

Thèse de Doctorat

Alban-Elouen BARUTEAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : 502 - Biologie Santé

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Génétique

**Unité de recherche : L'institut du thorax, Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291
Institut de Recherche en Santé de Université de Nantes**

Soutenue le vendredi 08 janvier 2016

Thèse N° : 81111

BASES GÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES DU BLOC ATRIO-VENTRICULAIRE DIAGNOSTIQUÉ IN UTERO ET AU COURS DE L'ENFANCE

JURY

- Président :** **Hervé LE MAREC**, Professeur des Universités, L'institut du thorax, Inserm U1087, Université de Nantes, France
- Rapporteurs :** **Jean-Claude DAUBERT**, Professeur Émérite des Universités, LTSI, Inserm U1099, Université Rennes-1, France
Pierre BORDACHAR, Professeur des Universités, Institut LIRYC, Inserm U1045, Université de Bordeaux, France
- Examineurs :** **Virginie LAMBERT**, Médecin de l'Hôpital Marie-Lannelongue, LabEx LERMIT, Inserm U999, Université Paris-Sud, France
Alain FRAISSE, Professeur des Universités, Royal Brompton Hospital, Imperial College London, London, UK
Philippe MABO, Professeur des Universités, LTSI, Inserm U1099, Université Rennes-1, France
- Directeur :** **Vincent PROBST**, Professeur des Universités, L'institut du thorax, Inserm U1087, Université de Nantes, France
- Co-directeur :** **Jean-Benoit THAMBO**, Professeur des Universités, Institut LIRYC, Inserm U1045, Université de Bordeaux, France

Etablissement : Université de Nantes
Ecole doctorale : 502 – Biologie Santé

Unité de recherche : L'institut du thorax,
Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291
Equipe 3: Génétique des maladies cardiovasculaires héréditaires
IRS-UN, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes
8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 01
France

Type de Doctorat : Doctorat en Sciences (Ph.D.)
Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé
Champ disciplinaire : Génétique

Titre de la Thèse : Bases génétiques et moléculaires du bloc atrio-ventriculaire diagnostiqué
in utero et au cours de l'enfance

Auteur : Alban-Elouen BARUTEAU
Directeurs : Vincent PROBST / Jean-Benoit THAMBO

Date de soutenance : 08/01/2016

Composition du jury : Hervé LE MAREC, PU-PH, Université de Nantes, *Président*
Pierre BORDACHAR, PU-PH, Université de Bordeaux, *Rapporteur*
Alain FRAISSE, PU-PH, Imperial College London, *Rapporteur*
Virginie LAMBERT, PH, Université Paris-Sud, *Examineur*
Jean-Claude DAUBERT, PU-PH, Université Rennes-1, *Examineur*
Philippe MABO, PU-PH, Université Rennes-1, *Examineur*
Vincent PROBST, PU-PH, Université de Nantes, *Directeur*
Jean-Benoit THAMBO, PU-PH, Université de Bordeaux, *Co-directeur*

If we knew what we were doing, it would not be called research, would it?
Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement les membres du jury. Au cours des dix dernières années, chacun de vous m'a permis de progresser sur les plans médical et scientifique.

Mon directeur de thèse,

le **Professeur Vincent Probst**, L'institut du thorax à Nantes

Depuis mon master-2 il y a 8 ans, puis ma thèse de médecine il y a 5 ans, travailler avec toi m'a beaucoup apporté. La distance n'a pas simplifié la progression de ce travail, merci d'avoir fait confiance à un doctorant atypique et pour ton aide à des moments clés.

Les membres de mon comité de suivi de thèse,

le **Docteur Virginie Lambert**, Hôpital Marie-Lannelongue à Paris

Tu as connu de près les journées desquelles s'est extirpée cette thèse. Merci d'avoir toujours été derrière moi dans les périodes d'affrontement de mes années parisiennes, et de m'avoir accompagné par tes conseils et ton amitié.

le **Professeur Jean-Benoit Thambo**, Hôpital du Haut Lévêque à Bordeaux

Ton énergie et tes conseils m'ont aidé à aller au bout de cette démarche scientifique et à porter mon regard plus loin. Sans ton écoute et tes encouragements, ma trajectoire aurait été différente. Merci pour ton amitié et ton soutien sans faille.

Les rapporteurs de ce travail,

Le **Professeur Alain Fraisse**, Royal Brompton Hospital à Londres

Merci pour ton amitié et ta confiance. Je suis heureux d'intégrer prochainement ton équipe.

Le **Professeur Pierre Bordachar**, Hôpital du Haut Lévêque à Bordeaux

Chaque rencontre est un plaisir et je me réjouis d'envisager avec toi des projets communs.

Investis dans des domaines de compétence différents, vous aurez une lecture complémentaire. Merci du temps que vous consacrerez à l'étude de cette thèse et votre souci d'en proposer une analyse critique.

Les examinateurs de ce travail,

Le **Professeur Jean-Claude Daubert**, Hôpital Pontchaillou à Rennes

Pour la formation que j'ai eu le privilège de pouvoir acquérir à vos côtés et votre soutien indéfectible dans mes choix professionnels, en particulier au cours de ces derniers mois. Vous êtes mon mentor et vous avoir dans mon jury représente beaucoup pour moi.

Le **Professeur Philippe Mabo**, Hôpital Pontchaillou à Rennes

Mes quatre années d'internat m'ont beaucoup marqué, j'en garde le souvenir d'un concentré de moments à la fois rudes et fantastiques. J'ai beaucoup appris grâce à vous.

Le **Professeur Hervé Le Marec**, L'institut du thorax à Nantes

Pour votre soutien et vos encouragements répétés dans la réalisation de ce cursus clinique et scientifique simultané.

Merci aux scientifiques qui se sont impliqués dans cette thèse.

à **Jean-Jacques Schott** pour ton accueil à l'institut du thorax durant mon master-2 et ton enseignement de la génétique des maladies rythmiques héréditaires.

à ceux qui m'ont initié à la recherche scientifique, particulièrement à **Swanny Fouchard** pour ton aide précieuse dans la coordination des prélèvements et du dépistage familial des BAV congénitaux (chapitre 3), à **Stéphanie Chatel** et **Estelle Baron** pour votre aide dans les manipulations des études sur le BAV congénital (chapitre 3), à **Xavier Daumy** et **Richard Redon** pour vos analyses des trios de BAV (chapitre 3), à **Florence Kyndt** pour ton aide dans la caractérisation des mutations *SCN5A* (chapitre 4).

à **Béatrice Guyomarc'h-Delasalle** et **Christian Dina** pour votre contribution dans les analyses statistiques des travaux des chapitres 3 et 4.

Merci aux médecins qui ont contribué aux projets de cette thèse.

à **Albin Behaghel** (Rennes), **Anna Jong-Hoeppner** (New York) et **Matthias Lachaud** (Nantes) pour votre contribution à l'analyse de plus de 1400 tracés électrocardiographiques.

à **Solène Le Pennec** (Rennes), **Emmanuelle Fournier** (Bordeaux), **Mathieu Le Bloa** (Toulouse), **Clément Karsenty** (Toulouse), **Maxime Eloi** (Paