 ms and an average age at diagnosis of 35 years +/- 22. Among the 93 probands, 23 had been resuscitated from sudden cardiac death (25%), 58 had presented with a syncope (62%), 30 with an arrhythmia event (32%) and 15 had been provided with an implantable cardioverter defibrillator (ICD) (16%). The T wave patterns for all patients were classified into five categories: normal T wave morphology (n=3, 3%), LQT1 (n=11, 12%), LQT2 (n=47, 51%), LQT3 (n=13, 14%) and nonspecific (n=19, 20%). We screened for CNV involving the *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* genes in these 93 patients, by MLPA. We identified

one deletion in *KCNQ1* and two involving *KCNH2* in three unrelated patients while no CNV was detected in *SCN5A*. We performed a familial investigation from each proband: genotype/phenotype correlation could be achieved in the largest family.

#### Family 1

Patient III.4 was diagnosed for LQTS after the occurrence of several episodes of "torsade de pointe" and ventricular fibrillation successfully resuscitated at age 23. Her ECG showed a prolonged QT interval (QTc=554 ms) and a bifid T wave strongly suggestive of LQT2 syndrome (Figure 1). Because of the aborted cardiac arrest, she was implanted with an ICD. Her clinical examination found no other abnormalities. Familial recruitment led to the identification of 14 relatives through 3 generations (Figure 1A). In addition to patient III.4 six family members had ECG abnormalities strongly suggestive of LQTS (Figure 1B): patient I:2 (QTc= 465 ms), patient II:1 (QTc= 590 ms), patient II:7 (QTc= 615 ms), patient III:1 (QTc= 670 ms), patient III:5 (QTc= 518 ms) and patient III:6 (QTc= 610 ms). All of them were asymptomatic. ECGs performed in the other family members were normal (data not shown).

Using MLPA and QMPSF, a genomic deletion was identified in patient III.4 involving exons 4-14 of *KCNH2* (Figure 2A).

QMPSF was performed using two probes: the first in exon 5 confirmed the deletion and the other in exon 15 demonstrated that the 3' coding region of *KCNH2* was also deleted (data not shown).

High-resolution array CGH analysis refined the size of the genomic rearrangement: the deletion was marked out from centromeric probes A\_16\_P18164054 (intron 3-4) to A\_16\_P01835269 (telomeric) and had a size of 650 Kb. Nineteen other genes are included in this rearrangement (including *ABP1*; Figure 3A).

Interestingly Redon *et al.* identified a CNV in *ABP1* downstream of *KCNH2* gene in individual NA12762 (chr7:149,976,469 -150,101,345) from the HapMap collection [Redon *et al.* 2006]. We checked whether *KCNH2* is encompassed by this CNV, using QMPSF on *KCNH2* exons 5 and 15 and *ABP1* exon 2. We found that the deletion is limited to *ABP1* and does not affect *KCNH2* (data not shown).

This CNV was present in the 6 other affected family members (I:2, II:1, II:7, III:1, III:5 and III:6). Linkage analysis was performed to evaluate segregation between the deletion and the LQT phenotype. Under the dominant model of inheritance, we obtained a maximum logarithm of the odds (LOD) score of 3.13 ( $\theta=0\%$ ).

#### Family 2

The proband is a woman diagnosed at age 28 for LQTS after the occurrence of syncope triggered by acoustic stimulus (phone ringing). Her ECG showed a prolonged QT interval (QTc= 563 ms) and a bifid T wave. ECGs were performed in the first degree relatives: the mother, the brother and the two sons

(Figure 4A). Prolongation of the QT interval was found only in the mother (I:2; QTc= 467 ms).

MLPA analysis showed a heterozygous deletion of *KCNH2* (Figure 2B). QMPSF confirmed the deletion of *KCNH2* (probes in exons 5 and 15) and showed the deletion of *ABP1* (probe in exon 2) (data not shown). Array CGH analysis revealed that the CNV is 145 Kb in length (probe A\_16\_P18165049 to probe A\_16\_P1835307) and includes entire copies of the *KCNH2* and *ABP1* genes (Figure 3B).

The same CNV was also found in two relatives: her affected mother (I:2) and her healthy brother (II:1).

### Family 3

Patient II.1 was a girl diagnosed at age 14 for the LQTS after the occurrence of an episode of syncope resulting from a stress with a temporary loss of hearing and tachycardia. Her ECG showed a prolonged QT interval (QTc= 490 ms) as well as a broad base T wave morphology on derivations V4 to V6. Her father presented with a T wave pattern suggestive of LQT1 and a borderline QTc duration of 438 ms (Figure 4B). Her mother and sister have normal T wave morphology and QT interval duration (data not shown).

We identified by MLPA one CNV restricted to *KCNQ1* exons 7 and 8 in proband II:1 (Figure 2C). The deletion was confirmed by 2 independent techniques: QMPSF with probes in exons 7 and 8 ; qPCR with primers in exons 7 and 8 as well as intron 7-8 (data not shown). The CNV was inherited from her father (I:1) while her sister (II:2) did not carry the deletion (Figure 4B).

### DISCUSSION

In this study, we evaluated the frequency of copy number variants involving *KCNQ1*, *KCNH2* and *SCN5A* in patients affected by a typical form of LQTS, for whom molecular analysis failed to identify point mutations in those major LQTS genes. We detected three CNVs in three unrelated patients: one deletion in *KCNQ1* and two deletions involving *KCNH2*.

The first deletion includes the exons 4 to 15 of *KCNH2*. This deletion could lead to a truncated protein (123 instead of 1159 amino acids). More probably, its effect may be similar to that of a premature termination codon mutation with subsequent nonsense-mediated decay (NMD) degradation of the *KCNH2* mRNA [Hentze *et al.* 1999]. Although this deletion includes 19 other genes, the patient presented with no abnormal phenotype other than prolonged QT duration.

The second deletion includes the whole *KCNH2* gene, leading probably to haploinsufficiency and decreasing levels of the potassium current  $I_{Kr}$  in ventricular-cardiomyocytes.

The third deletion spans exons 7 to 8 of *KCNQ1*. Assuming that the deletion includes full copies of both exons, it leads to the lack of the second part of the p-loop (including GYGD motif), the segment 6 as well as 23 amino acids from the C-terminal part of the KvLQT1 channel subunit. Interestingly studies described splicing variants, involving

deletion of either exon 7, exon 8 or both, leading to decreased  $I_{Ks}$  current [Lande *et al.* 2001; Tsuji *et al.* 2007].

We found perfect co-segregation between long QT phenotype and CNV inheritance in the Family 1 (odds (LOD) score > 3), demonstrating that the *KCNH2* deletion is responsible for this familial form of LQTS. One non penetrant patient (II:1) was identified in family 2, in line with previous report [Priori *et al.* 1999]. In Family 3, the *KCNQ1* deletion was found in two members presenting a T-wave pattern suggestive of LQT1. One of them presents with a prolonged QTc duration, the other with a borderline value (figure 4B).

Note that as for point mutations, the T wave morphologies observed in probands' ECGs are predictive for which LQTS gene is altered by CNV and thus stay a relevant indicator of the morbid gene.

In summary, our study demonstrates that copy number variants involving major LQTS genes explain around 3% of additional LQTS cases (3 out of 93 patients) after failure of the classical molecular diagnostic screen (dHPLC and direct sequencing). This frequency corresponds to the percentage of copy number variants *versus* point mutations already described in the literature for a morbid gene like *BRCA1* [Engert *et al.* 2008]. In our and others' experience, the frequency of CNV detection in *KCNH2* and *KCNQ1* is higher than the frequency of point mutations in *ANKB*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *CACNA1C*, *CAV3*, *SCN4B*, *AKAP9* and *SNTA1* together [Napolitano *et al.* 2005; Tester *et al.* 2005]. Thus, we conclude that routine CNV detection in the two major LQTS genes should be performed systematically for patients diagnosed with long QT syndrome but negative point mutation screening.

### CONCLUSION

Our study demonstrated that genomic rearrangement in *KCNQ1* and *KCNH2* genes explains 3% of the LQTS in patients with a negative screening for point mutation in the genes involved in the LQTS. We consider that screening for genomic rearrangement should be used in the routine work up in the LQTS in case of the absence of punctual mutation in the LQTS genes.

### Acknowledgments

The authors are greatly indebted to the patients and their families. We thank Christine Fruchet, Marion Chaventré, Christine Poulain, Patricia Bouillet and Maïder Bessouet for assistance in the family screening. We thank Anne Ponchoux, Jerome Buscaïl, Thierry Marsaud, Olivier Pichon and Simon Lecointe for technical assistance. We also thank Fabrice Airaud for graphical representation matrix of MLPA data. We thank Dr Stéphane Bézieau (Service de génétique médicale, Nantes) for his excellent work. We are grateful to the Biogenouest platforms, in particular to Françoise Gros (plateforme de séquençage et de Génotypage), Catherine Chevalier and Remi Houlgatte

(plateforme transcriptome et puce à ADN) for their technical support.

#### Funding sources

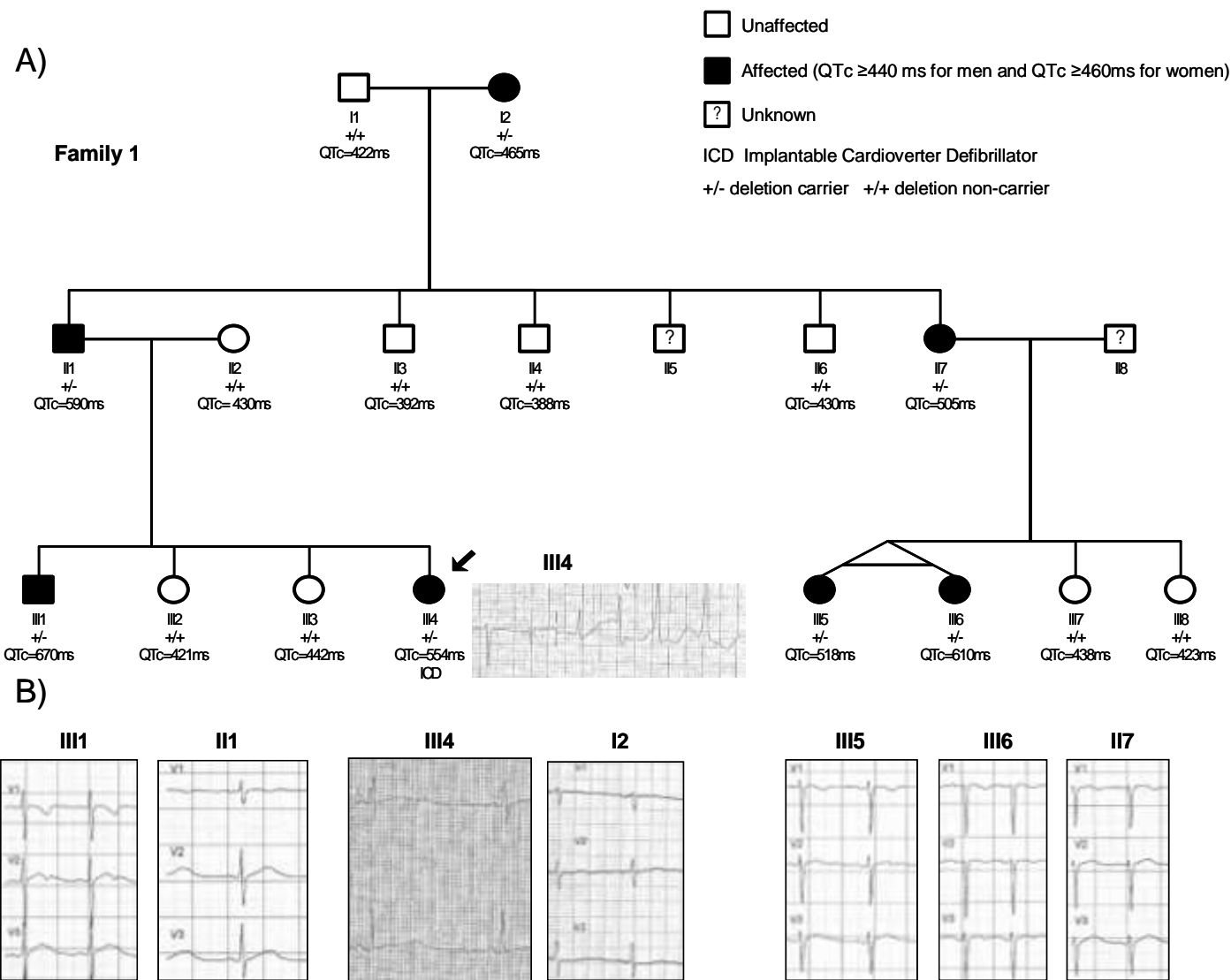
This work was supported by P.H.R.C. 2001 R20/03 and 2004 R20/07 from CHU de Nantes, France Société française de cardiologie; the fondation Leducq Trans-Atlantic Network of Excellence grant

#### REFERENCES

- Jervell A, LANGE-NIELSEN F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J.* 1957;54:59-68.
- Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2005;2:507-517.
- Schwartz PJ, Priori SG, Napolitano C. How really rare are rare diseases?: the intriguing case of independent compound mutations in the long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2003;14:1120-1121.
- Fondazione Salvatore Maugeri. Gene connection for the heart. Available at <http://www.fsm.it/cardmoc/> ( Last modified: June 20th, 2007). 2007.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Towbin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet.* 1996;12:17-23.
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell.* 1995;80:795-803.
- Wang Q, Shen J, Li Z, Timothy K, Vincent GM, Priori SG, Schwartz PJ, Keating MT. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1603-1607.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL, Jr., Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell.* 2001;105:511-519.
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.* 2004;119:19-31.
- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, (05 CVD 01, Preventing Sudden death) and Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (PhD grant to J. Barc).
- Haugroge K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature.* 2003;421:634-639.
- Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet.* 1997;17:338-340.
- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell.* 1999;97:175-187.
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation.* 2006;114:2104-2112.
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation.* 2007;116:134-142.
- Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:20990-20995.
- Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ, Makielski JC. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:9355-9360.
- Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, Carr JL, Harris-Kerr C, Pollevick GD, Wilde AA, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm.* 2009;6:1297-1303.
- Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, Bottelli G, Cerrone M, Leonardi S. Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA.* 2005;294:2975-2980.
- Bisgaard AM, Rackauskaite G, Thelle T, Kirchoff M, Bryndorf T. Twins with mental retardation and an interstitial deletion 7q34q36.2 leading to the diagnosis of long QT

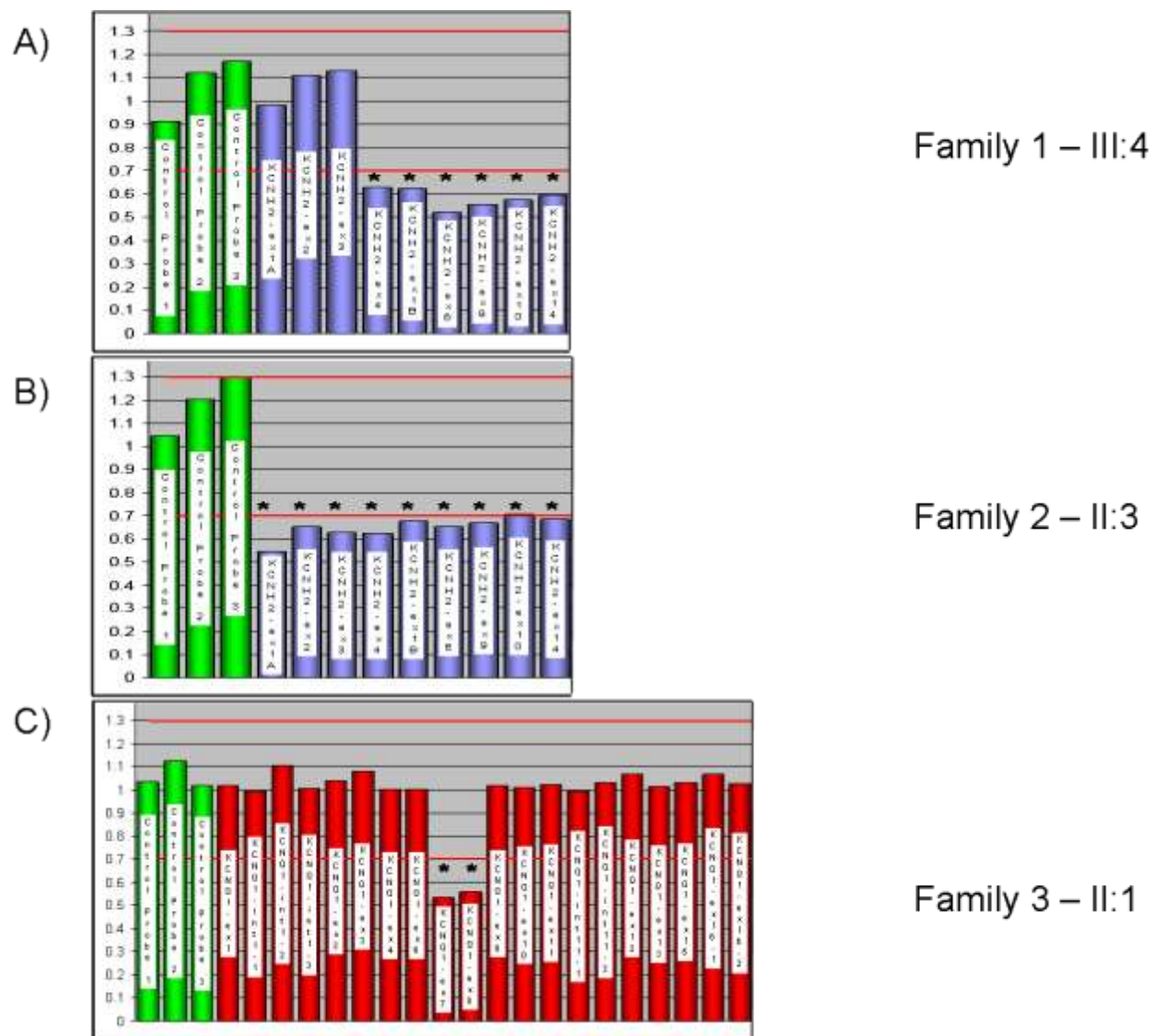


- syndrome. *Am J Med Genet A*. 2006;140:644-648.
20. Koopmann TT, Alders M, Jongbloed RJ, Guerrero S, Mannens MM, Wilde AA, Bezzina CR. Long QT syndrome caused by a large duplication in the *KCNH2* (*HERG*) gene undetectable by current polymerase chain reaction-based exon-scanning methodologies. *Heart Rhythm*. 2006;3:52-55.
  21. Eddy CA, MacCormick JM, Chung SK, Crawford JR, Love DR, Rees MI, Skinner JR, Shelling AN. Identification of large gene deletions and duplications in *KCNQ1* and *KCNH2* in patients with long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2008;5:1275-1281.
  22. Roden DM. Clinical practice. Long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2008;358:169-176.
  23. Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, Tosi M. Rapid detection of novel *BRCA1* rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat*. 2002;20:218-226.
  24. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shaperro MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444:444-454.
  25. Hentze MW, Kulozik AE. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*. 1999;96:307-310.
  26. Lande G, Kyndt F, Baro I, Chabannes D, Boisseau P, Pony JC, Escande D, Le Marec H. Dynamic analysis of the QT interval in long QT1 syndrome patients with a normal phenotype. *Eur Heart J*. 2001;22:410-422.
  27. Tsuji K, Akao M, Ishii TM, Ohno S, Makiyama T, Takenaka K, Doi T, Haruna Y, Yoshida H, Nakashima T, Kita T, Horie M. Mechanistic basis for the pathogenesis of long QT syndrome associated with a common splicing mutation in *KCNQ1* gene. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:662-669.
  28. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation*. 1999;99:529-533.
  29. Engert S, Wappenschmidt B, Betz B, Kast K, Kutsche M, Hellebrand H, Goecke TO, Kiechle M, Niederacher D, Schmutzler RK, Meindl A. MLPA screening in the *BRCA1* gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. *Hum Mutat*. 2008;29:948-958.

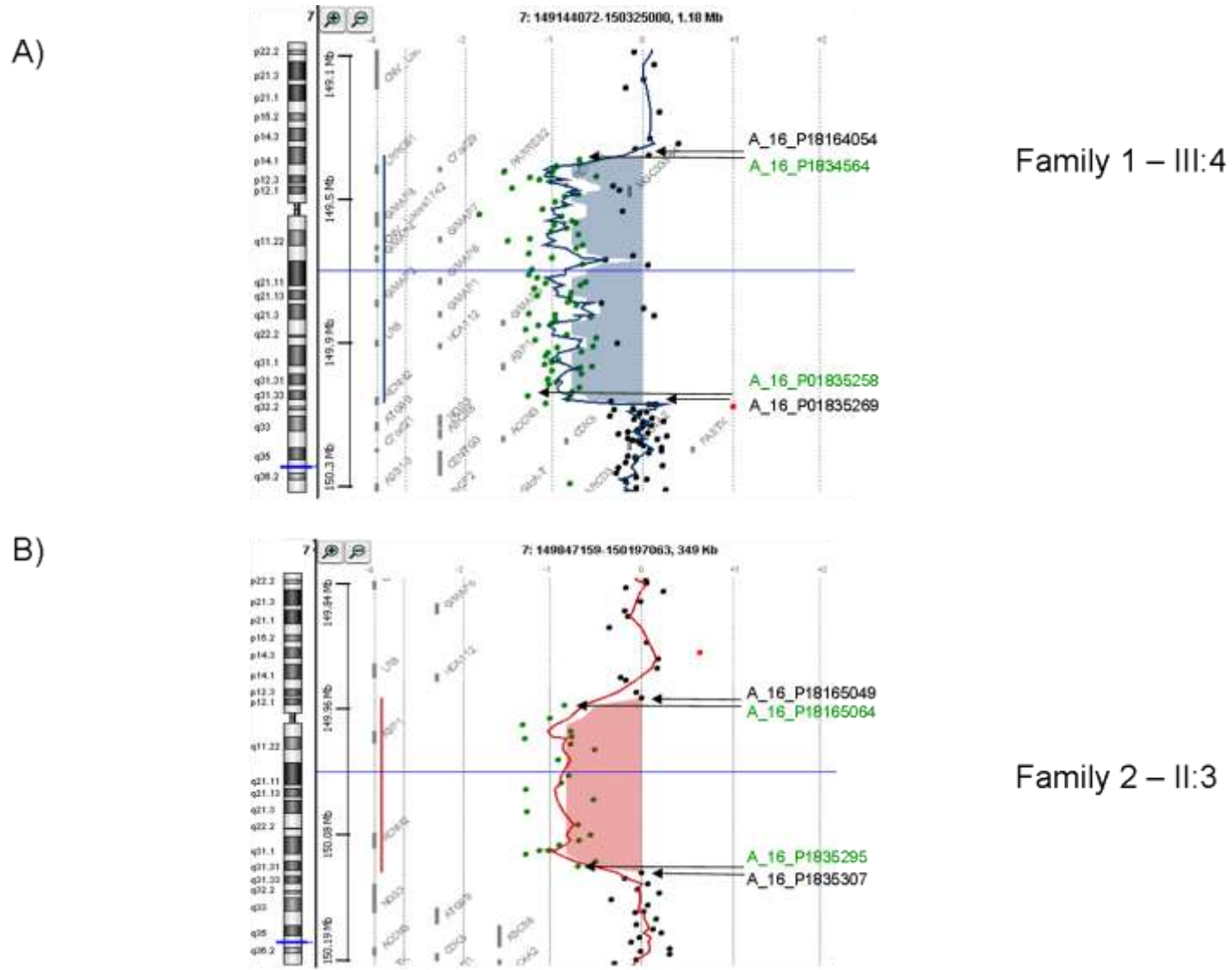


**Figure 1 : family 1: clinical findings**

**A:** The disease phenotype is transmitted as an autosomal-dominant trait. Empty symbols depict unaffected members, black symbols long QT phenotypes, grey symbols undetermined members and “?” symbols unknown phenotypes. Circles indicate females, and squares, males. The proband is indicated by an arrow. Genotypes are marked with +/- for heterozygous mutation and +/+ for wild type. QTc values (Bazett formula) are indicated below each individual. ICD indicates implantable cardioverter-defibrillator. **B:** ECG are presented for affected members with ECG of arrhythmia when documented.

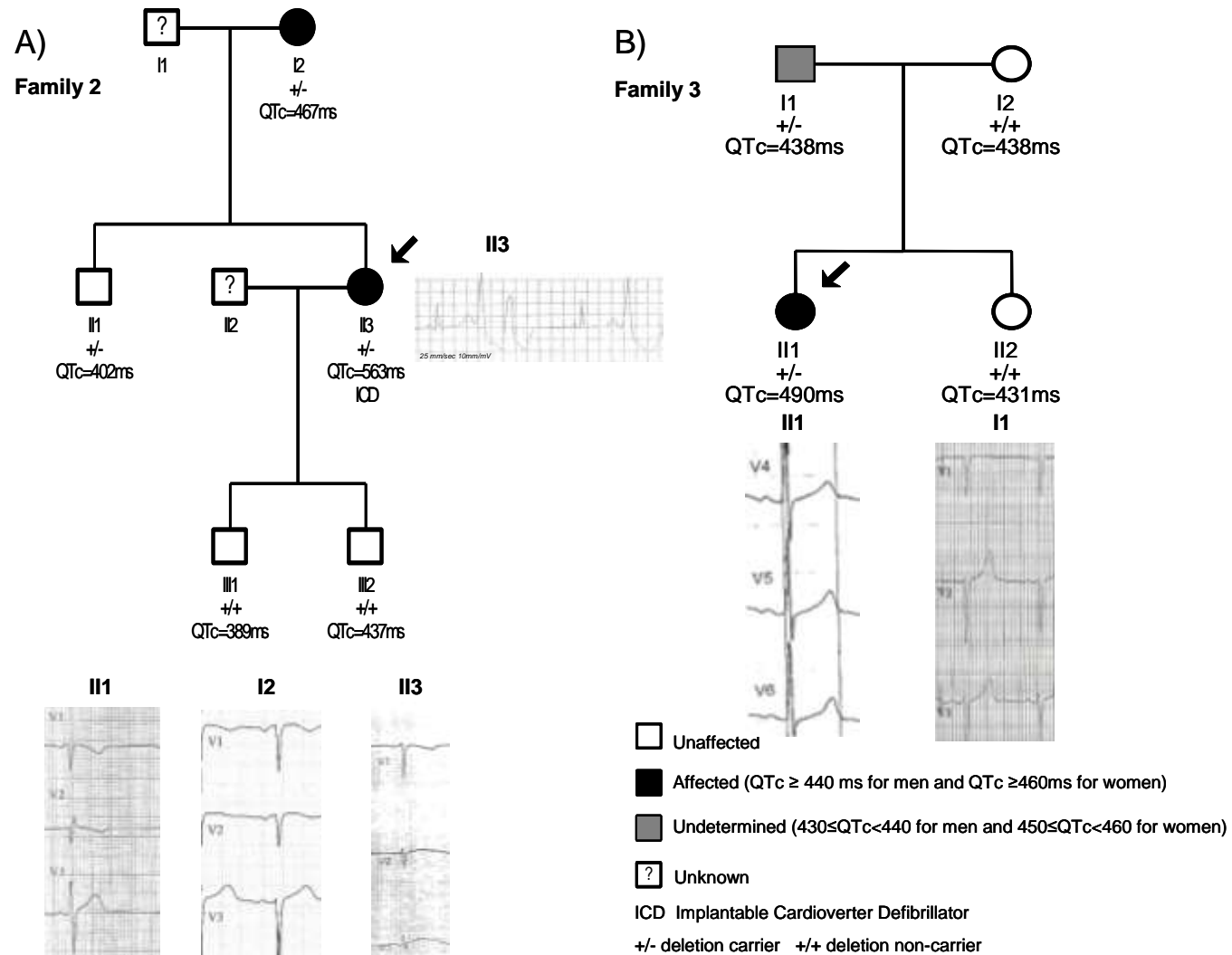


**Figure 2 : detection of CNVs involving the *KCNH2* and *KCNQ1* genes in 3 long QT patients by Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification .** Each profile corresponds to relative peak ratios for *KCNH2*, *KCNQ1*, and control probes. The asterisks mark the detection of exonic deletions. A: *KCNH2/ex4-14* are deleted in Family 1; B: *KCNH2/ex1-14* are deleted in family 2; C: *KCNQ1/ex7-8* are deleted in Family 3. Y axis represents relative ratio of copy number



**Figure 3 : array-based CGH allows better delineation of deletion breakpoints.**

**A:** The proband from Family 1 carries a 650Kb-long deletion including *KCNH2* and 19 others genes. **B:** The proband in Family 3 carries a 145Kb-long deletion including *KCNH2* and *APB1*. Black arrows indicate the clones flanking the deletion breakpoints.



**Figure 4 : families 2 (A) and 3 (B): clinical findings.**

The disease phenotype is transmitted as an autosomal-dominant trait. Empty symbols depict unaffected members, blacks symbols long QT phenotypes, grey symbols undetermined members and “?” symbols unknown phenotypes. Circles indicate females, and squares, males. The probands are indicated by arrows. Genotypes are marked with +/- for heterozygous mutation and +/+ for wild type. QTc values (Bazett formula) are indicated below each individual. ICD indicates implantable cardioverter-defibrillator. ECG are presented for affected members with ECG of arrhythmia when documented.

## II.2 Article 2 : principaux résultats et discussion

Parmi 93 propositus atteints du SQTl nous avons identifié 3 CNVs dans 3 familles différentes. Deux délétions ont été mises en évidence dans le gène *KCNH2* chez 2 propositus présentant un phénotype du SQTl de type 2. La 1<sup>ère</sup> s'étend sur 145Kb affectant l'ensemble du gène *KCNH2* ainsi que le gène *ABP1*. La seconde est bornée en 5' par l'exon 4 du gène *KCNH2*, inclue la fin de ce gène, *ABP1* et les 18 gènes suivants, s'étendant ainsi sur 651Kb. Cette dernière a été retrouvée chez 6 individus apparentés ayant un QTc > 460ms. L'haplo-insuffisance générée par ces réarrangements est vraisemblablement responsable de ce SQTl. La 3<sup>ème</sup> délétion affecte les exons 7 et 8 et l'intron les séparant du gène *KCNQ1*.

Cette étude regroupe le plus grand nombre de patients investigués pour des réarrangements dans les principaux gènes du QTL. Pour la première fois, nous avons pu montrer la ségrégation d'une délétion au sein d'une grande famille atteint du SQTl. De plus ce travail démontre que la morphologie de l'onde T est également un bon indicateur du gène impliqué dans le SQTl dans le cas de réarrangements.

Avec une fréquence d'environ 3.2% dans une population de patients SQTl négatifs pour les principaux gènes, la détection de CNVs est l'explication moléculaire la plus fréquente après les mutations ponctuelles dans les gènes *KCNQ1*, *KCNH2* et *SCN5A*. Compte tenu de la fréquence de ces réarrangements cela constitue une approche incontournable et complémentaire au criblage des régions codantes. Cette méthode est désormais appliquée à tous les patients au laboratoire de diagnostic génétique du CHU de Nantes. Une étude portant sur un plus grand nombre de patients permettra d'affiner la fréquence de ces réarrangements génomiques. Depuis ce travail, 2 nouveaux CNVs dans le gène *KCNQ1* -une délétion et une duplication- ont été détectées par MLPA et les manipulations de confirmation sont en cours. La confirmation de ces réarrangements reste à effectuer par d'autres techniques indépendantes. Aucun réarrangement n'a été détecté dans le gène *SCN5A*. Ceci peut s'expliquer par la plus faible probabilité de survenue d'une duplication entière du gène *SCN5A* qu'une délétion du gène ou d'une partie d'un gène codant un canal potassique.

Devant cette fréquence de réarrangements, une étude pangénomique pour la détection de CNVs (utilisation de puces CGH) chez les individus encore non diagnostiqués moléculairement pourrait être envisagée afin de mettre en évidence de nouvelles délétions/duplications dans de nouveaux gènes candidats du SQTl. Ces nouvelles régions codantes seraient la cible d'un criblage classique afin d'évaluer la fréquence des mutations ponctuelles et donc la prévalence de ce gène dans le SQTl.

Nous participons actuellement à un travail basé sur le même schéma, l'approche pangénomique est ici l'étude d'association [Pfeufer *et al.* 2009; Newton-Cheh *et al.* 2009] (cf.

Introduction III.2.3) et les gènes bordants ou contenant les SNPs corrélés à un allongement de l'intervalle QT sont en cours de séquençage.

L'accessibilité aux nouvelles technologies de séquençage très haut débit permettrait de séquencer l'ensemble des exons du génome d'une série de patients négatifs en séquençage et en MLPA pour les principaux gènes. Ces individus seraient sélectionnés s'ils appartiennent à une famille atteinte du SQTAL afin de s'assurer du caractère héréditaire de leur allongement de l'intervalle QT et de pouvoir valider le ou les variants par une étude génotype/phénotype. On pourrait alors isoler de nouveaux gènes et évaluer par la suite, leur prévalence sur une plus grande cohorte de patients.

Les bases moléculaires décrites jusqu'à présent suffisent à expliquer le phénotype du SQTAL, on parle de variants à effet fort et de maladie génétique monogénique. Cependant l'expressivité variable de ces anomalies génétiques au sein d'une même famille suggère que la durée de l'intervalle QT soit modulée par d'autres paramètres. Certains d'entre eux trouveraient une origine génétique et participeraient à un modèle oligogénique « bi-modal ». Les deux études d'association citées précédemment proposent des variants fréquents qui interviendraient, pour certains, à hauteur d'environ 1% dans la durée de l'intervalle QT. Dans le cadre du réseau transatlantique Leducq « *Alliance Against Sudden Cardiac Death* » dont fait partie l'institut du thorax, un projet, lancé en 2005 est actuellement en cours d'analyse et a pour objectif d'identifier les gènes/variants modificateurs pour le SQTAL de type 2. L'étude inclut 642 patients porteurs d'une mutation dans le gène *KCNH2* présentant un aspect électrocardiographique normal ou LQT2. Ces patients ont été génotypés pour 1536 TagSNP répartis dans 19 gènes codants principalement des canaux ioniques ou des protéines régulatrices de ces canaux (« *GoldenGate Genotyping Assay* », Illumina). On espère ainsi identifier des SNPs responsables de la variation de phénotype chez les patients mutés pour le gène *KCNH2*. Une part des 25% des patients non diagnostiqués moléculairement pourrait voir l'explication de leur allongement de la durée du QT dans une combinaison de variants où tous auraient un effet faible (modèle oligogénique uni-modal).

Il faut noter également qu'une part de ces patients trouvera leurs diagnostics moléculaires dans les régions introniques et régulatrices non séquencées. En effet deux publications décrivent un mécanisme d'épissage anormal causé par des variants en position -28 ou +6 d'exon [Zhang *et al.* 2004; Crotti *et al.* 2009]. Ces variants sont cependant identifiés grâce à leur proximité des régions codantes et sont découverts ainsi fortuitement. On peut néanmoins envisager qu'il existe une part non négligeable de variants morbides situés dans les régions non criblées des gènes déjà identifiés. L'exploration de ces régions verra très probablement le jour avec l'accès, à des coûts réduits, aux techniques de séquençage à très haut débit. Les nouveaux gènes découverts récemment suggèrent qu'ils ne sont responsables que de cas sporadiques.

## **Projet 3**

### **Génétique du syndrome du QT court : nouveau mécanisme**



### III. Projet 3 : la génétique du syndrome du QT court : nouveau mécanisme

---

#### III.1 Objectifs

Les travaux menés par Charles Antzelevitch associent des mutations dans les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$  et le phénotype mixte de SBr et SQTC [Antzelevitch *et al.* 2007]. Plus récemment cette même équipe a publié une mutation dans cette sous-unité  $\beta$  responsable uniquement d'un phénotype de SBr [Cordeiro *et al.* 2009]. À l'image des mutations dans le gène *SCN5A* responsable isolément du SQT de type 3 et de trouble de la conduction mais aussi de syndromes chevauchants regroupant ces pathologies, des mutations des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$  pourrait être responsable d'un SQTC isolé. L'objectif de ce travail est d'évaluer la prévalence des gènes *CACNA1C* et *CACNB2* codant respectivement les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du canal  $Ca_v1.2$  chez 15 patients atteints du SQTC sans SBr (QTc < 360 ms). Une série de 15 propositus a été constituée avec la collaboration du CHU de Tours.

Indépendamment de notre travail, l'équipe de recherche dirigée par Jean-Yves Le Guennec (INSERM U921 : nutrition, croissance et cancer, Tours) étudie l'effet de la carnitine sur les canaux ioniques impliqués dans l'activité électrique cardiaque. Les acides gras libres sont la source majeure d'énergie dans le cœur, le foie et le muscle squelettique. La carnitine est essentielle pour le transport et le métabolisme des acides gras à longues chaînes au sein des mitochondries. Le transporteur de la carnitine OCTN2 est constitué de 12 domaines transmembranaires et permet l'entrée de carnitine dans la cellule (Tamai *et al.*, 1998). La littérature montre qu'une déficience en transporteur de la carnitine OCTN2 conduit à une réduction du taux plasmatique de carnitine et d'acylcarnitine causée par un défaut de réabsorption rénale [Tein 2003]. Elle est corrélée le plus souvent à une cardiomyopathie et/ou à la survenue de fibrillation ventriculaire et à la mort subite [Rahbeeni *et al.* 2002; Tein 2003; Meleggh *et al.* 2004; Amat di San *et al.* 2008]. Ces cas de déficience en carnitine sont la conséquence de mutations des deux allèles du gène *SLC22A5* codant le transporteur OCTN2 et répondent donc à un modèle de transmission récessif.

L'équipe de Tours a observé rétrospectivement qu'une patiente présentant un défaut plasmatique en carnitine et mutée pour le transporteur OCTN2 avait un aspect ECG compatible avec un SQTC. Suite à cette observation, l'hypothèse de l'implication de la carnitine dans la durée de l'intervalle QT a été émise. Afin de tester cette hypothèse le dosage de la concentration plasmatique en carnitine des 15 patients atteints du SQTC a été réalisé.

### III.2 Confrontation des résultats

Le séquençage des gènes codant les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$  a été effectué et le dosage plasmatique de la carnitine est en cours chez les 15 patients. A ce jour, un variant dans le gène *CACNA1C* et une réduction du taux plasmatique de carnitine causée par des mutations du transporteur OCTN2 ont été mise en évidence. Ces anomalies ont été retrouvées chez le même patient préalablement exclu pour des mutations ponctuelles dans les gènes *KCNJ2*, *KCNQ1* et *KCNH2*.

### III.3 Description clinique de la famille G

Un enfant de 22 mois a été hospitalisé pour une syncope. La réalisation d'un holter a révélé des durées de QTc se raccourcissant jusqu'à 270 ms et une moyenne à 340 ms. Quelques mois plus tard, son ECG montrait un QTc un peu plus allongé à 350 ms mais avec une onde T triangulaire caractéristique (Figure 34, individu III.1). Le recrutement de la famille (G), réalisé au CHU de Tours, a permis de diagnostiquer un intervalle QT raccourci chez la mère II2 (QTc = 359 ms) qui est de plus symptomatique (fibrillation ventriculaire) tandis que les grands parents (I.1 et I.2) présentent un intervalle QT normal et aucun antécédent rythmique (Figure 34). Un test à l'ajmaline servant à démasquer un SBr réalisé chez les individus I.2 et II.2 s'est révélé négatif et tous les membres de la famille présentent une échocardiographie normale.

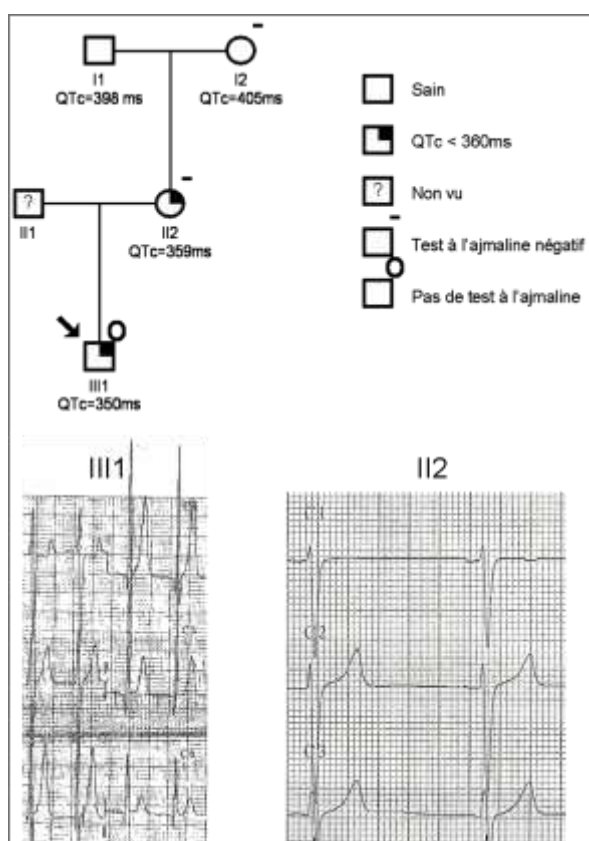


Figure 34 – Arbre généalogique de la famille G (haut) et électrocardiogrammes du propositus (III1) et de sa mère (II2) (bas)

Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Le propositus est indiqué par une flèche. La durée de l'intervalle QTc est indiquée sous chaque individu. ECGs des dérivations précordiales V1 à V3 montrant un aspect compatible avec un SQTC.

### III.4 Nouvelles bases moléculaires pour le SQTC

#### III.4.1 Mutations dans le gène *SLC22A5* codant le transporteur de la carnitine OCTN2

Deux variants dans le gène *SLC22A5* ont été identifiés chez le propositus III.1. Ce gène code un transporteur de la carnitine OCTN2 [Wu *et al.* 1998]. Chacun des parents (II.1 et II.2) a transmis un variant de du gène *SLC22A5* respectant ainsi le modèle récessif décrit. De façon surprenante la mère (II.2) du propositus a, elle aussi, hérité de deux allèles mutés de ces deux parents (I.1 et I.2) hétérozygotes (Figure 35). Le propositus ainsi que sa mère présentent un intervalle QT raccourci associé à des troubles du rythme mais ils ne développent pas de cardiomyopathie. Une supplémentation orale de carnitine permet de normaliser la durée de l'intervalle QT et d'éviter la survenue de nouveaux troubles du rythme.

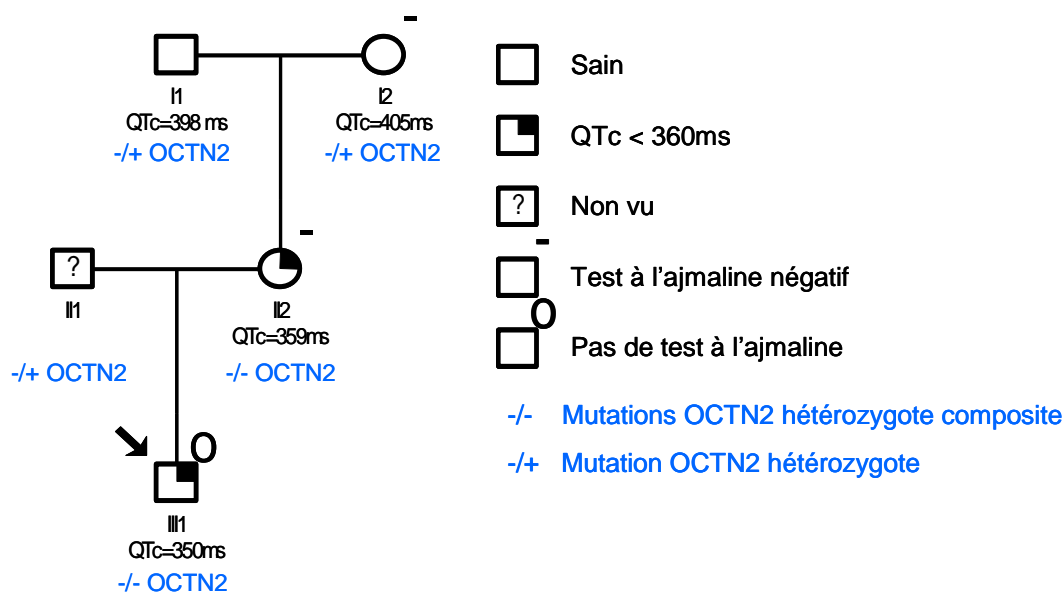


Figure 35 – Arbre généalogique montrant le statut phénotypique des individus de la famille G et la ségrégation des mutations du gène *SLC22A5* codant le transporteur OCTN2

Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Le propositus est indiqué par une flèche

#### III.4.2 Variants dans le gène *CACNA1C* codant le canal calcique voltage dépendant $Ca_v1.2$

En parallèle de ce travail réalisé à Tours, j'ai réalisé le séquençage des deux gènes *CACNA1C* et *CACNB2* codant respectivement la sous unité  $\alpha$  et  $\beta$  du canal calcique  $Ca_v1.2$ . Chez le propositus de la famille G, une substitution (c.667G>C) a été trouvée dans le gène *CACNA1C* conduisant au niveau protéique à la substitution d'une alanine en position 223 par une proline (NP\_000710) (Figure 36). Ce résidu est situé sur la boucle extracellulaire S3-S4 du

domaine I de la sous unité  $\alpha 1c$  (Figure 37A). Ce variant est absent chez 312 sujets contrôles et l'acide aminé affecté : l'alanine en position 223 est très conservé à travers les espèces (Figure 37B).

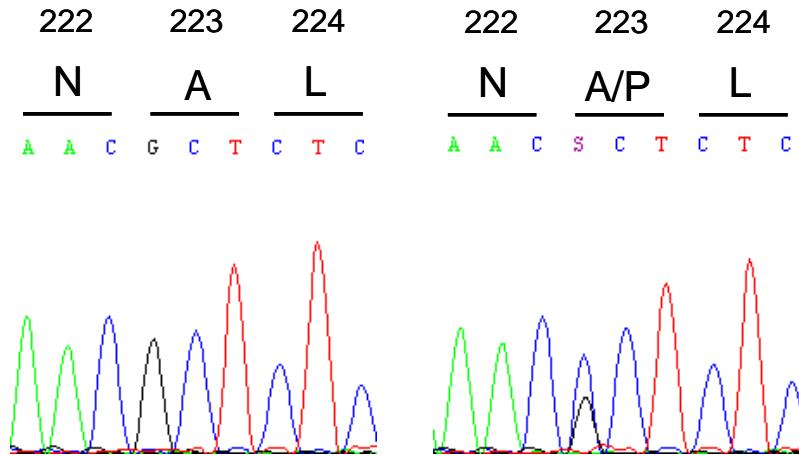


Figure 36 – Electrophorégramme de la séquence d'un individu contrôle (gauche) et du propositus de la famille G muté pour le gène *CACNA1C* : *p.A223P* (droite)  
Substitution *c.667G >C* conduisant à la mutation faux-sens *p.A223P*

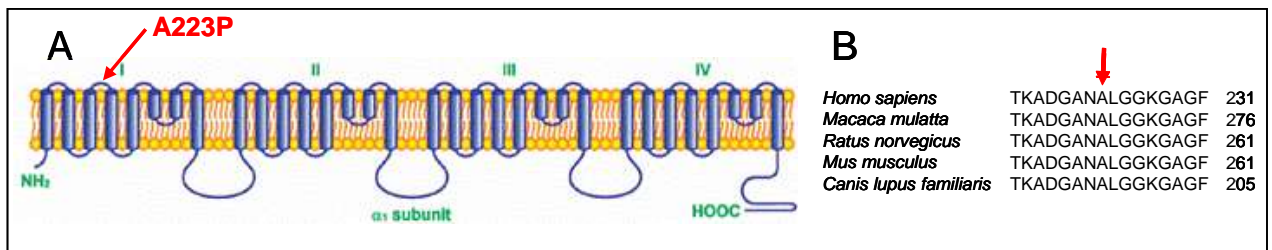
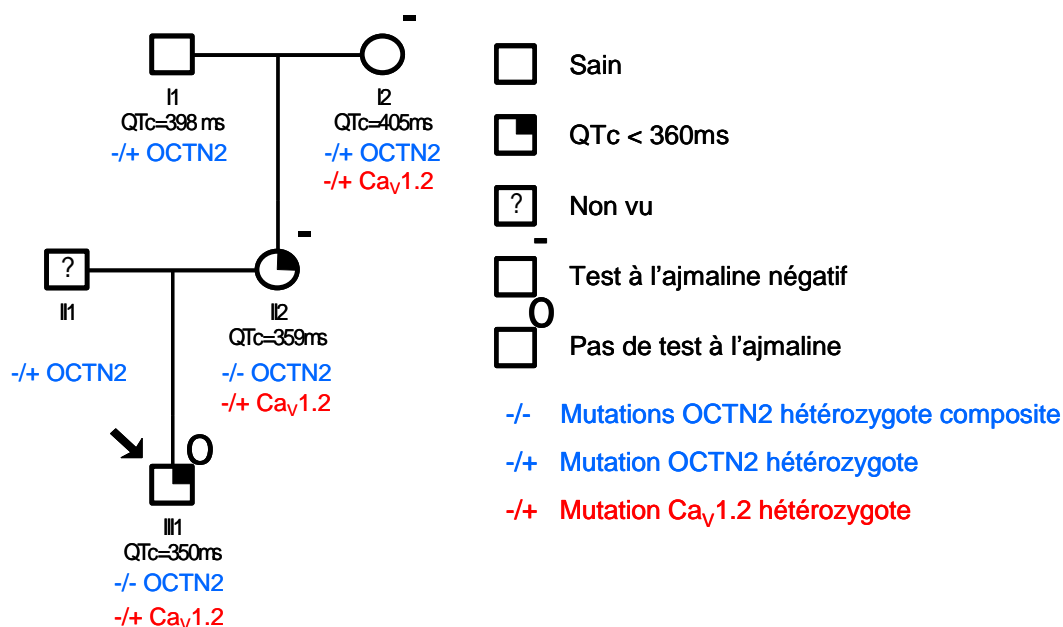


Figure 37 – A Représentation schématique du canal calcique  $Ca_v1.2$  et du variant faux-sens *p.A223P*. B Conservation de l'acide aminé alanine (A) en position 223 du gène *CACNA1C* (NM\_000719) au travers des espèces de mammifères  
Modifié d'après [Yang et Berggren 2005]

La mère (II.2) et la grand-mère (I.2) du propositus possèdent également le variant  $Ca_v1.2$ -*p.A223P* (Figure 38).



**Figure 38 – Arbre généalogique montrant le statut phénotypique des individus de la famille G, la ségrégation des mutations du gène *SLC22A5* codant le transporteur OCTN2 et du variant Ca<sub>v</sub>1.2 p.A223P**

Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Le propositus est indiqué par une flèche

Des études fonctionnelles sont en cours à Tours et à Nantes afin de comprendre dans un premier temps l'effet de chaque variant. L'équipe de Tours évalue l'effet de différentes doses d'acylcarnitine (C16) sur les canaux ioniques impliqués dans le potentiel d'action cardiaque. Ces travaux visent à comprendre l'effet fonctionnel des mutations dans le transporteur OCTN2 et la diminution plasmatique de carnitine et d'acylcarnitine sur la durée de l'intervalle QT. Parallèlement, l'équipe d'électrophysiologie de Nantes a débuté l'étude fonctionnelle du variant Ca<sub>v</sub>1.2 p.A223P (cf. matériel et méthode : annexe 3-III.2, III.3, III.4 et III.5).

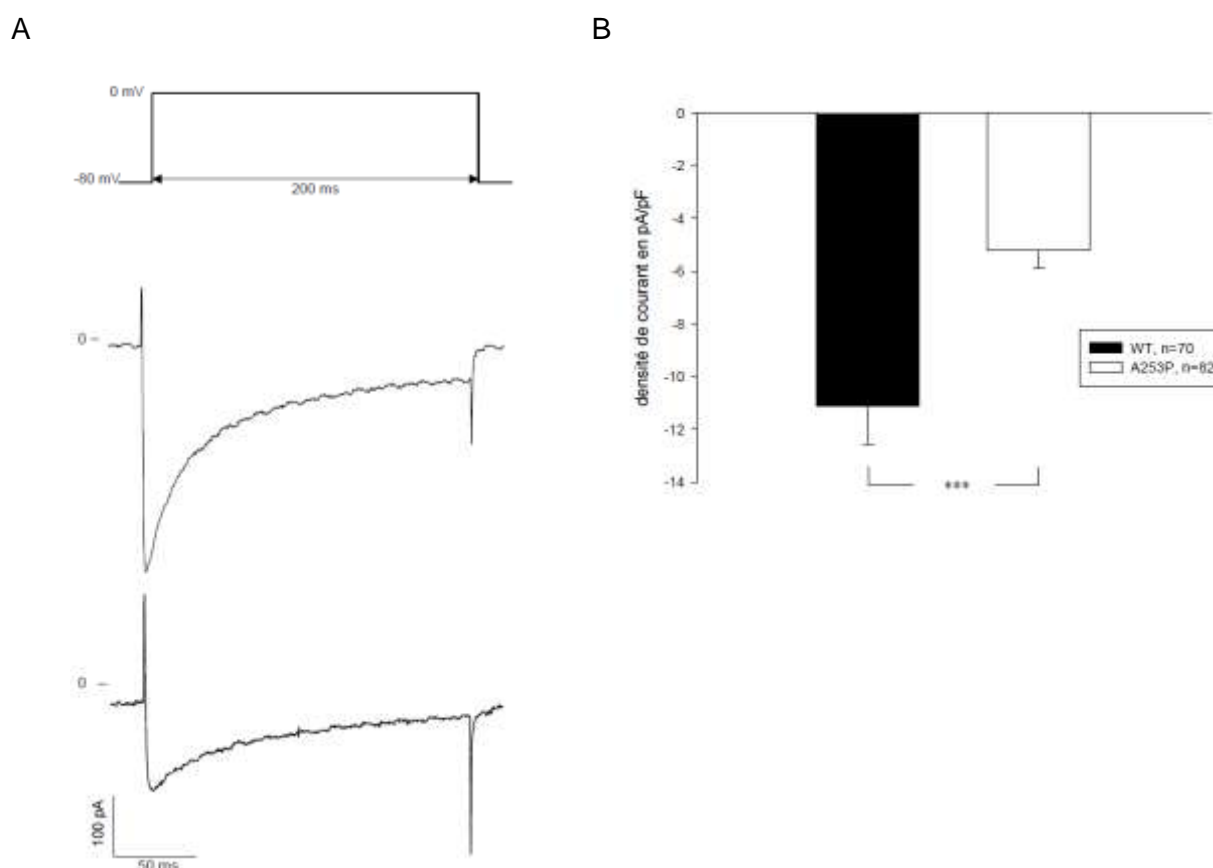
### III.4.3 Etude fonctionnelle du variant Ca<sub>v</sub>1.2 p.A223P en système d'expression hétérologue de mammifère (HEK tsA-201)

J'ai réalisé la mutagenèse dirigée à partir du plasmide codant le canal calcique Ca<sub>v</sub>1.2 du rat. Le variant p.A223P retrouvé chez l'homme est équivalent au variant p.A253P chez le rat (Figure 37B).

#### III.4.3.1 Effet du variant A253P sur le courant I<sub>Ca,L</sub>

Les effets du variant p.A253P sur l'activité du canal Ca<sub>v</sub>1.2 ont été étudiés en comparant le courant enregistré dans des cellules HEK tsA-201 transfectées avec Ca<sub>v</sub>1.2 WT et ses sous unités régulatrices avec celui des cellules transfectées avec Ca<sub>v</sub>1.2 p.A253P et ses sous unités régulatrices. Le courant I<sub>Ca,L</sub> WT s'active très rapidement puis s'inactive lentement en plusieurs dizaines de millisecondes (Figure 39A). Le courant des cellules exprimant Ca<sub>v</sub>1.2 p.A253P est

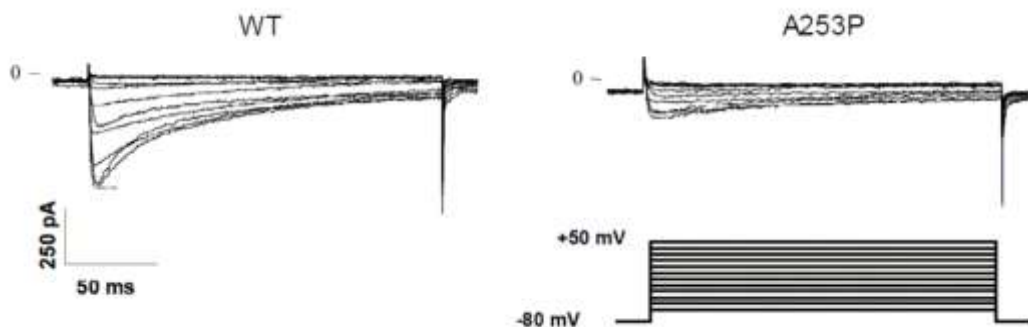
de plus petite amplitude que dans les cellules exprimant le canal sauvage. En moyenne, le variant p.A253P provoque une baisse significative de la densité de courant maximum ( $-5,19 \pm 0,71$  pA/pF,  $n = 82$  ;  $P < 0,001$ ) par rapport à celle mesurée en condition contrôle ( $-11,13 \pm 1,42$  pA/pF,  $n = 70$ ) (Figure 39B). Le variant p.A223P entraîne une perte de fonction du canal  $Ca_v1.2$  ; il sera désormais désigné sous le nom de mutation p.A223P.



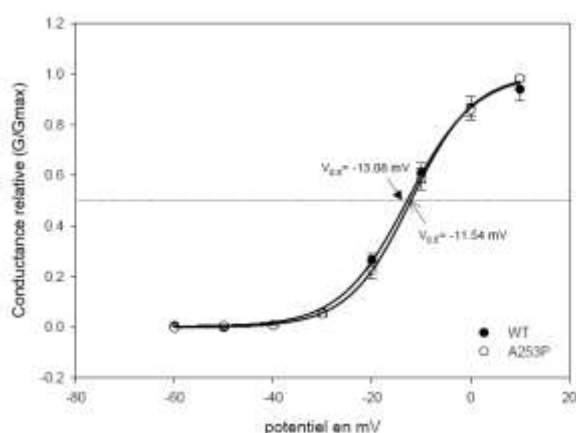
**Figure 39 – Effets de la mutation A253P sur les caractéristiques biophysiques du courant  $I_{Ca,L}$**   
 (A) protocole de stimulation (haut) ; courant enregistré avec  $Ca_v1.2$  WT (milieu) ; courant enregistré avec  $Ca_v1.2$  muté A253P (bas) ; (B) moyenne de la densité de courant mesurée au pic à 0mV dans les cellules exprimant  $Ca_v1.2$  WT ou le mutant A253P, \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Suite à ces observations, différents paramètres biophysiques ont été étudiés. Tout d'abord, la sensibilité au potentiel des canaux  $Ca_v1.2$  WT et muté A253P a été testée en enregistrant le courant  $I_{Ca,L}$  à différents potentiels (Figure 40A). La dépendance au potentiel de l'activation du courant  $I_{Ca,L}$  est similaire dans les deux conditions ( $V_{1/2} : -13,08 \pm 0,71$  mV,  $n=13$  pour le canal WT,  $-11,54 \pm 1,15$  mV,  $n=9$  pour la mutation p.A253P ; pente :  $6,34 \pm 0,17$  mV et  $6,37 \pm 0,28$  mV respectivement ; Figure 40B). De plus, le décours de la relation courant relatif-voltage (Figure 40C) n'est pas modifié par la présence de la mutation p.A253P. Le potentiel d'inversion du courant calcique reste similaire dans les deux conditions ( $62.76 \pm 1.13$  mV pour le WT et  $58.73 \pm 2.59$  mV pour la mutation p.A253P). Ces données suggèrent que la mutation p.A253P n'affecte pas l'activation voltage dépendante du canal calcique  $Ca_v1.2$ , ni sa sélectivité.

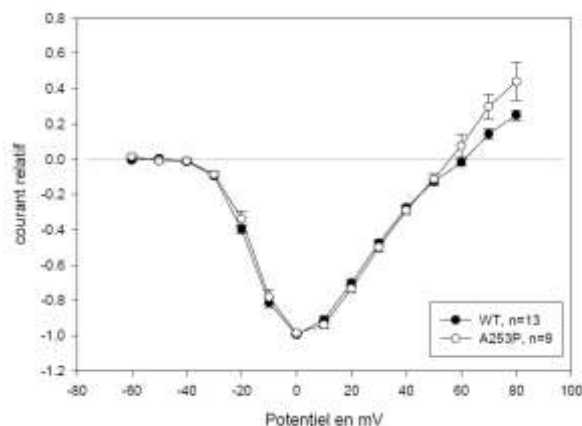
A



B



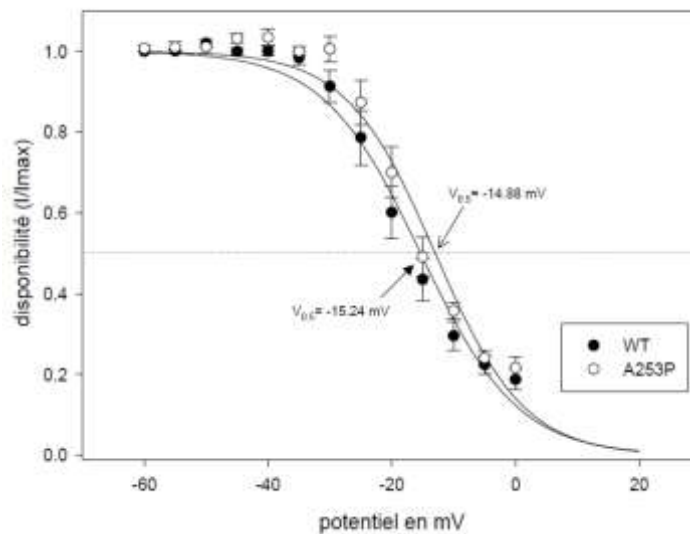
C



### Figure 40 – Effet de la mutation A253P sur la sensibilité au potentiel d' $I_{Ca,L}$

(A) Exemples de courants enregistrés à différents potentiels (de  $-60$  à  $+50$  mV,  $\text{incrément}=10$  mV) dans une cellule exprimant  $Ca_v1.2$  WT (gauche) ou la mutation A253P (droite); (B) courbe d'activation du courant  $I_{Ca,L}$  dans les 2 conditions, WT  $n=13$ , A253P  $n=9$ ; (C) Courbe courant-voltage dans les deux conditions.

Le courant calcique possède une inactivation contrôlée par deux paramètres : le potentiel et le calcium libre intracellulaire. L'inactivation dépendante du voltage du courant  $I_{Ca,L}$  a été étudiée dans les cellules exprimant  $Ca_v1.2$  WT ou la mutation p.A253P (Figure 41). La disponibilité des canaux  $Ca_v1.2$  en fonction du potentiel est, comme pour leur activation, similaire dans les deux conditions ( $V_{1/2}$ :  $-15.24 \pm 1.2$  mV,  $n=7$  pour le canal WT,  $-14.88 \pm 1.39$  mV,  $n=6$  pour la mutation p.A253P ; pente:  $-6.4 \pm 0.43$  mV et  $-5.04 \pm 0.26$  mV respectivement).



**Figure 41 – Courbe de disponibilité des canaux  $Ca_v1.2$  dans les 2 conditions, WT n=7, A253P n=6**

L'ensemble de ces données démontre que le canal calcique  $Ca_v1.2$  muté A253P produit un courant  $I_{Ca,L}$  diminué sans modification de son activation voltage dépendante, ni de sa sélectivité ni de son inactivation voltage dépendante.

#### III.4.3.2 Effet de la mutation A253P sur l'expression de $Ca_v1.2$

La diminution de la densité de courant  $I_{Ca,L}$  dans les cellules exprimant la mutation p.A253P peut avoir différentes origines : (i) un défaut d'expression du canal muté, (ii) un défaut de trafic à la membrane ou (iii) un canal dysfonctionnel. L'expression totale de la protéine canal  $Ca_v1.2$  WT et mutée A253P a été estimée par la technique de Western blot. Une condition supplémentaire dans laquelle les cellules ne sont pas transfectées a été ajoutée afin de servir de témoin négatif.

Les résultats indiquent la présence d'une bande à 250 kDa dans les conditions WT et mutée A253P. Cette bande, absente dans le puits contenant les lysats cellulaires non transfectés, correspond à la protéine  $Ca_v1.2$  (Figure 42). L'intensité de cette bande est similaire dans les deux conditions (manipulation répliquée 20 fois).



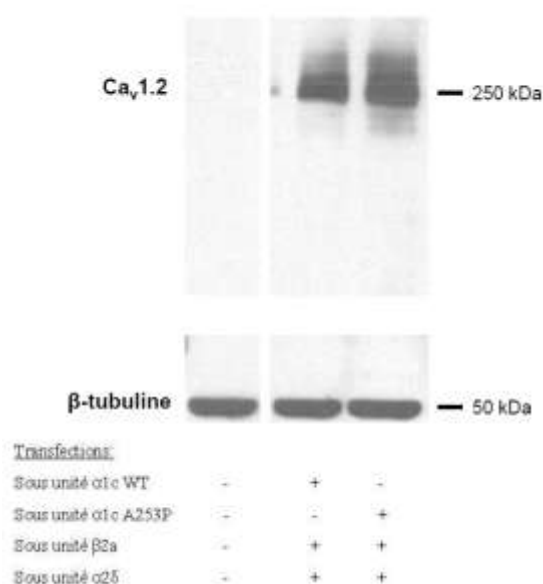


Figure 42 – Estimation de l'expression des protéines  $Ca_v1.2$  WT et mutées A253P par la technique de Western blot. La bande à 250 kDa correspond à  $Ca_v1.2$ , la bande à 50 kDa à la  $\beta$ -tubuline

Les données de Western blot indiquent que la mutation p.A253P n'affecte pas l'expression totale de protéines  $Ca_v1.2$ .

#### III.4.3.3 Effet de la mutation p.A253P sur l'expression membranaire de $Ca_v1.2$

L'expression totale de  $Ca_v1.2$  n'étant pas modifiée, nous nous sommes intéressés au trafic membranaire de la protéine en utilisant deux techniques distinctes, les immunomarquages et la biotinylation des protéines de surface.

En ce qui concerne les expériences d'immunomarquages, les résultats obtenus après le marquage extracellulaire ne nous ont pas permis de conclure quant à l'expression membranaire de  $Ca_v1.2$ . La protéine semble être très peu exprimée à la membrane devenant alors difficile à détecter par cette technique. Par ailleurs, les résultats obtenus par le marquage intracellulaire nous ont permis d'observer un marquage cytoplasmique de  $Ca_v1.2$  homogène en condition WT ou muté A253P (Figure 43).

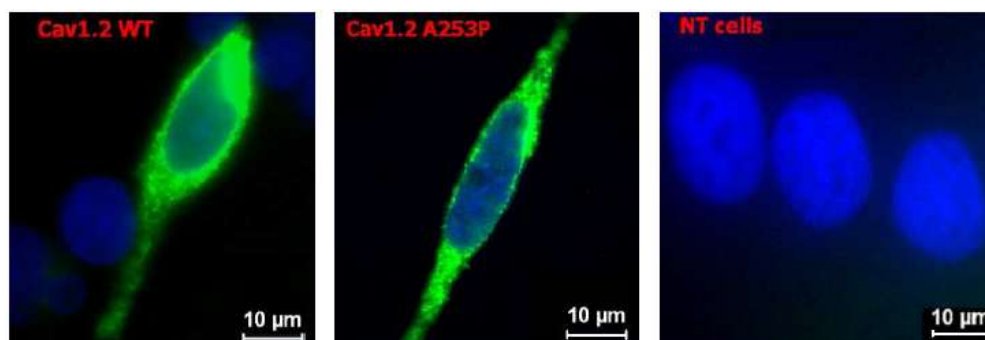
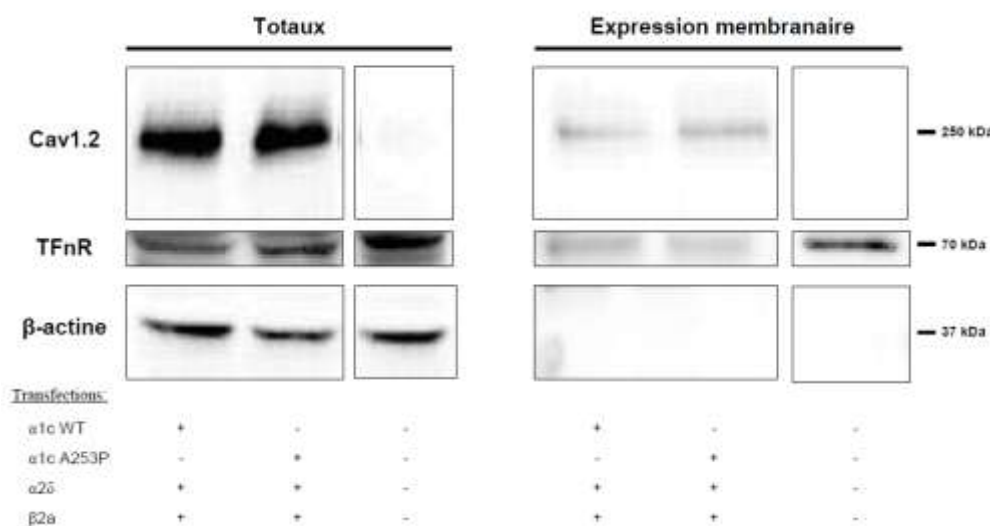


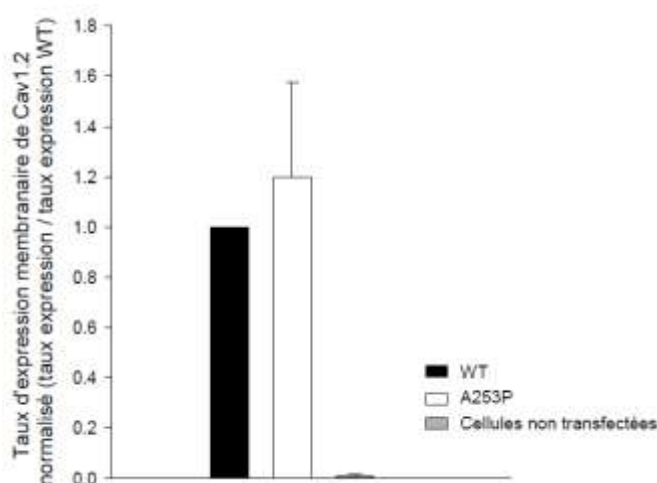
Figure 43 – Immunomarquages intracellulaires de la protéine  $Ca_v1.2$  WT (gauche), mutée A253P (centre) et contrôle sur cellules non transfectées (droite)

Nous avons ensuite choisi d'étudier l'expression membranaire de  $Ca_v1.2$  par la technique de biotinylation des protéines à la surface cellulaire. Cette technique permet de purifier l'ensemble des protéines membranaires et d'obtenir une estimation semi-quantitative de l'expression du canal  $Ca_v1.2$  à la surface cellulaire. Les premiers résultats indiquent la présence d'une bande à 250kDa dans les conditions WT et mutée A253P que ce soit dans les lysats totaux ou biotinylés. Cette bande, absente dans le puits contenant les lysats cellulaires non transfectés correspond à la protéine  $Ca_v1.2$  (Figure 44A). L'intensité de cette bande est similaire dans les deux conditions. Le récepteur à la transferrine (TFnR), situé à la surface cellulaire, est utilisé pour vérifier l'homogénéité de la charge en protéines de chaque puits sur le gel. La  $\beta$ -actine est utilisée pour vérifier l'absence de protéines intracellulaires dans les puits contenant les lysats membranaires purifiés.

A



B



**Figure 44 – Estimation de l'expression membranaire des protéines  $Ca_v1.2$  WT et mutées A253P par la technique de biotinylation des protéines de surface cellulaire**

(A) La bande à 250 kDa correspond à  $Ca_v1.2$ , la bande à 70 kDa au récepteur à la transferrine (TFnR) et la bande à 37kDa à la  $\beta$ -actine ; (B) Taux d'expression membranaire normalisé de  $Ca_v1.2$ ,  $n=4$

Cette expérience a été reproduite 4 fois et l'ensemble des données suggère que la mutation p.A253P n'affecte pas l'expression membranaire de la protéine Ca<sub>v</sub>1.2 (Figure 44B ; expression normalisée, 1 pour le WT, 1.19 ± 0.37 pour A253P et 0.01 ± 0.005 pour les cellules non transfectées).

### III.5 Discussion du projet 3

Dans ce projet, nous avons mis en évidence des variants génétiques dans deux gènes candidats pour le SQTC : le gène *CACNA1C* codant la sous unité α du canal calcique Ca<sub>v</sub>1.2 et le gène *SLC22A5* codant le transporteur à la carnitine OCTN2.

Le canal calcique cardiaque Ca<sub>v</sub>1.2 est impliqué dans différents troubles du rythme cardiaque comme le SQTl congénital de type 8 [Splawski *et al.* 2004] mais aussi dans le SBr associé ou non à un intervalle QT court (< 360 ms) [Antzelevitch *et al.* 2007]. L'hypothèse de notre étude est qu'il puisse exister des variants dans le canal Ca<sub>v</sub>1.2 responsable de SQTC isolé. La mutation p.A223P du gène *CACNA1C* codant la sous unité α du canal calcique Ca<sub>v</sub>1.2 a été identifié chez un individu atteint d'un SQTC isolé après criblage d'une série de 15 patients. Ce patient est un enfant de 22 mois hospitalisé pour une syncope. Son ECG présente un intervalle QTc = 350 ms, une onde T de grande amplitude, étroite et symétrique. Ce variant a été retrouvé chez la mère (II.2) et chez la grand-mère (I.2) du propositus. Cependant l'individu I.2 ne présente pas le phénotype (Figure 38).

Nos résultats font apparaître une diminution du courant calcique d'environ 50% lorsque le canal muté est exprimé à l'état homozygote. Le gène *CACNA1C* est fortement exprimé dans le cœur. Il est responsable de la phase de maintien de la dépolarisation du PA ventriculaire. Une mutation perte de fonction de ce gène est susceptible de provoquer un SQTC et des arythmies cardiaques. Cependant, ni les immunomarquages, ni la biotinylation des protéines membranaires ne semblent être assez sensibles pour identifier le mécanisme responsable de la diminution du courant.

Dans un cardiomyocyte, le canal calcique dispose de différents partenaires régulateurs afin d'être exprimé à la membrane. Ces partenaires ne sont probablement pas tous connus et pourraient être absents dans le modèle cellulaire utilisé. Pour contourner ce problème, il serait intéressant de travailler sur des cardiomyocytes surexprimant le gène *CACNA1C* sauvage ou muté A253P. Nous pourrions alors réaliser une étude complémentaire incluant la biotinylation des protéines membranaires, des immunomarquages ainsi que des expériences de patch clamp en potentiel imposé qui permettraient d'étudier les effets de la mutation sur un modèle plus proche du myocarde humain. Une corrélation génotype/phénotype pourrait ainsi être établie.

Si l'absence de défaut de trafic membranaire est confirmée il restera à comprendre pourquoi la densité de courant  $I_{Ca,L}$  est diminuée lorsque le canal est muté. Les hypothèses sont (i) la conductance unitaire du canal est modifiée, (ii) la probabilité d'ouverture du canal est diminuée, (iii) un partenaire modulateur des propriétés électrophysiologiques du canal ne parvient plus à agir. Pour tester les deux premières hypothèses, des expériences de patch clamp en canal unitaire sont à envisager. En ce qui concerne la troisième hypothèse, il faudra tout d'abord tester les effets des deux sous-unités co-transfectées en procédant à la transfection des canaux WT et mutés en leurs absences. La sous unité  $\alpha 2\delta$  a été mise en évidence dans la modulation des propriétés électrophysiologiques du canal  $Ca_v1.2$  [Bangalore *et al.* 1996]. Son absence est associée à une diminution de l'amplitude du courant  $I_{Ca,L}$ . Dans un second temps, on pourra envisager d'identifier d'autres partenaires régulateurs potentiels du canal puis tester leurs effets sur le courant  $I_{Ca,L}$ .

S'il on considère la mutation  $Ca_v1.2$  p.A223P responsable du QT court, l'individu I.2 est non pénétrante. La mutation  $Ca_v1.2$  p.A223P ne semble donc pas suffisante pour modifier l'intervalle QT chez cette patiente. L'individu I.2 se différencie d'un point de vue génétique de sa descendance par un état hétérozygote de son variant OCTN2. En effet le propositus ainsi que sa mère présentent, en plus du variant  $Ca_v1.2$  p.A223P, un mutant hétérozygote composite du gène *SLC22A5* codant un transporteur de la carnitine. Il semble alors que le raccourcissement du QT à l'ECG serait corrélé au déficit de transport de la carnitine, d'autant plus que la supplémentation orale en carnitine normalise la durée de l'intervalle QT.

En résumé, le génotype double hétérozygote pour le transporteur OCTN2 corrèle avec le phénotype QT court. Cependant la perte de fonction du canal  $Ca_v1.2$  p.A223P apparaît comme une bonne explication moléculaire et électrophysiologique. Nous allons par conséquent nous intéresser à l'effet de la carnitine sur le courant  $I_{Ca,L}$ . La mutation  $Ca_v1.2$  p.A223P pourrait avoir une sensibilité à la carnitine différente : (i) l'action de la carnitine sur cette mutation pourrait induire une augmentation d'entrée de calcium ce qui expliquerait le phénotype sain de l'individu I.2 (ii) l'absence de carnitine plasmatique chez les individus II.2 et III.1 pourrait avoir une action propre sur la diminution de l'intervalle QT. Cette hypothèse est soutenue par des travaux montrant l'effet d'acylcarnitine à longue chaîne sur l'homéostasie calcique de cardiomyocytes ventriculaires de chien et de cobaye [Adams *et al.* 1979; Meszaros *et Pappano* 1990; Wu *et Corr* 1992]. De plus les premiers résultats, sur le canal hERG, de l'équipe de Jean-Yves Le Guennec montre que la carnitine possède une activité extracellulaire ; où se trouve la mutation  $Ca_v1.2$  p.A223P. Deux approches vont être utilisées : la première sera de tester les effets de l'addition d'acylcarnitine sur les canaux WT et mutés exprimés dans les cellules HEK tsA-201. Dans le cas présent, les patients atteints souffrent d'un déficit en carnitine. Nous allons

donc tester, dans un deuxième temps, les effets de la disparition de carnitine. Pour cela, nos collaborateurs, à Tours, disposent de fibroblastes du propositus et de donneurs sains. Nous allons tenter de transfecter ces cellules cultivées en absence et en présence de carnitine et étudier le courant calcique.

La particularité de cette famille est la présence de deux membres porteurs de mutations hétérozygotes composites pour le gène *SLC22A5* codant un transporteur de la carnitine OCTN2. Ils présentent tous les deux des troubles du rythme mais ne développent pas de cardiomyopathie dilatée généralement associée au déficit en carnitine causé par les mutations du transporteur OCTN2 [Amat di San *et al.* 2008]. La mutation  $Ca_v1.2$  p.A223P pourrait expliquer la particularité du phénotype de cette famille. En effet l'un des facteurs essentiels associés à la cardiomyopathie dilatée est un déséquilibre de l'homéostasie calcique [Haghighi *et al.* 2004; Ahmad *et al.* 2005]. Dans le cas présent, le déficit d'entrée de calcium lors de la dépolarisation ventriculaire pourrait limiter les effets délétères de l'absence de transporteur de la carnitine chez le propositus et sa mère. La perte de fonction du canal  $Ca_v1.2$  ne suffirait pas à perturber de façon majeure l'activité électrique cardiaque quand un allèle du transporteur de la carnitine est fonctionnel comme dans le cas de sa grand-mère. La diminution de courant calcique entrant  $I_{Ca,L}$  pourrait avoir un effet protecteur sur une cardiomyopathie dilatée en réduisant la surcharge calcique [Hill 2003].

## ***C- DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION***

La compréhension des pathologies rythmiques d'origine génétique a commencé par l'identification de modèle simple, monogénique à forte pénétrance. A noter que les grandes avancées dans ces arythmies ventriculaires se sont faites par des approches génome entier : l'analyse de liaison pangénomique a permis d'identifier les 3 trois premiers gènes du SQTl [Keating *et al.* 1991; Jiang *et al.* 1994]. La mise en évidence de ces 3 gènes, *KCNQ1*, *KCNH2* et *SCN5A*, date d'une quinzaine d'année. Ils représentent encore aujourd'hui la quasi-totalité des mutations rencontrées dans ce syndrome. Ces analyses pangénomiques ont permis également de révéler le premier gène ne codant pas une protéine canalaire, responsable de l'allongement de l'intervalle QT : *ANK2* mais aussi pour le premier gène et majoritaire dans les TV catécholergiques *RYR2* [Schott *et al.* 1995; Swan *et al.* 1999].

Ces approches puissantes ont été la base pour la compréhension moléculaire de nombreux syndromes arythmogènes. En effet ces mêmes gènes ont été impliqués par la suite, cette fois-ci par des approches gènes candidats, dans la fibrillation auriculaire, le SQTc, les troubles de la conduction et la dysfonction sinusale.

La découverte de nouveaux gènes s'est faite principalement par l'approche gène candidat qui doit ses résultats à une part de réussite. Cependant, ils ne solutionnent, en général, que peu de cas et un nombre important reste inexpliqué (25% des SQTl et 80% des SBr) [Lehnart *et al.* 2007]. Une réponse à cet échec passe probablement par les nouvelles technologies d'analyse du génome (séquençage à très haut débit et puces CGH) et outils bioinformatiques qui permettront de couvrir de plus grandes régions génomiques à la recherche de nouveaux types de variants (réarrangements et mutations dans les régions non codantes) et de nouveaux gènes.

Une seconde hypothèse serait qu'une partie des syndromes répondent à un modèle plus complexe que celui du modèle monogénique. Une addition de variants fréquents, au risque individuel faible, pourrait conduire à une susceptibilité aux troubles du rythme et à la mort subite. En témoigne le nombre grandissant d'études d'association menées dans le domaine cardiovasculaire, il se peut que les prochaines années permettent une stratification du risque plus précise à l'aide de ces nouveaux marqueurs. L'impact de l'environnement est une composante non génétique mais influant sur l'expressivité d'une maladie et par conséquent à prendre en compte. La part de celle-ci est difficilement quantifiable, ce qui complique l'établissement d'une médecine prédictive.

Sur ce schéma un projet a été initié dans le cadre du réseau Leducq par le CHU de Nantes et l'institut du thorax pour identifier des facteurs de susceptibilité à la mort subite. Ce protocole d'investigation clinique consiste à créer un registre de surveillance épidémiologique exhaustive de la mort subite extrahospitalière de l'adulte. Parallèlement à la création de ce registre nommé FASTER (*France Atlantic Sudden death Epidemiologic Registry*), une banque d'ADN pour la réalisation d'une étude cas-témoin est en cours de constitution.

Les travaux de ma thèse s'inscrivent dans cette période charnière où les modèles monogéniques, les approches gènes candidats et les outils actuels montrent leurs limites et suggèrent le développement de nouvelles hypothèses et de nouveaux outils afin d'approfondir la compréhension de ces troubles du rythme ventriculaire à risque de mort subite. Ces outils vont permettre d'appréhender les facteurs de susceptibilités génétiques dans leur ensemble grâce au développement de ces approches pangénomiques haut débit (séquençage et génotypage). Les prochains défis résideront dans la capacité d'analyse de ces quantités de données générées par ces nouvelles technologies et dans l'interprétation de ces variations génétiques afin d'en extraire une valeur prédictive. Ce dernier challenge nécessitera la collaboration d'hommes aux expertises complémentaires : bioinformatique, biochimie, clinique, électrophysiologie, génétique et physiologie cardiaque.

Les résultats de cette recherche appliquée vise à comprendre le mécanisme arythmogène et parfois létal de ces cardiopathies, fournir aux patients une meilleure détection du risque rythmique et enfin adapter le traitement en fonction du génotype. D'un point de vue fondamental la découverte de nouvelles bases moléculaires dans un contexte pathologique permet également d'identifier de nouvelles voies de signalisation et ainsi d'améliorer la compréhension de la physiologie cardiaque.



## ***ANNEXES***

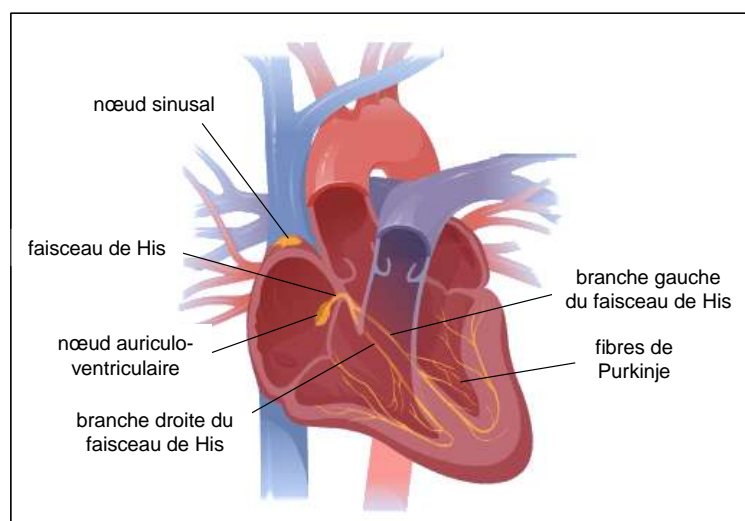
## I. Annexe 1 : physiologie cardiaque

### I.1 Anatomie et fonctionnement du cœur

Le cœur humain est un organe creux et musculaire composé de quatre cavités : deux oreillettes et deux ventricules. Au centre du système circulatoire, il a pour rôle de transmettre aux poumons le sang non oxygéné puis de pomper le sang oxygéné vers le reste de l'organisme. L'oxygène dont le cœur a besoin pour fonctionner est apporté par les artères coronaires. Cette fonction de pompe est rendue possible par la contraction cohérente de chaque cavité. L'ordre de contraction est donné par un influx nerveux qui se propage grâce au système de conduction dans les oreillettes puis dans les ventricules.

### I.2 Cycle cardiaque et cardiomyocytes

Le cycle cardiaque ou « révolution cardiaque » comprend une phase d'éjection du sang (systole ou contraction du muscle cardiaque) et une phase de remplissage (diastole ou relaxation) et dure environ 0,8 seconde. Chaque battement (65 à 80 par minute) se produit spontanément mais la fréquence de ces battements est modulée par le système nerveux autonome et hormonal. L'influx naît du nœud sinusal ou nœud de Keith et Flack, foyer de l'automatisme cardiaque situé au niveau supérieur de l'oreillette droite. Il est transmis dans les oreillettes, puis dans les ventricules par l'intermédiaire du nœud auriculo-ventriculaire qui ralentit la conduction pour permettre aux ventricules de se remplir. Puis l'influx nerveux se propage rapidement dans les ventricules par le faisceau de His et ses branches droites et gauches, et les fibres de Purkinje permettent la conduction de l'apex vers la base des ventricules (Figure 45) [Pennisi *et al.* 2002].



**Figure 45 – Le cœur et le tissu de conduction**  
Modifié d'après <http://www.nhlbi.nih.gov/health>

Au sein du myocarde, l'onde de conduction est transmise de l'endocarde (couche interne) vers le mid-myocarde (couche épaisse intermédiaire), puis l'épicarde (couche externe).

### I.3 L'activité électrique cardiaque

#### I.3.1 Au niveau cellulaire : potentiel d'action, canaux, et courants ioniques

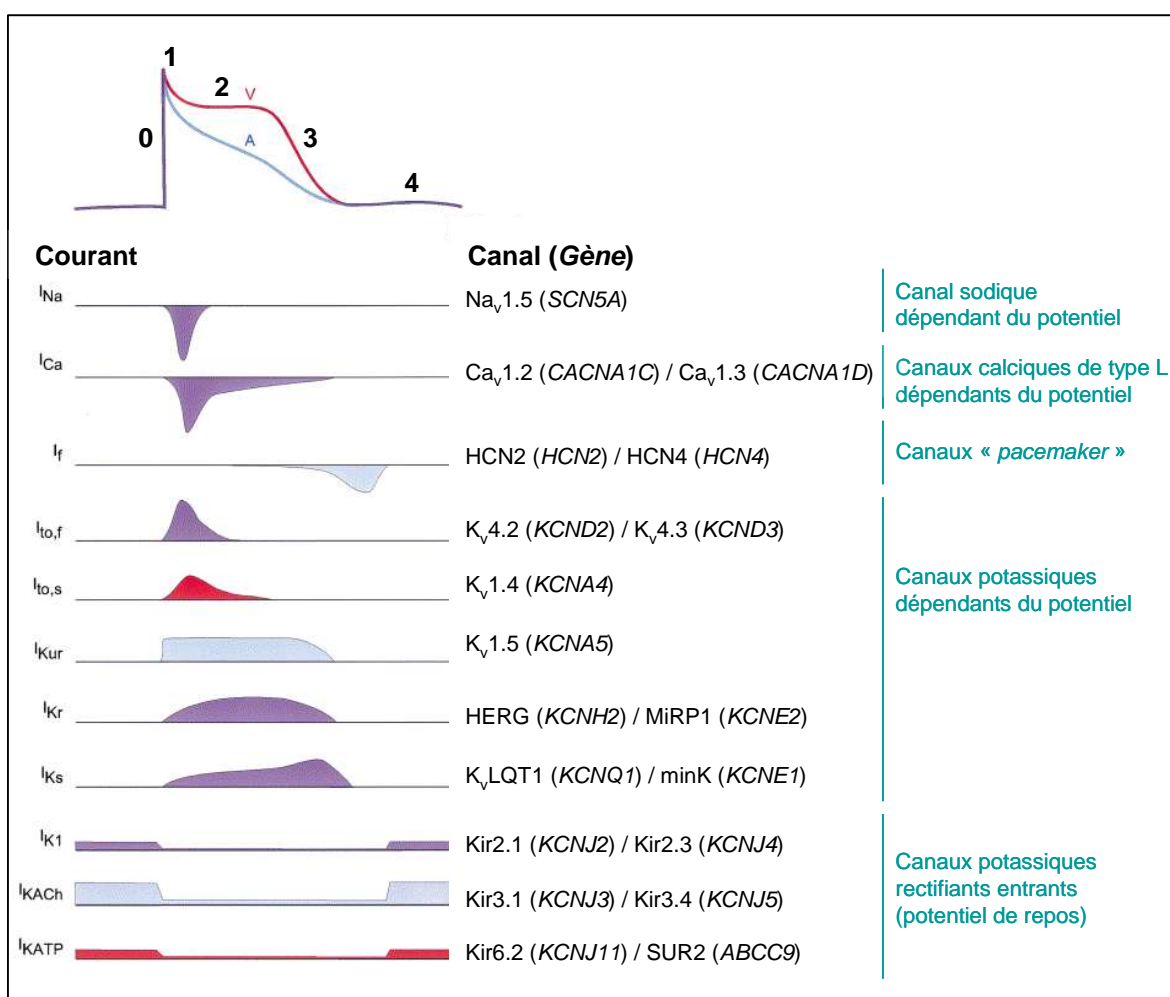
Le potentiel d'action (PA) est responsable de la propagation de l'influx nerveux. Il s'agit d'une modification brutale du potentiel membranaire de repos d'une cellule douée d'automatisme ou excitable, qui est transmise rapidement de cellule en cellule provoquant la contraction simultanée des cellules spécialisées dans le couplage excitation-contraction. Une trentaine de courants ioniques différents agissent au niveau cardiaque pour la genèse et le maintien du PA chez les vertébrés [Boyett *et al.* 1996].

L'onde de dépolarisation transitoire est déclenchée essentiellement par le courant  $I_f$  dans les cellules nodales (dépolarisation lente et spontanée) et par la dépolarisation des cellules voisines du tissu contractile. L'ensemble des mouvements des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$  à travers les canaux ioniques spécifiques dépendants du potentiel et des échangeurs sont responsables du PA. La morphologie des PA est différente d'un type cellulaire à l'autre, selon que les cellules soient spécialisées dans l'automatisme, l'excitabilité, ou la conduction. Il existe également une hétérogénéité régionale (ventriculaire/auriculaire, épicaarde/mid-myocarde/endocarde). Cette hétérogénéité est due à une expression différentielle des canaux [Gaborit *et al.* 2007]. Le potentiel d'action des cardiomyocytes contractiles comprend cinq phases (Figure 46) :

- **Phase 0 : dépolarisation** (potentiel de membrane  $-80$   $-85$  mV  $\rightarrow$   $+30$  mV) due à l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants (principalement  $\text{Na}_v1.5$  codé par *SCN5A*) et au courant  $I_{\text{Na}}$ . Elle entraîne l'activation d'autres canaux ioniques dépendants du potentiel.
- **Phase 1 : repolarisation initiale** due à l'inactivation du courant sodique et à l'activation du courant transitoire sortant potassique dépendant du potentiel ( $I_{\text{to}}$ ).
- **Phase 2 : plateau** ( $\sim 0$  mV) dû au courant entrant calcique  $I_{\text{Ca,L}}$  généré, en partie, par le canal  $\text{Ca}_v1.2$  codé par le gène *CACNA1C*. Pendant ce plateau on observe une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule (DHPR voltage-dépendant) et un relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique (RyR2) dans le cytoplasme, responsable de la contraction des cellules. Du fait de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, l'échangeur Na/Ca fonctionne alors dans le sens entrée d'ions  $\text{Na}^+$ /sortie d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , il en résulte un courant net entrant

dépolarisant qui a tendance à ralentir la repolarisation et à former un plateau. Dans les cellules ventriculaires et les cellules de Purkinje, il subsisterait un petit courant  $I_{Na}$  persistant.

- **Phase 3 : repolarisation** due à la réduction des courants entrants ( $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$ ) et à l'activation des courants potassiques sortants, sa composante lente  $I_{Ks}$  généré par le canal  $K_vLQT1$  et sa sous unité  $\beta$  minK codés respectivement par les gènes *KCNQ1* et *KCNE1*, et sa composante rapide  $I_{Kr}$  généré par le canal hERG et sa sous-unité  $\beta$  MiRP1 produits des gènes *KCNH2* et *KCNE2* respectivement. Ces deux courants sortants ramènent le potentiel de membrane à sa valeur de repos.
- **Phase 4 : stabilisation** du potentiel de repos due au courant  $I_{K1}$ . La différence de potentiel est due au déséquilibre des ions  $K^+$  et  $Na^+$  de part et d'autre de la membrane (l'intérieur de la cellule plus riche en  $K^+$  étant chargé négativement, et l'extérieur plus riche en  $Na^+$  positivement). Il est maintenu grâce à la pompe  $Na^+/K^+$  ATP-dépendante.

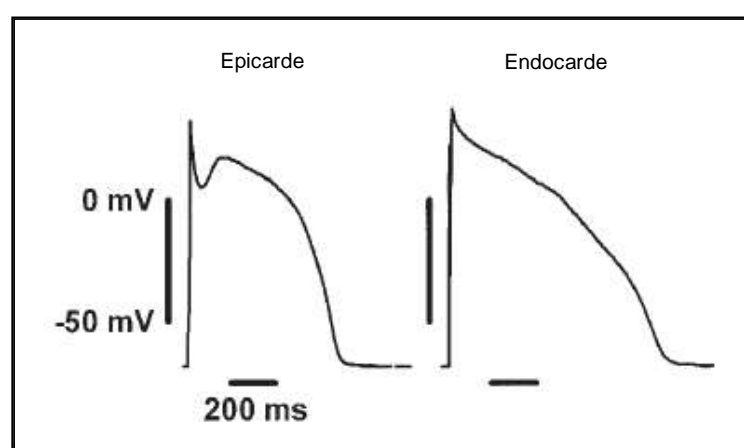


**Figure 46 – Représentation des principaux courants ioniques responsables des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains et des canaux ioniques associés**

*V* : PA ventriculaire, *A* : PA auriculaire. *En rouge*, les courants enregistrés uniquement dans le ventricule, *en bleu* uniquement dans l'oreillette, *en violet* dans les deux compartiments. Vers le bas les courants entrants et vers le haut les courants sortants.  $K_v$  : Canaux potassiques dépendants du voltage,  $K_{ir}$  : Canaux potassiques rectifiants entrants (inward rectifier). *I* signifie courant. Modifié d'après [Pond et Nerbonne 2001]

Le potentiel d'action des cellules auriculaires est caractérisé par une phase de plateau (phase 2) peu marquée ( $I_{to}$  prédominant,  $I_{Ca,L}$  plus faible) et une repolarisation (phase 3) plus lente que celle des cellules ventriculaires.

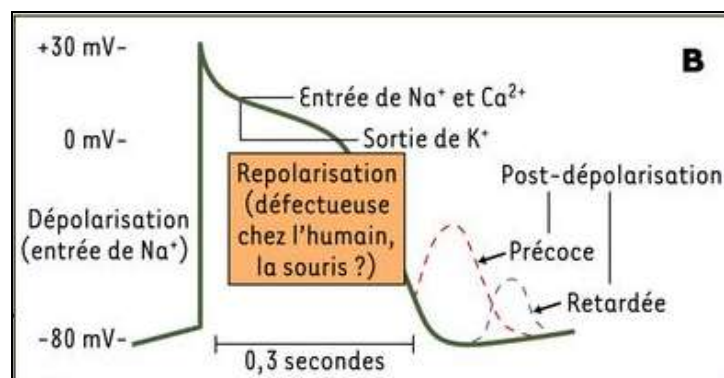
Il existe également une grande hétérogénéité régionale de densité de courant  $I_{to}$  dans les cellules ventriculaires, en particulier entre l'épicarde et l'endocarde. Dans l'épicarde, les cellules M [Sicouri *et* Antzelevitch 1991], et les fibres de Purkinje, ce courant  $I_{to}$  prédominant serait responsable de l'aspect « *spike and dome* » du PA. Cette variabilité entre PA épïcardique et PA endocardique pourrait être responsable d'un « gradient transmural » lors de la repolarisation précoce ou du syndrome du Brugada (SBr) (Figure 47).



**Figure 47 – Potentiels d'action épïcardique et endocardique chez l'homme**

Le PA épïcardique normal est caractérisé par une encoche (« *spike and dome* ») due à un courant  $I_{to}$  prédominant. L'absence d'encoche pour le PA endocardique est la conséquence d'un courant  $I_{to}$  plus faible. Modifié d'après [Ravens *et* Wettwer 1998].

La phase de repolarisation pendant laquelle la cellule ne peut réagir à une nouvelle stimulation est la période réfractaire. Un déséquilibre des courants sortants et entrants au niveau des phases 2 et 3 entraîne une susceptibilité aux postdépolarisations précoces. Une surcharge en  $Ca^{2+}$  intracellulaire pourra entraîner une entrée excessive de  $Na^+$  (par l'échangeur  $Na/Ca$ ) et causer des postdépolarisations retardées en phase 4 de repos (Figure 48).



**Figure 48 – Représentation d'un potentiel d'action myocardique et d'une post-dépolarisation précoce et retardée**

Modifié d'après [Pourrier *et* Nattel 2004]

### I.3.2 L'électrocardiogramme de surface

Le tracé électrocardiographique, ou ECG, est l'enregistrement de l'activité électrique du cœur. Il reflète l'ensemble des potentiels d'action cellulaires dans les différents compartiments cardiaques. En effet, les électrodes amplifient le signal et l'ECG donne une représentation de la dépolarisation et repolarisation des oreillettes puis des ventricules (Figure 49). Son caractère non invasif en fait un outil diagnostique très couramment utilisé pour détecter des anomalies cardiaques.

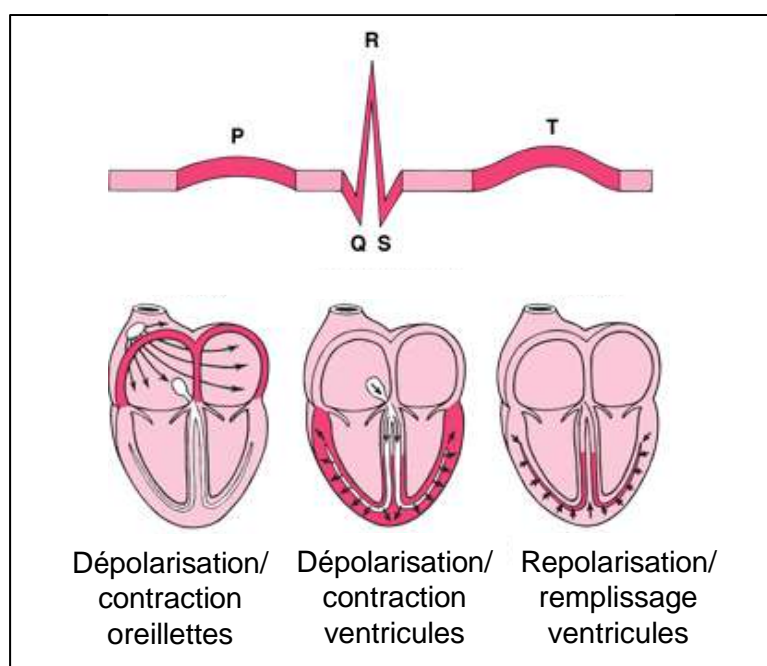


Figure 49 – L'ECG, manifestation du fonctionnement électrique du cœur

L'ECG standard est enregistré sur douze dérivations pour avoir une représentation tridimensionnelle de l'activité électrique du cœur : six dérivations précordiales (V1, V2, V3, V4, V5, V6), et six dérivations des membres (DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF).

Le cycle cardiaque se traduit par l'apparition successive des ondes P, Q, R, S, T, et U, positives ou négatives selon les dérivations observées, et des mesures sont réalisées par les cardiologues pour rechercher des anomalies (Figure 50).

#### Les ondes :

- **Onde P** : dépolarisation des oreillettes depuis le nœud sinusal jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire.
- **Complexe QRS** : dépolarisation des ventricules.
- **Onde T** : repolarisation des ventricules.

- **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.

Les mesures courantes :

- **Intervalle PR ou PQ** : reflète le temps de conduction auriculo-ventriculaire : propagation de l'influx par les oreillettes, le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His, ses branches, et le réseau de Purkinje. Son allongement traduit un trouble de conduction (par exemple, la maladie de Lenègre).
- **Intervalle QT** : reflète le temps de la dépolarisation et repolarisation ventriculaire. Sa durée dépend de la fréquence cardiaque, de l'âge, et du sexe. On parle souvent d'intervalle QT corrigé (QTc) qui est adapté à la fréquence cardiaque. La formule la plus couramment utilisée pour le calcul du QTc est la formule de Bazett :  $QTc = QT/\sqrt{RR}$ . L'allongement ou le raccourcissement de cet intervalle traduit un défaut de repolarisation ventriculaire.
- **Segment ST** : correspond à la phase 2 de plateau du PA où toutes les cellules ventriculaires sont dépolarisées, il est normalement isoélectrique. Son déplacement marqué vers le haut (« sus-décalage ») indique parfois un état pathologique (par exemple, le syndrome de Brugada). Il est débuté par le **point J** pour « Jonction ST », qui est quasiment inexistant dans les conditions physiologiques. Une onde J distincte est communément observée chez les patients présentant un syndrome de repolarisation précoce bénin, TV idiopathique, ou SBr, lorsque l'encoche du PA épicardique est plus marquée.

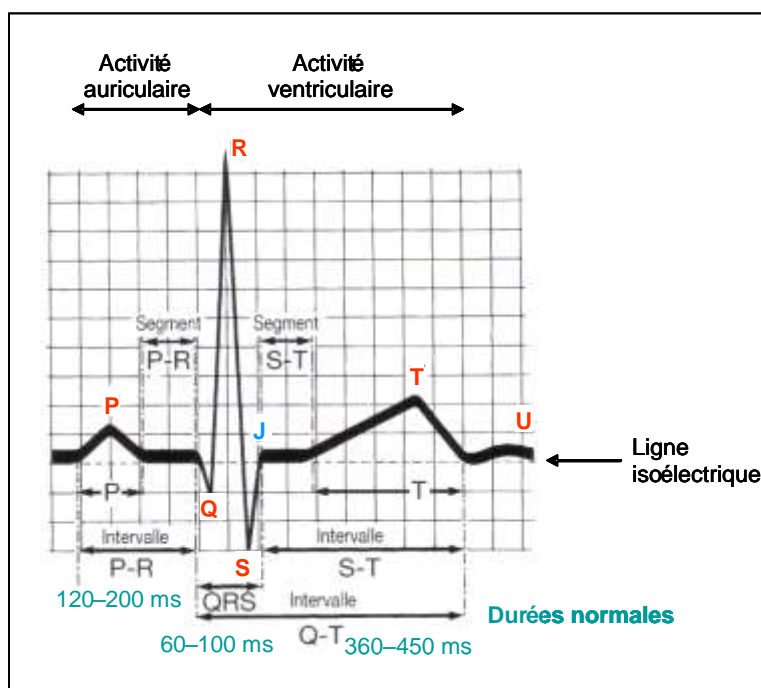


Figure 50 – Principaux paramètres de l'ECG

L'origine du rythme cardiaque peut être sinusale (nœud sinusal), jonctionnelle (nœud auriculo-ventriculaire), ventriculaire, auriculaire (foyers ectopiques), ou artificielle (électro-entraîné par un stimulateur cardiaque ou « *pacemaker* »). Un rythme normal est sinusal, avec des intervalles RR réguliers, qui déterminent la fréquence des battements.

Une dérégulation dans le fonctionnement d'un canal ionique ou d'une de ses protéines partenaires peut conduire à une altération du potentiel d'action et entraîner des troubles du rythme cardiaque souvent visibles à l'électrocardiogramme. L'électrocardiogramme sur 24 heures (holter) est parfois utilisé pour détecter les troubles paroxystiques.

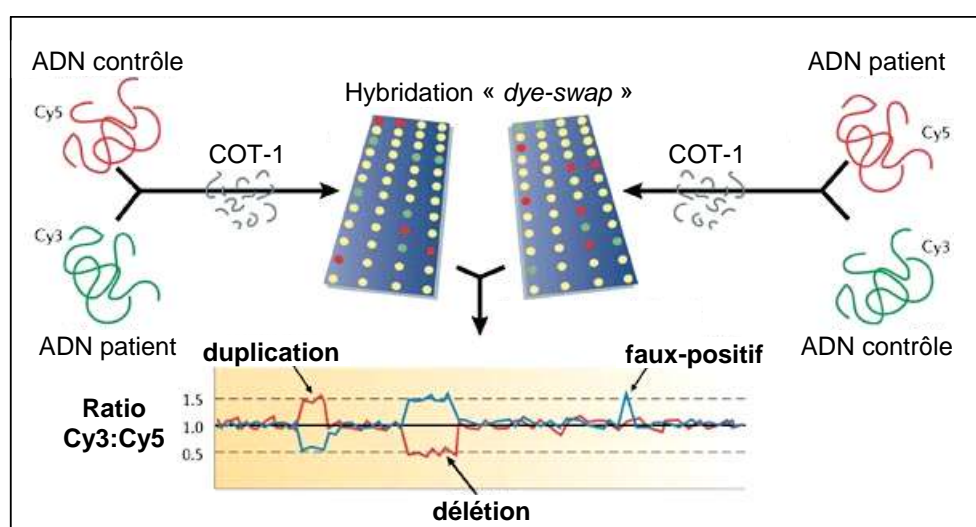


## II. Annexe 2 : matériel et méthodes

### II.1 Protocole de détection de réarrangements génomiques

La recherche de réarrangements a été réalisée grâce à la technologie des puces CGH-array (« *Oligo aCGH Microarrays* », Agilent Technologies®).

Le principe est de co-hybrider sur la puce l'ADN génomique d'un patient atteint et un ADN contrôle, tous deux marqués par des fluorochromes différents (Cy3 et Cy5), et de rechercher des régions pour lesquelles le nombre de copies est variable entre les deux individus (Figure 51).



**Figure 51 – Principe de la détection de réarrangements génomiques par CGH-array**

L'ADN contrôle et l'ADN du patient atteint sont marqués avec des fluorophores différents (Cy5 et Cy3), et hybridés aux puces (« arrays ») après blocage des éléments répétés avec l'ADN COT-1. Les sondes déposées sur la puce peuvent être des clones génomiques, des fragments de PCR, ou des oligonucléotides. Après l'hybridation, le ratio de fluorescence Cy3:Cy5 est déterminé et révèle les variations de nombre de copies entre les deux ADN. L'expérience est souvent menée en « dye-swap » avec une hybridation de chaque ADN avec chacun des deux fluorophores pour éliminer les faux-positifs. Modifié d'après revue par [Feuk et al. 2006].

L'utilisation de ces puces a des avantages majeurs : (i) la résolution, puisque les sondes de la puce sont des oligonucléotides 60-mer et elle permet donc de détecter de petits réarrangements par rapport aux puces utilisant des clones génomiques, (ii) l'utilisation des puces permet un criblage haut-débit des zones d'intérêt, avec la configuration pan-génomique, ou la configuration à façon pour laquelle on choisit les sondes dans la base de données eArray (une sonde disponible toutes les 300 bases environ, <http://earray.chem.agilent.com/earray/>), (iii) la quantité d'ADN génomique requise est faible, de l'ordre de 500 ng.

Pour la recherche de réarrangements au niveau gène *GPD1L* de la famille C (syndrome de Brugada, Projet 1c), une puce à façon a été confectionnée (« *Custom HD-CGH Microarrays 2 x 105K* »). Elle contenait 310 sondes pour le gène *GPD1L*.

Pour affiner les bornes des réarrangements du gène *KCNH2* dans le projet 2, une puce commerciale pan-génomique a été utilisée dans un second temps. Cette puce pan-génomique contient 244 000 sondes oligonucléotidiques réparties dans les séquences codantes et non-codantes (« *Human Genome CGH Microarray 244A* ») avec une distance médiane de 8,9 kb. Le protocole suivant décrit brièvement la procédure expérimentale. Le protocole détaillé est disponible sur le site Internet d'Agilent (« *Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis* », [<http://www.agilent.com/>]).

La concentration et la qualité de l'ADN génomique sont évaluées par mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm pour évaluer la contamination en protéines (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies). Les ADN sont digérés par une enzyme et purifiés puis marqués différemment par les cyanines 3-dUTP (Cy3 : vert) ou 5-dUTP (Cy5 : rouge), avec le kit « *Agilent Genomic DNA Labeling Kit PLUS* ». Pour optimiser la fiabilité des résultats et éviter le biais inévitable dû aux fluorophores, les expériences ont été réalisées en « *dye-swap* » pour les puces à façon. Chaque ADN est hybridé sur deux puces distinctes avec chacun des deux fluorophores.

Les ADN fragmentés et marqués sont purifiés et déposés sur la puce, qui est ensuite placée dans une chambre d'hybridation pendant 40 heures à 65°C. Après l'hybridation, les puces sont lavées et lues avec le scanner G2565BA à l'aide du logiciel Agilent Scanner Control Software v7.0. Ce scanner contient deux lasers qui permettent l'acquisition simultanée des signaux émis par les fluorochromes Cy3 et Cy5. Les données brutes (les intensités de fluorescence) sont extraites avec le logiciel Feature Extraction Software 9.1. Après normalisation, un rapport des intensités de fluorescence entre les deux ADN co-hybridés, pour chaque sonde, est calculé et représenté graphiquement grâce au logiciel CGH Analytics Software 3.4. Un rapport de 1 correspond à un nombre de copies identique pour les deux patients (2 copies *versus* 2 copies, car 2 allèles). Un rapport de ~1,5 (3 copies *versus* 2 copies) ou ~0,5 (1 copie *versus* 2 copies) met en évidence un gain de copie ou perte de copie pour l'un ou l'autre des deux échantillons co-hybridés et permet donc de mettre en évidence des duplications ou des délétions.

Lorsque des variants sont détectés, ils sont comparés avec la base de données recensant les variants communs du nombre de copies : *Database of Genomic Variants*, Toronto, Canada <http://projects.tcag.ca/variation> [lafrate *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006]

## II.2 Patch clamp

La technique de patch-clamp en configuration «cellule entière» est utilisée (Figure 52). Elle permet d'enregistrer l'ensemble des courants de la cellule. Elle consiste à poser la pointe d'une pipette en verre, dont l'extrémité a un diamètre d'environ 1  $\mu\text{m}$ , 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 aspiré à l'aide d'une seringue. Après avoir percé la cellule, la résistance entre le milieu intra-pipette et le milieu intracellulaire va diminuer, 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).

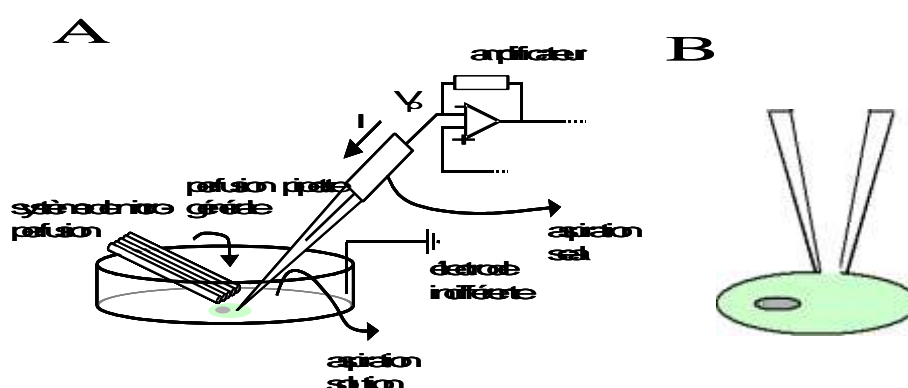


Figure 52 – Schéma d'une installation de patch clamp (A) et de la configuration cellule entière (B)

### II.2.1 Solutions

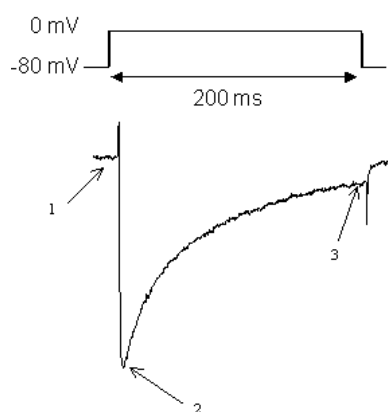
Les cellules transfectées sont immergées dans une solution Tyrode (en mM : NaCl 145, KCl 4, HEPES 5,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  1, glucose 5, pH 7.4 à l'aide du NaOH) renouvelée constamment par un système de perfusion générale et d'aspiration (Figure 52A). Cette solution contient les ions du milieu extra-cellulaire physiologique des cellules.

Pour l'enregistrement des courants calciques, les cellules transfectées sont repérées à l'aide de billes couplées à des anticorps anti-CD8. La cellule sélectionnée est baignée dans une solution extracellulaire (en mM : NaCl 135, TEACl 20, HEPES 10,  $\text{MgCl}_2$  1, mannitol 20, pH 7.3 à l'aide du NaOH) calcique (en mM :  $\text{CaCl}_2$  2) ou barium (en mM :  $\text{BaCl}_2$  5). Le système de micro-perfusion, placé au-dessus de la cellule à analyser permet d'apporter ces solutions sans modifier le milieu dans lequel se trouvent les autres cellules.

Le potassium du milieu intracellulaire est substitué par du césium dans le milieu pipette pour supprimer les courants potassiques endogènes (en mM : CsCl 130 , HEPES 10, EGTA 10, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, MgATP 4, TrisGTP 0.3, pH à 7,2 à l'aide du CsCl).

## II.2.2 Mesures de l'amplitude et des cinétiques du courant I<sub>Ca,L</sub>

Après avoir percé la membrane, les résistances "série" et le courant capacitif sont compensés à l'aide de l'amplificateur (70-80%). Le courant I<sub>Ca,L</sub> s'active rapidement après une dépolarisation de la membrane. La séquence de stimulation comprend une phase de dépolarisation à 0 mV, d'une durée de 200 ms (Figure 53), activant le courant. Sont mesurées l'amplitude du courant à -80 mV (Figure 53.1), l'amplitude du courant maximum à 0 mV (Figure 53.2) et l'amplitude du courant à 200 ms de dépolarisation à 0 mV (Figure 53.3). Les courants enregistrés par l'ordinateur sont ultérieurement analysés à l'aide du logiciel Acquis-1.

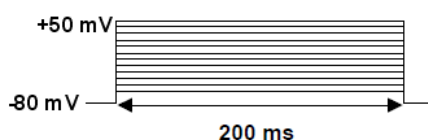


**Figure 53 – Séquence de stimulation et courant résultant**

(1) amplitude du courant à -80 mV ; (2) amplitude du courant maximum à 0 mV; (3) amplitude du courant à 200 ms de dépolarisation à 0 mV.

## II.2.3 Courbe d'activation

La sensibilité au potentiel du courant est évaluée en utilisant le protocole suivant : une phase de dépolarisation à potentiel variable, ou pulse (de -60 mV à +50 mV avec un incrément de 10 mV ; Fréquence de stimulation : 1/7 Hz) est imposée (Figure 54). Ce pulse permet d'obtenir la courbe d'activation du canal, qui représente la proportion de canaux activés en fonction du potentiel du pulse. Cette courbe d'activation permet de déterminer le potentiel auquel 50% des canaux activables sont activés ( $V_{1/2}$  d'activation). Entre deux séquences, le potentiel est maintenu à -80 mV. La durée du pulse est de 200 ms.



**Figure 54 – Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'activation**

La courbe d'activation (conductance relative en fonction du potentiel) suit une sigmoïde. Les paramètres  $V_{1/2}$  d'activation et  $k$  sont calculés par régression non-linéaire de la courbe d'activation selon la fonction de Boltzman :

$$G/G_{\max} = 1 / (1 + \exp(-(V_p - V_{1/2} \text{ d'activation})/k)) \text{ où } G_{(\text{au potentiel imposé})} = I / E_m - E_{Ca}$$

Avec  $k$ , constante de Boltzman ;  $V_p$ , potentiel du pulse ;  $G$ , conductance mesurée au potentiel imposé ;  $I$ , courant mesuré ;  $E_m$ , potentiel imposé ;  $E_{Ca}$ , potentiel d'inversion.

## II.2.4 Courbe d'inactivation

La disponibilité des canaux en fonction du potentiel est évaluée en utilisant le protocole suivant : une phase de dépolarisation à potentiel variable, ou prépulse (de  $-60$  mV à  $+20$  mV avec un incrément de  $5$  mV ; Fréquence de stimulation :  $1/7$  Hz) est suivie d'une deuxième phase de dépolarisation à  $0$  mV ou pulse (Figure 55). Ce pulse permet d'obtenir la courbe de disponibilité du canal, qui représente la proportion de canaux disponibles en fonction du potentiel du prépulse. Cette courbe de disponibilité permet de déterminer le potentiel auquel 50% des canaux sont inactivés ( $V_{1/2}$  d'inactivation). Entre deux séquences, le potentiel est maintenu à  $-80$  mV. La durée du prépulse est de  $500$  ms et celle du pulse de  $200$  ms.

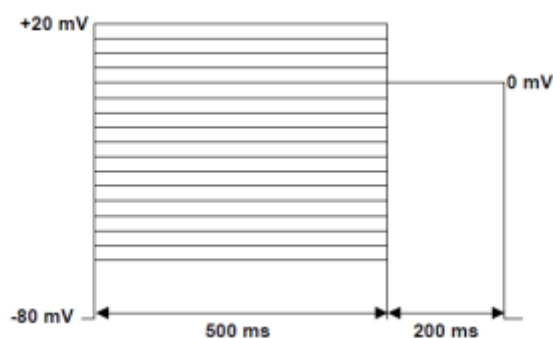


Figure 55 – Protocole de stimulation permettant l'estimation de l'inactivation

La courbe de disponibilité (courant relatif en fonction du potentiel du prépulse) suit une sigmoïde. 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 :

$$I/I_{\max} = 1 / (1 + \exp(-(V_p - V_{1/2} \text{ d'inactivation})/k))$$

Avec  $k$ , constante de Boltzman ;  $V_p$ , potentiel du prépulse.

## II.2.5 Statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type de la moyenne. Les différences sont statistiquement testées en utilisant le test de Mann-Whitney (comparaison d'un paramètre dans 2 conditions). Une valeur de  $P < 0.05$  est considérée comme significative.

### II.3 Western blot

La technique de Western blot est utilisée afin d'estimer le taux d'expression totale de la protéine Ca<sub>v</sub>1.2 dans les cellules HEK tsA-201. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont lysées dans un tampon contenant du NaCl à 150mM, du tris pH 7.2 à 20mM, de l'EDTA à 1mM, du triton 1X, du PMSF à 1mM repris dans l'éthanol absolu ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche diagnostics). Les lysats cellulaires sont mis en rotation pendant 20 min à 4°C puis centrifugés à 14 000 G, 20 min à 4°C également. Un dosage protéique est ensuite effectué contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) afin de charger une quantité de protéines similaire dans chaque puits. Puis les lysats sont dénaturés 30 min à température ambiante dans un tampon LAEMMLI contenant : 2% de SDS, 10% de glycérol, 10mM de DTT, 65mM de tris à pH 6.8 et une pointe de bleu de bromophénol. 25µg de chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrilamide 10% et les protéines sont séparées par électrophorèse en présence de SDS. Après environ 1h30 de migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 3h30 à 150mA dans un tampon contenant : de la glycine à 192mM, du tris à 25mM, du SDS à 0.1% et de l'éthanol à 20%. Afin de vérifier la qualité de la migration et du transfert, les protéines sont colorées avec du rouge ponceau. Après rinçage, la membrane est saturée pendant une heure dans un tampon TBS-T (tris 10mM, NaCl 0.5mM et tween 0.1%) contenant 5% de lait lyophilisé. Puis la membrane est incubée en présence de l'anticorps dirigé contre le tag HA (Roche, fait chez le rat, 100µg/mL) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> pendant toute une nuit à 4°C dans du TBS-T lait. De la même façon que pour Ca<sub>v</sub>1.2, l'expression de la protéine β-tubuline a été évaluée en utilisant l'anticorps anti β-tubuline (Santa Cruz, fait chez le lapin) dilué au 1/1000<sup>ème</sup>. Trois lavages de 5 minutes dans le TBS-T lait sont ensuite effectués puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire anti rat couplé à la HRP (Sigma) dilué au 1/2000<sup>ème</sup>, pendant 2 heures à température ambiante dans le TBS-T lait. Pour révéler la β-tubuline, l'anticorps secondaire utilisé est l'anticorps anti-lapin HRP (Tebu) dilué au 1/5000<sup>ème</sup>, pendant 1 heure à température ambiante dans le TBS-T lait. Après 3 rinçages au TBS-T de 10 minutes chacun, la révélation est effectuée par un kit de détection de chémiluminescence (Western C, biorad) à l'imageur (GE Healthcare).

### II.4 Immunomarquages

Afin d'évaluer le niveau d'expression de protéines Ca<sub>v</sub>1.2 à la membrane, des immunomarquages ont été réalisés. Ces expériences sont effectuées sur des cellules transfectées ensemencées sur des lamelles de verre. Deux types de marquages ont été réalisés : le premier sans perméabilisation préalable des cellules afin de visualiser les

protéines-canal localisées à la membrane plasmique ; le deuxième après perméabilisation des membranes afin de visualiser les protéines-canal localisées dans l'ensemble de la cellule.

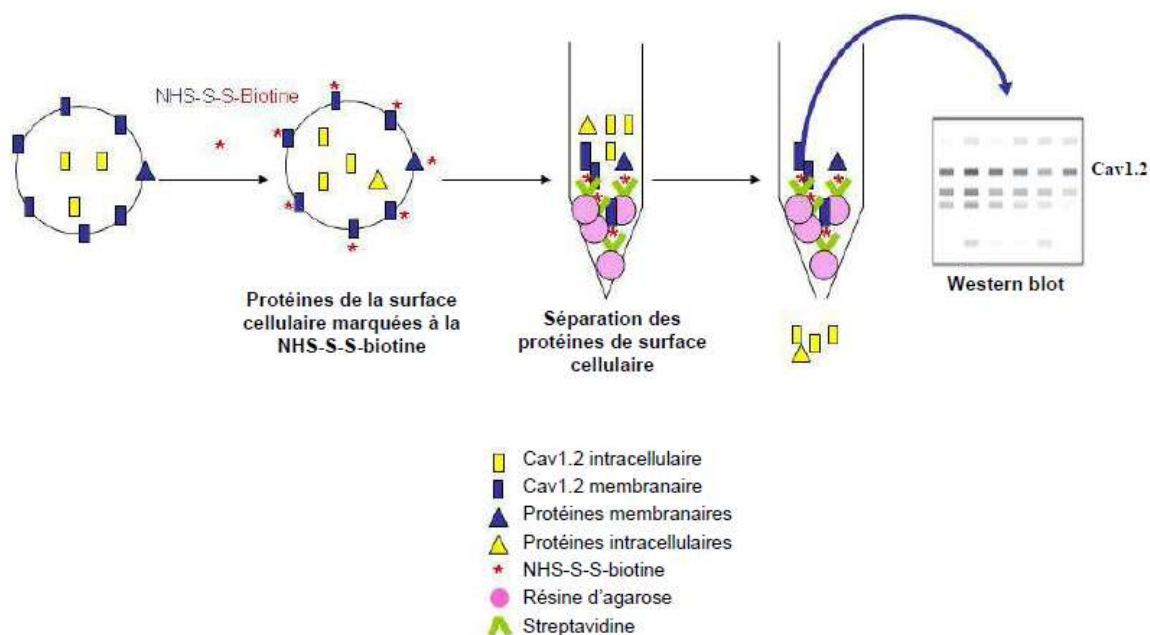
Pour le marquage de surface, les cellules sont incubées avec des anticorps primaires dirigés contre le tag HA extracellulaire (Roche, fait chez le rat, 100µg/mL), à 4°C pendant une heure. Ces anticorps sont dilués au 1/200<sup>ème</sup> dans le PBS-BSA 1%. Après cette incubation, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS contenant du calcium et du magnésium à 1 mM (PBSCM). Puis, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 2 % (Invitrogen™) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire anti-rat couplé à un fluorochrome (Alexa fluor 488, fait chez la chèvre, longueur d'onde d'émission 519 nm) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> pendant 1 heure à température ambiante.

Pour visualiser le canal localisé dans les compartiments intracellulaires, les cellules sont tout d'abord fixées au PAF 2 %, pendant 15 minutes. Ensuite, les cellules sont perméabilisées avec 0.1% de Triton (Sigma®) pendant 15 minutes. Puis, elles sont incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre le tag HA extracellulaire pendant 1 heure à 4°C selon le même protocole que le marquage extracellulaire. Enfin, une incubation d'1 heure à température ambiante est réalisée avec l'anticorps secondaire utilisé pour le marquage de surface.

Les lamelles sont montées sur lame avec le milieu vectashield contenant du DAPI pour marquer les noyaux (Vector). L'acquisition des images est effectuée grâce à un microscope inversé équipé d'épifluorescence (Zeiss Axiover).

## **II.5 Biotinylation des protéines membranaires**

La technique de biotinylation des protéines membranaires est utilisée afin de quantifier l'expression de la protéine Ca<sub>v</sub>1.2 à la membrane de cellules HEK tsA-201 (Figure 56). 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 0,5mg/mL pendant 30 minutes à 4°C sous agitation douce. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS contenant 200mM de glycine, trois fois dix minutes. Puis, les cellules sont lysées, centrifugées et dosées selon le même protocole que le Western blot. 1.5mg 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 biotinyliées 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 lyses contenant 150mM et 500mM de NaCl. Les protéines biotinyliées ainsi précipitées sont dénaturées 30 minutes à température ambiante dans un tampon contenant : 4% de SDS, 20% de glycérol, 200mM de DTT, 145mM de tris pH6.8 et une pointe de bleu de bromophénol.



### Figure 56 – Technique de marquage des protéines de surface

Les protéines de surface sont marquées à la biotine, puis elles sont purifiées par affinité sur une résine d'agarose-streptavidine. Le canal calcique  $Ca_v1.2$  biotinylé est révélé par western blot en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre le tag HA.

La suite de l'expérience (migration, transfert liquide, anticorps et révélation) s'effectue suivant le même protocole que le Western blot. De plus, l'expression du récepteur à la transferrine et de la  $\beta$ -actine a été évaluée en incubant la membrane avec les anticorps anti récepteur à la transferrine (1/500ème, Zymed<sup>®</sup>, fait chez la souris) et anti  $\beta$ -actine (1/1000ème, sigma<sup>®</sup>, fait chez la souris) durant une nuit à 4°C. L'anticorps secondaire anti souris couplé à la HRP (Tebu-bio) a ensuite été utilisé dilué au 1/10 000ème pendant 1 heure à température ambiante.



### III. Annexe 3 : autres projets

#### III.1 Un nouveau locus d'hyperkaliémie familiale

Julien Barc<sup>1</sup>, Vincent Esnault<sup>2</sup>, Geneviève Beaurain<sup>3</sup>, Vincent Probst<sup>1</sup>, Xavier Jeunemaitre<sup>3</sup>, Jean-Jacques Schott<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U533, l'institut du thorax, Nantes

<sup>2</sup>Service de Néphrologie, CHU de Nantes

<sup>3</sup>INSERM U772, Collège de France, Paris

Depuis 1997, 5 loci ont été associés à des hyperkaliémies familiales par des approches de génétique inverse. Jusqu'à présent deux entités cliniques décrivaient une hyper ou une pseudo hyperkaliémie héréditaire à transmission autosomique dominante (i) le syndrome de Gordon, forme rare d'hypertension artérielle associé à une hyperkaliémie prononcée ( $\approx 5,8$  mmol/L) pour lequel 2 gènes ont été identifiés *WNK1* et *WNK4*; (ii) la stomatocytose héréditaire déshydratée pour laquelle 2 loci ont été décrits.

Une enquête familiale nous a récemment permis de recruter une nouvelle grande famille présentant un phénotype différent des 2 syndromes précédents. Elle se compose de 53 membres dont 10 sont atteints et répartis sur 4 générations. L'hyperkaliémie et l'hyperchlorémie sont modérées (respectivement 5,15 et 109 mmol/L en moyenne), le taux d'aldostérone est normal et l'hypertension artérielle absente. Nous avons réalisé une analyse de liaison sur l'ensemble du génome. Un nouveau locus s'étendant sur 70.5 Mb et comptant 518 gènes a été identifié avec un lod score de 4,4 à 0% de recombinaison pour le marqueur D5S1975 dans la région 5q14-5q33. Le séquençage direct des régions codantes de 3 gènes candidats : *SLC4A9*, *ALDH7A1* et *SLC12A2* n'a pas révélé de variant associé à la pathologie. Ce dernier a également fait l'objet d'une recherche de grands réarrangements. En effet *SLC12A2* est un cotransporteur  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{Cl}^-$ , exprimé principalement dans le rein et appartenant à la même famille que les cotransporteurs impliqués dans les hypokaliémies héréditaires. Parallèlement une collaboration avec une équipe de l'INSERM U772 nous a permis de réduire l'intervalle à 14 Mb soit 206 gènes par l'addition de deux familles plus restreintes. Le Lod score total est alors de 6,3 à 0% de recombinaison pour le marqueur D5S436.

Ce travail a permis de décrire un nouveau locus pour une nouvelle forme d'hyperkaliémie familiale pouvant conduire à l'identification d'une nouvelle voie de la régulation de la kaliémie.

### III.2 Mutation of cardiac Na<sub>v</sub>1.5 in a novel autosomal dominant cardiac arrhythmia of hisian type and associated with dilated cardiomyopathy

MY Amarouch<sup>1, 2\*</sup>, S.Saal<sup>4\*</sup>, G. Bertaux<sup>5\*</sup>, L. Faivre<sup>4</sup>, S. Falcon-Eicher<sup>5</sup>, E.Baron<sup>1,2</sup>, C. Thauvin-Robinet<sup>6</sup>, J.Barc<sup>1,2</sup>, Olivier Barthez<sup>5</sup>, J. Mérot<sup>1,2</sup>, P. Charron<sup>3</sup>, P. Richard<sup>3</sup>, V.Probst<sup>1,2,3</sup>, C. De Chillou<sup>6</sup>, I.Baró<sup>1,2</sup>, JJ. Schott<sup>1,2,3</sup>, JE. Wolf<sup>5</sup>, F. Kyndt<sup>1,2,3</sup> #, G. Loussouarn<sup>1,2#</sup>, G. Laurent<sup>5#</sup>.

<sup>1</sup>INSERM UMR915 - l'institut du thorax, Nantes, France. <sup>2</sup>CNRS, ERL3147, Nantes, France. <sup>3</sup>CHU Nantes, France. <sup>4</sup>Centre de Génétique, Hôpital d'Enfant, CHU Dijon, France, <sup>5</sup>Service de cardiologie, hôpital le Bocage, CHU Dijon, France, <sup>6</sup>Centre de référence maladies cardiaques héréditaires, groupe La Pitié Salpêtrière, France.

We report a novel autosomal dominant cardiac arrhythmia resulting in frequent premature ventricular contractions, non sustained ventricular tachycardia and dilated cardiomyopathy. Arrhythmia mechanisms involved ectopic foci originating from the proximal part of the His-Purkinje system. Familial investigations revealed 3 affected males and 4 affected females in three generations with an age, at diagnosis, from 10 to 37 years. The main symptomatology included palpitations, heart failure, syncope in 2 patients and sudden death in a male at age 29 during rest and a 4-month old child. A dilated cardiomyopathy was diagnosed in 3 females and was considered as a complication of cardiac arrhythmia since it did not appear to have pre-existed to cardiac arrhythmia. Using a candidate-gene strategy, we detected a variant in the *SCN5A* gene encoding the  $\alpha$  subunit of the cardiac voltage-gated Na<sup>+</sup> channel (Na<sub>v</sub>1.5), leading to the substitution of a mammalian highly conserved residue, R222Q.

To evaluate the incidence of this substitution on Na<sub>v</sub>1.5 function, human  $\alpha$  and  $\beta$ 1 subunits were expressed in COS-7 cells and whole-cell patch-clamp experiments were performed. R222Q mutation induced a negative shift of the voltage dependence of the current activation ( $V_{1/2act}$ : -30.6±2.3 mV, n=9, versus -42.3±1.1 mV, n=11, p<0.001; slope: 5.7±0.3 mV versus 6.5±0.4mV, for WT and mutant channels, respectively) and of its inactivation ( $V_{1/2inact}$ : -79.58±0.77 mV, n=10, versus -84.6±0.73 mV, n=8, p<0,001; slope: -5.58±0.18 mV versus -4.79±0.17mV, p<0.01 for WT and mutant channels, respectively) with no modification of the current amplitude. To mimic the heterozygous state in the affected patients, we studied the Na<sup>+</sup> current in cells expressing WT plus mutant channels. The voltage dependence of the current activation was less pronounced in these conditions. We are currently investigating recovery from inactivation in the heterozygous state and we will perform computer simulations to link these modifications to the observed phenotype.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Aarnoudse, A. J., Newton-Cheh, C., de Bakker, P. I., Straus, S. M., Kors, J. A., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Witteman, J. C., and Stricker, B. H. (2007) Common NOS1AP variants are associated with a prolonged QTc interval in the Rotterdam Study. *Circulation* 116, 10-16.
- Abbott, G. W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., and Goldstein, S. A. (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 97, 175-187.
- Adams, R. J., Cohen, D. W., Gupte, S., Johnson, J. D., Wallick, E. T., Wang, T., and Schwartz, A. (1979) In vitro effects of palmitoylcarnitine on cardiac plasma membrane Na,K-ATPase, and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup> transport. *J Biol Chem* 254, 12404-12410.
- Ahmad, F., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (2005) The genetic basis for cardiac remodeling. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 185-216.
- Akai, J., Makita, N., Sakurada, H., Shirai, N., Ueda, K., Kitabatake, A., Nakazawa, K., Kimura, A., and Hiraoka, M. (2000) A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett* 479, 29-34.
- Amat di San, F. C., Taylor, M. R., Mestroni, L., Botto, L. D., and Longo, N. (2008) Cardiomyopathy and carnitine deficiency. *Mol Genet Metab* 94, 162-166.
- Amberger, J., Bocchini, C. A., Scott, A. F., and Hamosh, A. (2009) McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Nucleic Acids Res* 37, D793-D796.
- Anttonen, O., Junttila, M. J., Rissanen, H., Reunanen, A., Viitasalo, M., and Huikuri, H. V. (2007) Prevalence and prognostic significance of short QT interval in a middle-aged Finnish population. *Circulation* 116, 714-720.
- Antzelevitch, C. (2001a) Basic mechanisms of reentrant arrhythmias. *Curr Opin Cardiol* 16, 1-7.
- Antzelevitch, C. (2001b) The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12, 268-272.
- 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., and Wilde, A. (2005a) Brugada syndrome: report of the second consensus conference. *Heart Rhythm* 2, 429-440.
- Antzelevitch, C., Brugada, P., Brugada, J., and Brugada, R. (2005b) Brugada syndrome: from cell to bedside. *Curr Probl Cardiol* 30, 9-54.
- Antzelevitch, C. and Fish, J. M. (2006) Therapy for the Brugada syndrome. *Handb Exp Pharmacol* 305-330.
- 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., Jr., Burashnikov, E., Wu, Y., Sargent, J. D., Schickel, S., Oberheiden, R., Bhatia, A., Hsu, L. F., Haissaguerre, M., Schimpf, R., Borggrefe, M., and 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.
- Ardlie, K. G., Kruglyak, L., and Seielstad, M. (2002) Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 3, 299-309.
- Arking, D. E., Khera, A., Xing, C., Kao, W. H., Post, W., Boerwinkle, E., and Chakravarti, A. (2009) Multiple independent genetic factors at NOS1AP modulate the QT interval in a multi-ethnic population. *PLoS ONE* 4, e4333.
- Arking, D. E., Pfeufer, A., Post, W., Kao, W. H., Newton-Cheh, C., Ikeda, M., West, K., Kashuk, C., Akyol, M., Perz, S., Jalilzadeh, S., Illig, T., Gieger, C., Guo, C. Y., Larson, M. G., Wichmann, H. E., Marban, E.,

- O'Donnell, C. J., Hirschhorn, J. N., Kaab, S., Spooner, P. M., Meitinger, T., and Chakravarti, A. (2006) A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nat Genet* 38, 644-651.
- Ayerza, M. R., DE Zutter, M., Goethals, M., Wellens, F., Geelen, P., and Brugada, P. (2002) Heart transplantation as last resort against Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13, 943-944.
- Bangalore, R., Mehrke, G., Gingrich, K., Hofmann, F., and Kass, R. S. (1996) Influence of L-type Ca channel alpha 2/delta-subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am J Physiol* 270, H1521-H1528.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996) K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384, 78-80.
- Beales, P. L., Katsanis, N., Lewis, R. A., Ansley, S. J., Elcioglu, N., Raza, J., Woods, M. O., Green, J. S., Parfrey, P. S., Davidson, W. S., and Lupski, J. R. (2001) Genetic and mutational analyses of a large multiethnic Bardet-Biedl cohort reveal a minor involvement of BBS6 and delineate the critical intervals of other loci. *Am J Hum Genet* 68, 606-616.
- Belhassen, B., Glick, A., and Viskin, S. (2004) Efficacy of quinidine in high-risk patients with Brugada syndrome. *Circulation* 110, 1731-1737.
- Belhassen, B., Glick, A., and Viskin, S. (2009) Excellent long-term reproducibility of the electrophysiologic efficacy of quinidine in patients with idiopathic ventricular fibrillation and Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 32, 294-301.
- Belloq, C., van Ginneken, A. C., Bezzina, C. R., Alders, M., Escande, D., Mannens, M. M., Baro, I., and Wilde, A. A. (2004) Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 109, 2394-2397.
- Benhorin, J., Taub, R., Goldmit, M., Kerem, B., Kass, R. S., Windman, I., and Medina, A. (2000) Effects of flecainide in patients with new SCN5A mutation: mutation-specific therapy for long-QT syndrome? *Circulation* 101, 1698-1706.
- Benito, B., Sarkozy, A., Mont, L., Henkens, S., Berruezo, A., Tamborero, D., Arzamendi, D., Berne, P., Brugada, R., Brugada, P., and Brugada, J. (2008) Gender differences in clinical manifestations of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 52, 1567-1573.
- Benson, D. W., Wang, D. W., Dymont, M., Knilans, T. K., Fish, F. A., Strieper, M. J., Rhodes, T. H., and 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.
- Bernal, O. and Moro, C. (2006) [Cardiac arrhythmias in women]. *Rev Esp Cardiol* 59, 609-618.
- Bezzina, C., Veldkamp, M. W., van den Berg, M. P., Postma, A. V., Rook, M. B., Viersma, J. W., van Langen, I. M., Tan-Sindhunata, G., Bink-Boelkens, M. T., Der Hout, A. H., Mannens, M. M., and Wilde, A. A. (1999) A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res* 85, 1206-1213.
- Bezzina, C. R., Rook, M. B., and Wilde, A. A. (2001) Cardiac sodium channel and inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 49, 257-271.
- Bezzina, C. R., Shimizu, W., Yang, P., Koopmann, T. T., Tanck, M. W., Miyamoto, Y., Kamakura, S., Roden, D. M., and Wilde, A. A. (2006) Common sodium channel promoter haplotype in asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation* 113, 338-344.
- Bezzina, C. R., Verkerk, A. O., Busjahn, A., Jeron, A., Erdmann, J., Koopmann, T. T., Bhuiyan, Z. A., Wilders, R., Mannens, M. M., Tan, H. L., Luft, F. C., Schunkert, H., and Wilde, A. A. (2003) A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovasc Res* 59, 27-36.

- Bisgaard, A. M., Rackauskaite, G., Thelle, T., Kirchhoff, M., and Bryndorf, T. (2006) Twins with mental retardation and an interstitial deletion 7q34q36.2 leading to the diagnosis of long QT syndrome. *Am J Med Genet A* 140, 644-648.
- Bittles, A. (2001) Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clin Genet* 60, 89-98.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32, 314-331.
- Boyett, M. R., Harrison, S. M., Janvier, N. C., McMorn, S. O., Owen, J. M., and Shui, Z. (1996) A list of vertebrate cardiac ionic currents nomenclature, properties, function and cloned equivalents. *Cardiovasc Res* 32, 455-481.
- Brugada, J., Brugada, R., Antzelevitch, C., Towbin, J., Nademanee, K., and Brugada, P. (2002) Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation* 105, 73-78.
- Brugada, P. and 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., Mont, L., Rivero, M., Geelen, P., and Brugada, J. (2003) Natural history of Brugada syndrome: the prognostic value of programmed electrical stimulation of the heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 455-457.
- Brugada, R., Brugada, J., Antzelevitch, C., Kirsch, G. E., Potenza, D., Towbin, J. A., and Brugada, P. (2000) Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 101, 510-515.
- Brugada, R., Hong, K., Cordeiro, J. M., and Dumaine, R. (2005) Short QT syndrome. *CMAJ* 173, 1349-1354.
- Brugada, R., Hong, K., Dumaine, R., Cordeiro, J., Gaita, F., Borggrefe, M., Menendez, T. M., Brugada, J., Pollevick, G. D., Wolpert, C., Burashnikov, E., Matsuo, K., Wu, Y. S., Guerchicoff, A., Bianchi, F., Giustetto, C., Schimpf, R., Brugada, P., and Antzelevitch, C. (2004) Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 109, 30-35.
- Buetow, K. H., Weber, J. L., Ludwigsen, S., Scherpbier-Heddema, T., Duyk, G. M., Sheffield, V. C., Wang, Z., and Murray, J. C. (1994) Integrated human genome-wide maps constructed using the CEPH reference panel. *Nat Genet* 6, 391-393.
- Calkins, H. (2006) Arrhythmogenic right-ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 21, 55-63.
- Carter, N., Snieder, H., Jeffery, S., Saumarez, R., Varma, C., Antoniadis, L., and Spector, T. D. (2000) QT interval in twins. *J Hum Hypertens* 14, 389-390.
- Casilli, F., Di Rocco, Z. C., Gad, S., Tournier, I., Stoppa-Lyonnet, D., Frebourg, T., and Tosi, M. (2002) Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat* 20, 218-226.
- Chen, L., Marquardt, M. L., Tester, D. J., Sampson, K. J., Ackerman, M. J., and Kass, R. S. (2007) Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20990-20995.
- 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., and Wang, Q. (1998) Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392, 293-296.

- Chinushi, M., Iijima, K., Tagawa, M., Komura, S., Furushima, H., and Aizawa, Y. (2009) Effects of verapamil on anterior ST segment and ventricular fibrillation cycle length in patients with Brugada syndrome. *J Electrocardiol*.
- Clancy, C. E. and Rudy, Y. (2002) Na(+) channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation* 105, 1208-1213.
- Cohen, J. C., Kiss, R. S., Pertsemlidis, A., Marcel, Y. L., McPherson, R., and Hobbs, H. H. (2004) Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 305, 869-872.
- Cordeiro, J. M., Marieb, M., Pfeiffer, R., Calloe, K., Burashnikov, E., and Antzelevitch, C. (2009) Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 46, 695-703.
- Coronel, R., Casini, S., Koopmann, T. T., Wilms-Schopman, F. J., Verkerk, A. O., de Groot, J. R., Bhuiyan, Z., Bezzina, C. R., Veldkamp, M. W., Linnenbank, A. C., van der Wal, A. C., Tan, H. L., Brugada, P., Wilde, A. A., and de Bakker, J. M. (2005) Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation* 112, 2769-2777.
- Corrado, D., Basso, C., Buja, G., Nava, A., Rossi, L., and Thiene, G. (2001) Right bundle branch block, right precordial ST-segment elevation, and sudden death in young people. *Circulation* 103, 710-717.
- Corrado, D., Basso, C., and Thiene, G. (2009) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update. *Heart* 95, 766-773.
- Crotti, L., Lewandowska, M. A., Schwartz, P. J., Insolia, R., Pedrazzini, M., Bussani, E., Dagradi, F., George, A. L., Jr., and Pagani, F. (2009) A KCNH2 branch point mutation causing aberrant splicing contributes to an explanation of genotype-negative long QT syndrome. *Heart Rhythm* 6, 212-218.
- Cunha, S. R., Bhasin, N., and Mohler, P. J. (2007) Targeting and stability of Na/Ca exchanger 1 in cardiomyocytes requires direct interaction with the membrane adaptor ankyrin-B. *J Biol Chem* 282, 4875-4883.
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., and Keating, M. T. (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795-803.
- Dalageorgou, C., Ge, D., Jamshidi, Y., Nolte, I. M., Riese, H., Savelieva, I., Carter, N. D., Spector, T. D., and Snieder, H. (2008) Heritability of QT interval: how much is explained by genes for resting heart rate? *J Cardiovasc Electrophysiol* 19, 386-391.
- Delpon, E., Cordeiro, J. M., Nunez, L., Thomsen, P. E., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., Wu, Y., Kanters, J. K., Larsen, C. T., Burashnikov, E., Christiansen, M., and Antzelevitch, C. (2008) Functional Effects of KCNE3 Mutation and its Role in the Development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1, 209-218.
- Di Diego, J. M., Cordeiro, J. M., Goodrow, R. J., Fish, J. M., Zygmunt, A. C., Perez, G. J., Scornik, F. S., and Antzelevitch, C. (2002) Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* 106, 2004-2011.
- Di Diego, J. M., Sun, Z. Q., and Antzelevitch, C. (1996) I(to) and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol* 271, H548-H561.
- Di Grande, A., Tabita, V., Lizzio, M. M., Giuffrida, C., Bellanuova, I., Lisi, M., Le Moli, C., and Amico, S. (2008) Early repolarization syndrome and Brugada syndrome: is there any linkage? *Eur J Intern Med* 19, 236-240.
- Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T. P., Bowden, D. W., Smith, D. R., Lander, E. S., and . (1987) A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51, 319-337.

- Doris, P. A. (2002) Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease: common variant hypothesis. *Hypertension* 39, 323-331.
- Dubowitz, V. (1986) X;autosome translocations in females with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Nature* 322, 291-292.
- Eckardt, L. (2007) Gender differences in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18, 422-424.
- Eckardt, L., Probst, V., Smits, J. P., Bahr, E. S., Wolpert, C., Schimpf, R., Wichter, T., Boisseau, P., Heinecke, A., Breithardt, G., Borggreffe, M., Lemarec, H., Bocker, D., and Wilde, A. A. (2005) Long-term prognosis of individuals with right precordial ST-segment-elevation Brugada syndrome. *Circulation* 111, 257-263.
- Eddy, C. A., MacCormick, J. M., Chung, S. K., Crawford, J. R., Love, D. R., Rees, M. I., Skinner, J. R., and Shelling, A. N. (2008) Identification of large gene deletions and duplications in KCNQ1 and KCNH2 in patients with long QT syndrome. *Heart Rhythm* 5, 1275-1281.
- Eijgelsheim, M., Aarnoudse, A. L., Rivadeneira, F., Kors, J. A., Witteman, J. C., Hofman, A., van Duijn, C. M., Uitterlinden, A. G., and Stricker, B. H. (2009) Identification of a common variant at the NOS1AP locus strongly associated to QT-interval duration. *Hum Mol Genet* 18, 347-357.
- Engert, S., Wappenschmidt, B., Betz, B., Kast, K., Kutsche, M., Hellebrand, H., Goecke, T. O., Kiechle, M., Niederacher, D., Schmutzler, R. K., and Meindl, A. (2008) MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. *Hum Mutat* 29, 948-958.
- Feuk, L., Carson, A. R., and Scherer, S. W. (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7, 85-97.
- Fondazione Salvatore Maugeri. Gene connection for the heart. Available at <http://www.fsm.it/cardmoc/> ( Last modified: June 20th, 2007). 2007.
- Frigo, G., Rampazzo, A., Bauce, B., Pilichou, K., Beffagna, G., Danieli, G. A., Nava, A., and Martini, B. (2007) Homozygous SCN5A mutation in Brugada syndrome with monomorphic ventricular tachycardia and structural heart abnormalities. *Europace* 9, 391-397.
- Frustaci, A., Priori, S. G., Pieroni, M., Chimenti, C., Napolitano, C., Rivolta, I., Sanna, T., Bellocchi, F., and Russo, M. A. (2005) Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation* 112, 3680-3687.
- Furukawa, T. and Kurokawa, J. (2007) Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: implication for the gender difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol Ther* 115, 106-115.
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., and Demolombe, S. (2007) Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 582, 675-693.
- Gabriel, S. B., Salomon, R., Pelet, A., Angrist, M., Amiel, J., Fornage, M., Attie-Bitach, T., Olson, J. M., Hofstra, R., Buys, C., Steffann, J., Munnich, A., Lyonnet, S., and Chakravarti, A. (2002) Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet* 31, 89-93.
- Gaita, F., Giustetto, C., Bianchi, F., Schimpf, R., Haissaguerre, M., Calo, L., Brugada, R., Antzelevitch, C., Borggreffe, M., and Wolpert, C. (2004) Short QT syndrome: pharmacological treatment. *J Am Coll Cardiol* 43, 1494-1499.
- Gallagher, M. M., Forleo, G. B., Behr, E. R., Magliano, G., De Luca, L., Morgia, V., De Liberato, F., and Romeo, F. (2008) Prevalence and significance of Brugada-type ECG in 12,012 apparently healthy European subjects. *Int J Cardiol* 130, 44-48.



- Gavillet, B., Rougier, J. S., Domenighetti, A. A., Behar, R., Boixel, C., Ruchat, P., Lehr, H. A., Pedrazzini, T., and Abriel, H. (2006) Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res* 99, 407-414.
- Gemayel, C., Pelliccia, A., and Thompson, P. D. (2001) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 38, 1773-1781.
- 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., and Zipes, D. P. (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* 5, e1-21.
- Goldenberg, I., Moss, A. J., Bradley, J., Polonsky, S., Peterson, D. R., McNitt, S., Zareba, W., Andrews, M. L., Robinson, J. L., Ackerman, M. J., Benhorin, J., Kaufman, E. S., Locati, E. H., Napolitano, C., Priori, S. G., Qi, M., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., and Zhang, L. (2008) Long-QT syndrome after age 40. *Circulation* 117, 2192-2201.
- Guglieri, M., Magri, F., and Comi, G. P. (2005) Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta* 361, 54-79.
- Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., Sakaguchi, A. Y., and . (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234-238.
- Gussak, I., Brugada, P., Brugada, J., Wright, R. S., Kopecky, S. L., Chaitman, B. R., and Bjerregaard, P. (2000) Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* 94, 99-102.
- Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., Dib, C., Fizames, C., Millasseau, P., Marc, S., Bernardi, G., Lathrop, M., and Weissenbach, J. (1994) The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet* 7, 246-339.
- Haghighi, K., Gregory, K. N., and Kranias, E. G. (2004) Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1214-1222.
- Haissaguerre, M., Derval, N., Sacher, F., Jesel, L., Deisenhofer, I., De Roy, L., Pasquie, 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., and Clementy, 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., and Huang, C. L. (2008) Scn3b knockout mice exhibit abnormal ventricular electrophysiological properties. *Prog Biophys Mol Biol* 98, 251-266.
- Hayashi, T. and Su, T. P. (2001) Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 491-496.
- Hentze, M. W. and Kulozik, A. E. (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 307-310.
- Hill, J. A. (2003) Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med* 13, 316-322.
- 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.,

- and Brugada, R. (2004) Value of electrocardiographic parameters and ajmaline test in the diagnosis of Brugada syndrome caused by SCN5A mutations. *Circulation* 110, 3023-3027.
- Hong, K., Piper, D. R., Diaz-Valdecantos, A., Brugada, J., Oliva, A., Burashnikov, E., Santos-de-Soto, J., Grueso-Montero, J., Diaz-Enfante, E., Brugada, P., Sachse, F., Sanguinetti, M. C., and Brugada, R. (2005) De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc Res* 68, 433-440.
- 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., and Antzelevitch, C. (2007) Novel mutation in the SCN5A gene associated with arrhythmic storm development during acute myocardial infarction. *Heart Rhythm* 4, 1072-1080.
- 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., and 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.
- Huikuri, H. V., Castellanos, A., and Myerburg, R. J. (2001) Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 345, 1473-1482.
- Hutchison, C. A. I. (2007) DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res* 35, 6227-6237.
- Iafate, A. J., Feuk, L., Rivera, M. N., Listewnik, M. L., Donahoe, P. K., Qi, Y., Scherer, S. W., and Lee, C. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36, 949-951.
- Imboden, M., Swan, H., Denjoy, I., van Langen, I. M., Latinen-Forsblom, P. J., Napolitano, C., Fressart, V., Breithardt, G., Berthet, M., Priori, S., Hainque, B., Wilde, A. A., Schulze-Bahr, E., Feingold, J., and Guicheney, P. (2006) Female predominance and transmission distortion in the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 355, 2744-2751.
- James, A. F., Choisy, S. C., and Hancox, J. C. (2007) Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol* 94, 265-319.
- Jervell, A. and LANGE-NIELSEN, F. (1957) Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 54, 59-68.
- Jervell, A. and Lange-Nielsen, F. (1957) Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 54, 59-68.
- Jiang, C., Atkinson, D., Towbin, J. A., Splawski, I., Lehmann, M. H., Li, H., Timothy, K., Taggart, R. T., Schwartz, P. J., Vincent, G. M., and . (1994) Two long QT syndrome loci map to chromosomes 3 and 7 with evidence for further heterogeneity. *Nat Genet* 8, 141-147.
- Jouven, X. and Escande, D. (2006) [Sudden cardiac death: toward the identification of susceptibility genes]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 99, 806-812.
- Kaab, S. and Schulze-Bahr, E. (2005) Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res* 67, 397-413.
- Kajiwara, K., Berson, E. L., and Dryja, T. P. (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264, 1604-1608.
- Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Salisbury, B. A., Carr, J. L., Harris-Kerr, C., Pollevick, G. D., Wilde, A. A., and Ackerman, M. J. (2009) Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 6, 1297-1303.
- Kathiresan, S., Willer, C. J., Peloso, G. M., Demissie, S., Musunuru, K., Schadt, E. E., Kaplan, L., Bennett, D., Li, Y., Tanaka, T., Voight, B. F., Bonnycastle, L. L., Jackson, A. U., Crawford, G., Surti, A., Guiducci,

- C., Burt, N. P., Parish, S., Clarke, R., Zelenika, D., Kubalanza, K. A., Morken, M. A., Scott, L. J., Stringham, H. M., Galan, P., Swift, A. J., Kuusisto, J., Bergman, R. N., Sundvall, J., Laakso, M., Ferrucci, L., Scheet, P., Sanna, S., Uda, M., Yang, Q., Lunetta, K. L., Dupuis, J., de Bakker, P. I., O'Donnell, C. J., Chambers, J. C., Kooner, J. S., Hercberg, S., Meneton, P., Lakatta, E. G., Scuteri, A., Schlessinger, D., Tuomilehto, J., Collins, F. S., Groop, L., Altshuler, D., Collins, R., Lathrop, G. M., Melander, O., Salomaa, V., Peltonen, L., Orho-Melander, M., Ordovas, J. M., Boehnke, M., Abecasis, G. R., Mohlke, K. L., and Cupples, L. A. (2009) Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 41, 56-65.
- Kaufman, E. S., McNitt, S., Moss, A. J., Zareba, W., Robinson, J. L., Hall, W. J., Ackerman, M. J., Benhorin, J., Locati, E. T., Napolitano, C., Priori, S. G., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., and Zhang, L. (2008) Risk of death in the long QT syndrome when a sibling has died. *Heart Rhythm* 5, 831-836.
- Keating, M., Atkinson, D., Dunn, C., Timothy, K., Vincent, G. M., and Leppert, M. (1991) Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene. *Science* 252, 704-706.
- Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J. Y., Sackler, R. S., Haynes, C., Henning, A. K., SanGiovanni, J. P., Mane, S. M., Mayne, S. T., Bracken, M. B., Ferris, F. L., Ott, J., Barnstable, C., and Hoh, J. (2005) Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385-389.
- Knowlton, R. G., Cohen-Haguenaer, O., Van Cong, N., Frezal, J., Brown, V. A., Barker, D., Braman, J. C., Schumm, J. W., Tsui, L. C., Buchwald, M., and . (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318, 380-382.
- Koopmann, T. T., Alders, M., Jongbloed, R. J., Guerrero, S., Mannens, M. M., Wilde, A. A., and Bezzina, C. R. (2006) Long QT syndrome caused by a large duplication in the KCNH2 (HERG) gene undetectable by current polymerase chain reaction-based exon-scanning methodologies. *Heart Rhythm* 3, 52-55.
- Koopmann, T. T., Beekman, L., Alders, M., Meregalli, P. G., Mannens, M. M., Moorman, A. F., Wilde, A. A., and Bezzina, C. R. (2007) Exclusion of multiple candidate genes and large genomic rearrangements in SCN5A in a Dutch Brugada syndrome cohort. *Heart Rhythm* 4, 752-755.
- Lande, G., Kyndt, F., Baro, I., Chabannes, D., Boisseau, P., Pony, J. C., Escande, D., and Le Marec, H. (2001) Dynamic analysis of the QT interval in long QT1 syndrome patients with a normal phenotype. *Eur Heart J* 22, 410-422.
- Lehnart, S. E., Ackerman, M. J., Benson, D. W., Jr., Brugada, R., Clancy, C. E., Donahue, J. K., George, A. L., Jr., Grant, A. O., Groft, S. C., January, C. T., Lathrop, D. A., Lederer, W. J., Makielski, J. C., Mohler, P. J., Moss, A., Nerbonne, J. M., Olson, T. M., Przywara, D. A., Towbin, J. A., Wang, L. H., and Marks, A. R. (2007) Inherited arrhythmias: a National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function. *Circulation* 116, 2325-2345.
- Letsas, K. P., Sacher, F., Probst, V., Weber, R., Knecht, S., Kalusche, D., Haissaguerre, M., and Arentz, T. (2008) Prevalence of early repolarization pattern in inferolateral leads in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 5, 1685-1689.
- Litovsky, S. H. and Antzelevitch, C. (1990) Differences in the electrophysiological response of canine ventricular subendocardium and subepicardium to acetylcholine and isoproterenol. A direct effect of acetylcholine in ventricular myocardium. *Circ Res* 67, 615-627.
- Locati, E. H., Zareba, W., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Vincent, G. M., Lehmann, M. H., Towbin, J. A., Priori, S. G., Napolitano, C., Robinson, J. L., Andrews, M., Timothy, K., and Hall, W. J. (1998) Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International LQTS Registry. *Circulation* 97, 2237-2244.
- 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., and Dudley, S. C., Jr. (2007) Mutation in glycerol-3-phosphate

dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na<sup>+</sup> current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* 116, 2260-2268.

Makita, N. (2009) Phenotypic overlap of cardiac sodium channelopathies. *Circ J* 73, 810-817.

Makita, N., Behr, E., Shimizu, W., Horie, M., Sunami, A., Crotti, L., Schulze-Bahr, E., Fukuhara, S., Mochizuki, N., Makiyama, T., Itoh, H., Christiansen, M., McKeown, P., Miyamoto, K., Kamakura, S., Tsutsui, H., Schwartz, P. J., George, A. L., Jr., and Roden, D. M. (2008) The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest* 118, 2219-2229.

Makita, N., Bennett, P. B., and George, A. L., Jr. (1996) Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels. *J Neurosci* 16, 7117-7127.

Malik, M., Hnatkova, K., Schmidt, A., and Smetana, P. (2008) Accurately measured and properly heart-rate corrected QTc intervals show little daytime variability. *Heart Rhythm* 5, 1424-1431.

Mardis, E. R. (2006) Anticipating the 1,000 dollar genome. *Genome Biol* 7, 112.

Marjamaa, A., Salomaa, V., Newton-Cheh, C., Porthan, K., Reunanen, A., Karanko, H., Jula, A., Lahermo, P., Vaananen, H., Toivonen, L., Swan, H., Viitasalo, M., Nieminen, M. S., Peltonen, L., Oikarinen, L., Palotie, A., and Kontula, K. (2009) High prevalence of four long QT syndrome founder mutations in the Finnish population. *Ann Med* 41, 234-240.

Markiewicz-Loskot, G., Moric-Janiszewska, E., and Mazurek, U. (2009) The risk of cardiac events and genotype-based management of LQTS patients. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 14, 86-92.

Marquez, M. F., Salica, G., Hermosillo, A. G., Pastelin, G., Gomez-Flores, J., Nava, S., and Cardenas, M. (2007) Ionic basis of pharmacological therapy in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18, 234-240.

Matsuo, K., Akahoshi, M., Seto, S., and Yano, K. (2003) Disappearance of the Brugada-type electrocardiogram after surgical castration: a role for testosterone and an explanation for the male preponderance. *Pacing Clin Electrophysiol* 26, 1551-1553.

McNair, W. P., Ku, L., Taylor, M. R., Fain, P. R., Dao, D., Wolfel, E., and Mestroni, L. (2004) SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* 110, 2163-2167.

Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusie-Luna, M. T., Makielski, J. C., and Ackerman, M. J. (2007) SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 134-142.

Meleggh, B., Bene, J., Mogyorosy, G., Havasi, V., Komlosi, K., Pajor, L., Olah, E., Kispal, G., Sumegi, B., and Mehes, K. (2004) Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. *Am J Med Genet A* 131, 121-126.

Meszáros, J. and Pappano, A. J. (1990) Electrophysiological effects of L-palmitoylcarnitine in single ventricular myocytes. *Am J Physiol* 258, H931-H938.

Modell, S. M. and Lehmann, M. H. (2006) The long QT syndrome family of cardiac ion channelopathies: a HuGE review. *Genet Med* 8, 143-155.

Mohler, P. J., Schott, J. J., Gramolini, A. O., Dilly, K. W., Guatimosim, S., duBell, W. H., Song, L. S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M. E., Rogers, T. B., Lederer, W. J., Escande, D., Le Marec, H., and Bennett, V. (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 421, 634-639.

Moric, E., Herbert, E., Trusz-Gluza, M., Filipecki, A., Mazurek, U., and Wilczok, T. (2003) The implications of genetic mutations in the sodium channel gene (SCN5A). *Europace* 5, 325-334.

- Morita, H., Wu, J., and Zipes, D. P. (2008) The QT syndromes: long and short. *Lancet* 372, 750-763.
- Moriya, M., Seto, S., Yano, K., and Akahoshi, M. (2007) Two cases of short QT interval. *Pacing Clin Electrophysiol* 30, 1522-1526.
- Morton, N. E. (2005) Linkage disequilibrium maps and association mapping. *J Clin Invest* 115, 1425-1430.
- Moss, A. J., Shimizu, W., Wilde, A. A., Towbin, J. A., Zareba, W., Robinson, J. L., Qi, M., Vincent, G. M., Ackerman, M. J., Kaufman, E. S., Hofman, N., Seth, R., Kamakura, S., Miyamoto, Y., Goldenberg, I., Andrews, M. L., and McNitt, S. (2007) Clinical aspects of type-1 long-QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene. *Circulation* 115, 2481-2489.
- Moss, A. J., Windle, J. R., Hall, W. J., Zareba, W., Robinson, J. L., McNitt, S., Severski, P., Rosero, S., Daubert, J. P., Qi, M., Cieciorcka, M., and Manalan, A. S. (2005) Safety and efficacy of flecainide in subjects with Long QT-3 syndrome (DeltaKPQ mutation): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 10, 59-66.
- Moss, A. J., Zareba, W., Benhorin, J., Locati, E. H., Hall, W. J., Robinson, J. L., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., and Lehmann, M. H. (1995) ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* 92, 2929-2934.
- Moss, A. J., Zareba, W., Kaufman, E. S., Gattman, E., Peterson, D. R., Benhorin, J., Towbin, J. A., Keating, M. T., Priori, S. G., Schwartz, P. J., Vincent, G. M., Robinson, J. L., Andrews, M. L., Feng, C., Hall, W. J., Medina, A., Zhang, L., and Wang, Z. (2002) Increased risk of arrhythmic events in long-QT syndrome with mutations in the pore region of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *Circulation* 105, 794-799.
- Murray, J. C., Buetow, K. H., Weber, J. L., Ludwigsen, S., Scherpbier-Heddema, T., Manion, F., Quillen, J., Sheffield, V. C., Sunden, S., Duyk, G. M., and . (1994) A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). *Science* 265, 2049-2054.
- Myerburg, R. J. (1997) Sudden cardiac death in persons with normal (or near normal) hearts. *Am J Cardiol* 79, 3-9.
- Naccarelli, G. V. and Antzelevitch, C. (2001) The Brugada syndrome: clinical, genetic, cellular, and molecular abnormalities. *Am J Med* 110, 573-581.
- Napolitano, C., Bloise, R., and Priori, S. G. (2006) Gene-specific therapy for inherited arrhythmogenic diseases. *Pharmacol Ther* 110, 1-13.
- Napolitano, C. and Priori, S. G. (2002) Genetics of ventricular tachycardia. *Curr Opin Cardiol* 17, 222-228.
- Napolitano, C., Priori, S. G., Schwartz, P. J., Bloise, R., Ronchetti, E., Nastoli, J., Bottelli, G., Cerrone, M., and Leonardi, S. (2005) Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 294, 2975-2980.
- Newton-Cheh, C., Eijgelsheim, M., Rice, K. M., de Bakker, P. I., Yin, X., Estrada, K., Bis, J. C., Marciante, K., Rivadeneira, F., Noseworthy, P. A., Sotoodehnia, N., Smith, N. L., Rotter, J. I., Kors, J. A., Witteman, J. C., Hofman, A., Heckbert, S. R., O'Donnell, C. J., Uitterlinden, A. G., Psaty, B. M., Lumley, T., Larson, M. G., and Stricker, B. H. (2009) Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study. *Nat Genet* 41, 399-406.
- Newton-Cheh, C., Larson, M. G., Corey, D. C., Benjamin, E. J., Herbert, A. G., Levy, D., D'Agostino, R. B., and O'Donnell, C. J. (2005) QT interval is a heritable quantitative trait with evidence of linkage to chromosome 3 in a genome-wide linkage analysis: The Framingham Heart Study. *Heart Rhythm* 2, 277-284.
- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., and Guicheney, P. (1997) A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* 15, 186-189.

NIH/CEPH Collaborative Mapping Group (1992) A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science* 258, 67-86.

Olson, T. M., Michels, V. V., Ballew, J. D., Reyna, S. P., Karst, M. L., Herron, K. J., Horton, S. C., Rodeheffer, R. J., and Anderson, J. L. (2005) Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA* 293, 447-454.

Ou, Y., Strege, P., Miller, S. M., Makielski, J., Ackerman, M., Gibbons, S. J., and Farrugia, G. (2003) Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem* 278, 1915-1923.

Passman, R. and Kadish, A. (2007) Sudden death prevention with implantable devices. *Circulation* 116, 561-571.

Pennisi, D. J., Rentschler, S., Gourdie, R. G., Fishman, G. I., and Mikawa, T. (2002) Induction and patterning of the cardiac conduction system. *Int J Dev Biol* 46, 765-775.

Pfeufer, A., Sanna, S., Arking, D. E., Muller, M., Gateva, V., Fuchsberger, C., Ehret, G. B., Orru, M., Pattaro, C., Kottgen, A., Perz, S., Usala, G., Barbalic, M., Li, M., Putz, B., Scuteri, A., Prineas, R. J., Sinner, M. F., Gieger, C., Najjar, S. S., Kao, W. H., Muhleisen, T. W., Dei, M., Happel, C., Mohlenkamp, S., Crisponi, L., Erbel, R., Jockel, K. H., Naitza, S., Steinbeck, G., Marroni, F., Hicks, A. A., Lakatta, E., Muller-Mysok, B., Pramstaller, P. P., Wichmann, H. E., Schlessinger, D., Boerwinkle, E., Meitinger, T., Uda, M., Coresh, J., Kaab, S., Abecasis, G. R., and Chakravarti, A. (2009) Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study. *Nat Genet* 41, 407-414.

Plaster, N. M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canun, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M. R., Iannaccone, S. T., Brunt, E., Barohn, R., Clark, J., Deymeer, F., George, A. L., Jr., Fish, F. A., Hahn, A., Nitu, A., Ozdemir, C., Serdaroglu, P., Subramony, S. H., Wolfe, G., Fu, Y. H., and Ptacek, L. J. (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 105, 511-519.

Pond, A. L. and Nerbonne, J. M. (2001) ERG proteins and functional cardiac I(Kr) channels in rat, mouse, and human heart. *Trends Cardiovasc Med* 11, 286-294.

Post, W., Shen, H., Damcott, C., Arking, D. E., Kao, W. H., Sack, P. A., Ryan, K. A., Chakravarti, A., Mitchell, B. D., and Shuldiner, A. R. (2007) Associations between genetic variants in the NOS1AP (CAPON) gene and cardiac repolarization in the old order Amish. *Hum Hered* 64, 214-219.

Postema, P., Wolpert, C., Amin, A. S., Probst, V., Borggrefe, M., Roden, D., Priori, S., Tan, H. L., Hiraoka, M., and Wilde, A. A. (2009) Drugs and Brugada syndrome patients: review of the literature, recommendations, and an up-to-date website ([www.brugadadrugs.org](http://www.brugadadrugs.org)). *Heart Rhythm* 6, 1335-1341.

Potet, F., Mabo, P., Le Coq, G., Probst, V., Schott, J. J., Airaud, F., Guihard, G., Daubert, J. C., Escande, D., and Le Marec, H. (2003) Novel brugada SCN5A mutation leading to ST segment elevation in the inferior or the right precordial leads. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 200-203.

Pourrier, M. and Nattel, S. (2004) [Anchoring proteins and cardiac sudden death: how and why?]. *Med Sci (Paris)* 20, 437-441.

Priori, S. G., Aliot, E., Blomstrom-Lundqvist, C., Bossaert, L., Breithardt, G., Brugada, P., Camm, A. J., Cappato, R., Cobbe, S. M., Di Mario, C., Maron, B. J., McKenna, W. J., Pedersen, A. K., Ravens, U., Schwartz, P. J., Trusz-Gluzza, M., Vardas, P., Wellens, H. J., and Zipes, D. P. (2001) Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 22, 1374-1450.

Priori, S. G., Napolitano, C., Gasparini, M., Pappone, C., Della, B. P., Brignole, M., Giordano, U., Giovannini, T., Menozzi, C., Bloise, R., Crotti, L., Terreni, L., and Schwartz, P. J. (2000a) Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: A prospective evaluation of 52 families. *Circulation* 102, 2509-2515.

- Priori, S. G., Napolitano, C., Gasparini, M., Pappone, C., Della, B. P., Giordano, U., Bloise, R., Giustetto, C., De Nardis, R., Grillo, M., Ronchetti, E., Faggiano, G., and Nastoli, J. (2002) Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation* 105, 1342-1347.
- Priori, S. G., Napolitano, C., and Schwartz, P. J. (1999) Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation* 99, 529-533.
- Priori, S. G., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Bloise, R., Crotti, L., and Ronchetti, E. (2000b) The elusive link between LQT3 and Brugada syndrome: the role of flecainide challenge. *Circulation* 102, 945-947.
- Priori, S. G., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Grillo, M., Bloise, R., Ronchetti, E., Moncalvo, C., Tulipani, C., Veia, A., Bottelli, G., and Nastoli, J. (2004) Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *JAMA* 292, 1341-1344.
- Priori, S. G., Pandit, S. V., Rivolta, I., Berenfeld, O., Ronchetti, E., Dhamoon, A., Napolitano, C., Anumonwo, J., di Barletta, M. R., Gudapakkam, S., Bosi, G., Stramba-Badiale, M., and Jalife, J. (2005) A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 96, 800-807.
- Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bloise, R., Ronchetti, E., Grillo, M., Vicentini, A., Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., Folli, R., and Cappelletti, D. (2003) Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 348, 1866-1874.
- 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., and 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.
- Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., Sullivan, P. F., and Sklar, P. (2009) Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460, 748-752.
- Rahbeeni, Z., Vaz, F. M., Al Hussein, K., Bucknall, M. P., Ruiter, J., Wanders, R. J., and Rashed, M. S. (2002) Identification of two novel mutations in OCTN2 from two Saudi patients with systemic carnitine deficiency. *J Inherit Metab Dis* 25, 363-369.
- Raitakari, O. T., Blom-Nyholm, J., Koskinen, T. A., Kahonen, M., Viikari, J. S., and Lehtimäki, T. (2009) Common variation in NOS1AP and KCNH2 genes and QT interval duration in young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Ann Med* 41, 144-151.
- Rautaharju, P. M., Zhou, S. H., Wong, S., Calhoun, H. P., Berenson, G. S., Prineas, R., and Davignon, A. (1992) Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age. *Can J Cardiol* 8, 690-695.
- Ravens, U. and Wettwer, E. (1998) Electrophysiological aspects of changes in heart rate. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1, 60-65.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., Fiegler, H., Shaperro, M. H., Carson, A. R., Chen, W., Cho, E. K., Dallaire, S., Freeman, J. L., Gonzalez, J. R., Gratacos, M., Huang, J., Kalaitzopoulos, D., Komura, D., MacDonald, J. R., Marshall, C. R., Mei, R., Montgomery, L., Nishimura, K., Okamura, K., Shen, F., Somerville, M. J., Tchinda, J., Valsesia, A., Woodwark, C., Yang, F., Zhang, J., Zerjal, T., Zhang, J., Armengol, L., Conrad, D. F., Estivill, X., Tyler-Smith, C., Carter, N. P., Aburatani, H., Lee, C., Jones, K. W., Scherer, S. W., and Hurles, M. E. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 444-454.
- Remme, C. A., Verkerk, A. O., Nuyens, D., van Ginneken, A. C., van Brunschot, S., Belterman, C. N., Wilders, R., van Roon, M. A., Tan, H. L., Wilde, A. A., Carmeliet, P., de Bakker, J. M., Veldkamp, M. W., and 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.

- Risch, N. and Merikangas, K. (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273, 1516-1517.
- Rivera, A., Fisher, S. A., Fritsche, L. G., Keilhauer, C. N., Lichtner, P., Meitinger, T., and Weber, B. H. (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.
- Roberts, R. and Brugada, R. (2003) Genetics and arrhythmias. *Annu Rev Med* 54, 257-267.
- Roden, D. M. (1998) Taking the "idio" out of "idiosyncratic": predicting torsades de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol* 21, 1029-1034.
- Roden, D. M. (2008b) Clinical practice. Long-QT syndrome. *N Engl J Med* 358, 169-176.
- Roden, D. M. (2008a) Clinical practice. Long-QT syndrome. *N Engl J Med* 358, 169-176.
- Roden, D. M. and Viswanathan, P. C. (2005) Genetics of acquired long QT syndrome. *J Clin Invest* 115, 2025-2032.
- Romano, C., Gemme, G., and Pongiglione, R. (1963) [Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age. II. Syncopal attacks due to paroxysmal ventricular fibrillation]. *Clin Pediatr (Bologna)* 45, 656-683.
- Rosso, R., Kogan, E., Belhassen, B., Rozovski, U., Scheinman, M. M., Zeltser, D., Halkin, A., Steinvil, A., Heller, K., Glikson, M., Katz, A., and Viskin, S. (2008) J-point elevation in survivors of primary ventricular fibrillation and matched control subjects: incidence and clinical significance. *J Am Coll Cardiol* 52, 1231-1238.
- Royer, A., van Veen, T. A., Le Bouter, S., Marionneau, C., Griol-Charhbil, V., Leoni, A. L., Steenman, M., van Rijen, H. V., Demolombe, S., Goddard, C. A., Richer, C., Escoubet, B., Jarry-Guichard, T., Colledge, W. H., Gros, D., de Bakker, J. M., Grace, A. A., Escande, D., and Charpentier, F. (2005) Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* 111, 1738-1746.
- Russell, M. W., Law, I., Sholinsky, P., and Fabsitz, R. R. (1998) Heritability of ECG measurements in adult male twins. *J Electrocardiol* 30 Suppl, 64-68.
- Rybin, V. O., Xu, X., Lisanti, M. P., and Steinberg, S. F. (2000) Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J Biol Chem* 275, 41447-41457.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., and Keating, M. T. (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384, 80-83.
- Sarkozy, A. and Brugada, P. (2005) Sudden cardiac death and inherited arrhythmia syndromes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16 Suppl 1, S8-20.
- Sarkozy, A., Chierchia, G. B., Paparella, G., Boussy, T., De Asmundis, C., Roos, M., Henkens, S., Kaufman, L., Buyl, R., Brugada, R., Brugada, J., and Brugada, P. (2009) Inferior and Lateral Electrocardiographic Repolarization Abnormalities in Brugada Syndrome. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2, 154-161.
- Schimpf, R., Borggrefe, M., and Wolpert, C. (2008) Clinical and molecular genetics of the short QT syndrome. *Curr Opin Cardiol* 23, 192-198.
- Schott, J. J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T. M., Hulsbeek, M., Wilde, A. A., Escande, D., Mannens, M. M., and Le Marec, H. (1999) Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 23, 20-21.



- Schott, J. J., Charpentier, F., Peltier, S., Foley, P., Drouin, E., Bouhour, J. B., Donnelly, P., Vergnaud, G., Bachner, L., Moisan, J. P., and . (1995) Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet* 57, 1114-1122.
- Schulze-Bahr, E., Eckardt, L., Breithardt, G., Seidl, K., Wichter, T., Wolpert, C., Borggrefe, M., and Haverkamp, W. (2003) Sodium channel gene (SCN5A) mutations in 44 index patients with Brugada syndrome: different incidences in familial and sporadic disease. *Hum Mutat* 21, 651-652.
- Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hordt, M., Towbin, J. A., Borggrefe, M., Assmann, G., Qu, X., Somberg, J. C., Breithardt, G., Oberti, C., and Funke, H. (1997) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 17, 267-268.
- Schwartz, P. J., Priori, S. G., and Napolitano, C. (2003) How really rare are rare diseases?: the intriguing case of independent compound mutations in the long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 14, 1120-1121.
- Schwartz, P. J., Priori, S. G., Spazzolini, C., Moss, A. J., Vincent, G. M., Napolitano, C., Denjoy, I., Guicheney, P., Breithardt, G., Keating, M. T., Towbin, J. A., Beggs, A. H., Brink, P., Wilde, A. A., Toivonen, L., Zareba, W., Robinson, J. L., Timothy, K. W., Corfield, V., Wattanasirichaigoon, D., Corbett, C., Haverkamp, W., Schulze-Bahr, E., Lehmann, M. H., Schwartz, K., Coumel, P., and Bloise, R. (2001) Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 103, 89-95.
- Schwartz, P. J., Spazzolini, C., Crotti, L., Bathen, J., Amlie, J. P., Timothy, K., Shkolnikova, M., Berul, C. I., Bitner-Glindzicz, M., Toivonen, L., Horie, M., Schulze-Bahr, E., and Denjoy, I. (2006) The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation* 113, 783-790.
- Shah, R. R. (2009) Drug-induced QT interval shortening: potential harbinger of proarrhythmia and regulatory perspectives. *Br J Pharmacol*.
- Shendure, J., Mitra, R. D., Varma, C., and Church, G. M. (2004) Advanced sequencing technologies: methods and goals. *Nat Rev Genet* 5, 335-344.
- Shimizu, W. (2008) Clinical impact of genetic studies in lethal inherited cardiac arrhythmias. *Circ J* 72, 1926-1936.
- Shimizu, W., Matsuo, K., Kokubo, Y., Satomi, K., Kurita, T., Noda, T., Nagaya, N., Suyama, K., Aihara, N., Kamakura, S., Inamoto, N., Akahoshi, M., and Tomoike, H. (2007) Sex hormone and gender difference--role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18, 415-421.
- Sicouri, S. and Antzelevitch, C. (1991) A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ Res* 68, 1729-1741.
- Smits, J. P., Eckardt, L., Probst, V., Bezzina, C. R., Schott, J. J., Remme, C. A., Haverkamp, W., Breithardt, G., Escande, D., Schulze-Bahr, E., Lemarec, H., and Wilde, A. A. (2002) Genotype-phenotype relationship in Brugada syndrome: electrocardiographic features differentiate SCN5A-related patients from non-SCN5A-related patients. *J Am Coll Cardiol* 40, 350-356.
- Spilianakis, C. G., Lalioti, M. D., Town, T., Lee, G. R., and Flavell, R. A. (2005) Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435, 637-645.
- Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Lehmann, M. H., Priori, S., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., and Keating, M. T. (2000) Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 102, 1178-1185.
- Splawski, I., Timothy, K. W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F. B., Beggs, A. H., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (2005) Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8089-8096.

Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (2004) Ca(V)<sub>1.2</sub> calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119, 19-31.

Splawski, I., Tristani-Firouzi, M., Lehmann, M. H., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (1997) Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 17, 338-340.

Swan, H., Piippo, K., Viitasalo, M., Heikkila, P., Paavonen, T., Kainulainen, K., Kere, J., Keto, P., Kontula, K., and Toivonen, L. (1999) Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol* 34, 2035-2042.

Takehara, N., Makita, N., Kawabe, J., Sato, N., Kawamura, Y., Kitabatake, A., and Kikuchi, K. (2004) A cardiac sodium channel mutation identified in Brugada syndrome associated with atrial standstill. *J Intern Med* 255, 137-142.

Takigawa, M., Noda, T., Shimizu, W., Miyamoto, K., Okamura, H., Satomi, K., Suyama, K., Aihara, N., Kamakura, S., and Kurita, T. (2008) Seasonal and circadian distributions of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 5, 1523-1527.

Tan, H. L., Bezzina, C. R., Smits, J. P., Verkerk, A. O., and Wilde, A. A. (2003) Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc Res* 57, 961-973.

Tan, H. L., Hofman, N., Van Langen, I. M., van der Wal, A. C., and Wilde, A. A. (2005) Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation* 112, 207-213.

Tarpey, P. S., Smith, R., Pleasance, E., Whibley, A., Edkins, S., Hardy, C., O'Meara, S., Latimer, C., Dicks, E., Menzies, A., Stephens, P., Blow, M., Greenman, C., Xue, Y., Tyler-Smith, C., Thompson, D., Gray, K., Andrews, J., Barthorpe, S., Buck, G., Cole, J., Dunmore, R., Jones, D., Maddison, M., Mironenko, T., Turner, R., Turrell, K., Varian, J., West, S., Widaa, S., Wray, P., Teague, J., Butler, A., Jenkinson, A., Jia, M., Richardson, D., Shepherd, R., Wooster, R., Tejada, M. I., Martinez, F., Carvill, G., Goliath, R., de Brouwer, A. P., van Bokhoven, H., Van Esch, H., Chelly, J., Raynaud, M., Ropers, H. H., Abidi, F. E., Srivastava, A. K., Cox, J., Luo, Y., Mallya, U., Moon, J., Parnau, J., Mohammed, S., Tolmie, J. L., Shoubridge, C., Corbett, M., Gardner, A., Haan, E., Rujirabanjerd, S., Shaw, M., Vandeleur, L., Fullston, T., Easton, D. F., Boyle, J., Partington, M., Hackett, A., Field, M., Skinner, C., Stevenson, R. E., Bobrow, M., Turner, G., Schwartz, C. E., Gecz, J., Raymond, F. L., Futreal, P. A., and Stratton, M. R. (2009) A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet* 41, 535-543.

Tein, I. (2003) Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. *J Inherit Metab Dis* 26, 147-169.

Tester, D. J. and Ackerman, M. J. (2007) Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol* 49, 240-246.

Tester, D. J., Cronk, L. B., Carr, J. L., Schulz, V., Salisbury, B. A., Judson, R. S., and Ackerman, M. J. (2006) Allelic dropout in long QT syndrome genetic testing: a possible mechanism underlying false-negative results. *Heart Rhythm* 3, 815-821.

Tester, D. J., Will, M. L., Haglund, C. M., and Ackerman, M. J. (2005) Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2, 507-517.

The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320.

The International HapMap Consortium (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851-861.

The Nature Reviews Drug Discovery Ion Channel Questionnaire Participants (2004) *The state of ion channel research in 2004. Nature Reviews Drug Discovery* 3, 239-278.

The Utah Marker Development Group (1995) A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome. *Am J Hum Genet* 57, 619-628.

Tobin, M. D., Kahonen, M., Braund, P., Nieminen, T., Hajat, C., Tomaszewski, M., Viik, J., Lehtinen, R., Ng, G. A., Macfarlane, P. W., Burton, P. R., Lehtimäki, T., and Samani, N. J. (2008) Gender and effects of a common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP on cardiac repolarization in 3761 individuals from two independent populations. *Int J Epidemiol* 37, 1132-1141.

Tristani-Firouzi, M., Jensen, J. L., Donaldson, M. R., Sansone, V., Meola, G., Hahn, A., Bendahhou, S., Kwiecinski, H., Fidzianska, A., Plaster, N., Fu, Y. H., Ptacek, L. J., and Tawil, R. (2002) Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* 110, 381-388.

Tsui, L. C., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J. C., Knowlton, R., Schumm, J. W., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy, D., Plavsic, N., and . (1985) Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230, 1054-1057.

Tsuji, K., Akao, M., Ishii, T. M., Ohno, S., Makiyama, T., Takenaka, K., Doi, T., Haruna, Y., Yoshida, H., Nakashima, T., Kita, T., and Horie, M. (2007) Mechanistic basis for the pathogenesis of long QT syndrome associated with a common splicing mutation in KCNQ1 gene. *J Mol Cell Cardiol* 42, 662-669.

Ueda, K., Valdivia, C., Medeiros-Domingo, A., Tester, D. J., Vatta, M., Farrugia, G., Ackerman, M. J., and Makielski, J. C. (2008) Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9355-9360.

Valdivia, C. R., Ueda, K., Ackerman, M. J., and Makielski, J. C. (2009) GPD1L LINKS REDOX STATE TO CARDIAC EXCITABILITY BY PKC-DEPENDENT PHOSPHORYLATION OF THE NA CHANNEL SCN5A. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

Van Norstrand, D. W., Valdivia, C. R., Tester, D. J., Ueda, K., London, B., Makielski, J. C., and Ackerman, M. J. (2007) Molecular and functional characterization of novel glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) mutations in sudden infant death syndrome. *Circulation* 116, 2253-2259.

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., and Cutting, G. R. (2007) Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 1036-1043.

Vatta, M., Ackerman, M. J., Ye, B., Makielski, J. C., Ughanze, E. E., Taylor, E. W., Tester, D. J., Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Li, Z., Kamp, T. J., and Towbin, J. A. (2006) Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 114, 2104-2112.

Vincent, G. M., Timothy, K. W., Leppert, M., and Keating, M. (1992) The spectrum of symptoms and QT intervals in carriers of the gene for the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 327, 846-852.

Viskin, S. (2009) The QT interval: too long, too short or just right. *Heart Rhythm* 6, 711-715.

Viskin, S., Zeltser, D., Ish-Shalom, M., Katz, A., Glikson, M., Justo, D., Tekes-Manova, D., and Belhassen, B. (2004) Is idiopathic ventricular fibrillation a short QT syndrome? Comparison of QT intervals of patients with idiopathic ventricular fibrillation and healthy controls. *Heart Rhythm* 1, 587-591.

Wainwright, B. J., Scambler, P. J., Schmidtke, J., Watson, E. A., Law, H. Y., Farrall, M., Cooke, H. J., Eiberg, H., and Williamson, R. (1985) Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 318, 384-385.

Wang, D. W., Desai, R. R., Crotti, L., Arnestad, M., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Rognum, T., Schwartz, P. J., and George, A. L., Jr. (2007) Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115, 368-376.

Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de Jager, T., Schwartz, P. J., Toubin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D. L., Landes, G. M., Connors, T. D., and Keating, M. T. (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12, 17-23.

Wang, Q., Shen, J., Li, Z., Timothy, K., Vincent, G. M., Priori, S. G., Schwartz, P. J., and Keating, M. T. (1995a) Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum Mol Genet* 4, 1603-1607.

Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J. L., Moss, A. J., Towbin, J. A., and Keating, M. T. (1995b) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 80, 805-811.

Ward, O. C. (1964) A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc* 54, 103-106.

Watanabe, H., Chinushi, M., Washizuka, T., Sugiura, H., Hirono, T., Komura, S., Hosaka, Y., Yamaura, M., Tanabe, Y., Furushima, H., Fujita, S., and Aizawa, Y. (2005) Variable electrocardiographic effects of short-term quinidine sulfate administration in Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 28, 372-377.

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., Pfeufer, A., Kaab, S., Wichmann, H. E., Hasdemir, C., Aizawa, Y., Wilde, A. A., Roden, D. M., and Bezzina, C. R. (2008) Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 118, 2260-2268.

Webster, G. and Berul, C. I. (2008) Congenital long-QT syndromes: a clinical and genetic update from infancy through adulthood. *Trends Cardiovasc Med* 18, 216-224.

Weiss, R., Barmada, M. M., Nguyen, T., Seibel, J. S., Cavlovich, D., Kornblit, C. A., Angelilli, A., Villanueva, F., McNamara, D. M., and London, B. (2002) Clinical and molecular heterogeneity in the Brugada syndrome: a novel gene locus on chromosome 3. *Circulation* 105, 707-713.

Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G., and Lathrop, M. (1992) A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359, 794-801.

Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-678.

Westenskow, P., Splawski, I., Timothy, K. W., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (2004) Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome. *Circulation* 109, 1834-1841.

Wever, E. F. and Robles de Medina, E. O. (2004) Sudden death in patients without structural heart disease. *J Am Coll Cardiol* 43, 1137-1144.

White, R., Woodward, S., Leppert, M., O'Connell, P., Hoff, M., Herbst, J., Lalouel, J. M., Dean, M., and Vande, W. G. (1985) A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature* 318, 382-384.

Wilde, A. A., Antzelevitch, C., Borggreffe, M., Brugada, J., Brugada, R., Brugada, P., Corrado, D., Hauer, R. N., Kass, R. S., Nademanee, K., Priori, S. G., and Towbin, J. A. (2002) Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation* 106, 2514-2519.

Wolpert, C., Echternach, C., Veltmann, C., Antzelevitch, C., Thomas, G. P., Spehl, S., Streitner, F., Kuschyk, J., Schimpf, R., Haase, K. K., and Borggreffe, M. (2005a) Intravenous drug challenge using flecainide and ajmaline in patients with Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2, 254-260.

Wolpert, C., Schimpf, R., Giustetto, C., Antzelevitch, C., Cordeiro, J., Dumaine, R., Brugada, R., Hong, K., Bauersfeld, U., Gaita, F., and Borggreffe, M. (2005b) Further insights into the effect of quinidine in short QT syndrome caused by a mutation in HERG. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16, 54-58.

Wu, J. and Corr, P. B. (1992) Influence of long-chain acylcarnitines on voltage-dependent calcium current in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 263, H410-H417.

Wu, X., Prasad, P. D., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. (1998) cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 589-595.

Yang, P., Koopmann, T. T., Pfeufer, A., Jalilzadeh, S., Schulze-Bahr, E., Kaab, S., Wilde, A. A., Roden, D. M., and Bezzina, C. R. (2008) Polymorphisms in the cardiac sodium channel promoter displaying variant in vitro expression activity. *Eur J Hum Genet* 16, 350-357.

Yang, S. N. and Berggren, P. O. (2005) Beta-cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E16-E28.

Ye, B., Valdivia, C. R., Ackerman, M. J., and Makielski, J. C. (2003) A common human SCN5A polymorphism modifies expression of an arrhythmia causing mutation. *Physiol Genomics* 12, 187-193.

Yokokawa, M., Noda, T., Okamura, H., Satomi, K., Suyama, K., Kurita, T., Aihara, N., Kamakura, S., and 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.

Zhang, J., Feuk, L., Duggan, G. E., Khaja, R., and Scherer, S. W. (2006) Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome. *Cytogenet Genome Res* 115, 205-214.

Zhang, L., Vincent, G. M., Baralle, M., Baralle, F. E., Anson, B. D., Benson, D. W., Whiting, B., Timothy, K. W., Carlquist, J., January, C. T., Keating, M. T., and Splawski, I. (2004) An intronic mutation causes long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 44, 1283-1291.

Zheng, Z. J., Croft, J. B., Giles, W. H., and Mensah, G. A. (2001) Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation* 104, 2158-2163.

Zimmer, T. and Surber, R. (2008) SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 98, 120-136.

Zipes, D. P. and Wellens, H. J. (1998) Sudden cardiac death. *Circulation* 98, 2334-2351.

---

## Résumé

---

### Génétique des troubles de la repolarisation ventriculaire, nouveaux concepts

La mort subite (MS) cardiaque sans cardiopathie structurale touche 12 à 20 000 patients en Europe par an. Elle est la conséquence directe d'une arythmie ventriculaire primaire, le plus souvent chez les sujets jeunes. Parmi ces MS, plusieurs formes mendéliennes d'anomalie de la repolarisation ventriculaire telles que le Syndrome du QT Long congénital (SQTL), le Syndrome du QT Court (SQTC) ou encore le syndrome de Brugada (SBr) ont fait l'objet d'études moléculaires approfondies.

L'identification des gènes majeurs du SQTL a permis d'expliquer la physiopathologie de ces troubles du rythme et une meilleure prise en charge. La base moléculaire d'un quart des formes du SQTL reste cependant inexpliquée. Une approche pangénomique par CGH array m'a permis d'identifier trois délétions dans les gènes *KCNQ1* et *KCNH2* parmi une centaine de patients sans mutation ponctuelle. Deux d'entre elles concernent le gène *KCNH2*, l'une est totale, la seconde est partielle et ségrége chez 6 patients sur 3 générations.

Le SQTC est une cardiopathie rare et hétérogène puisque 5 gènes permettent d'expliquer les 8 cas décrits à ce jour. Une étude clinique et moléculaire de 15 nouvelles familles atteintes de SQTC a permis d'identifier des mutations dans les gènes *CACNA1C* et *SLC22A5* suggérant un nouveau mécanisme moléculaire.

A l'inverse du SQTL, un seul gène majeur (*SCN5A*) est associé au SBr. *SCN5A* ne constitue cependant pas un marqueur pertinent de la stratification du risque de MS. Nous avons évalué la réelle implication du gène *SCN5A* dans le SBr à partir de 5 grandes familles dont le phénotype ne ségrége pas avec le génotype. Un modèle oligogénique est proposé à partir de nouvelles bases moléculaires.

**Mots-clés** : génétique – analyse de liaison – arythmie – mort subite – syndrome de Brugada – syndrome du QT long – syndrome QT court – CGH array

## Abstract

---

### Genetics of ventricular repolarisation disorders, new concepts

Sudden cardiac death (SD) without structural heart disease affects about 12 to 20000 individuals each year in Europe. These sudden deaths concern mostly young population who died of a primary cardiac arrhythmia. Several studies have been lead on mendelian forms at high risk of SD such as long QT syndrome (LQTS), short QT syndrome (SQTS) and Brugada syndrome (BrS).

The identification of genes in LQTS allowed us to explain arrhythmia pathophysiology and a better management for patients. However molecular diagnosis stay lacking within 25% of LQTS patients. A pangenomic approach by CGH array shows 3 deletions in *KCNQ1* and *KCNH2* genes, two of them concern *KCNH2* gene, one take all of gene, the second is partial and was inherited in 6 patients on 3 generations.

The SQTS is a rare and heterogeneous cardiopathy, 5 genes explain all of 8 cases reported today. A clinic and molecular study of new families affected by SQTS lead to identification of mutation in *CACNA1C* and *SLC22A5* genes, suggesting a new molecular mechanism.

Conversely of LQTS, a main gene (*SCN5A*) is associated with BrS. However *SCN5A* dot not constitute discerning marker for risk-stratification of SD. We evaluate the real implication of *SCN5A* gene in Brugada syndrome by 5 large families study in which the phenotype do not correlate with genotype. Our new molecular results suggest rather oligogenic model.

**Keywords:** genetics – linkage analysis – arrhythmia – sudden death – Brugada syndrome – long QT syndrome – short QT syndrome – CGH array

**IRT UN - l'institut du thorax, Inserm UMR 915, CNRS ERL3147 - 8 quai  
Moncousu - BP 70721 - 44007 Nantes Cedex 1**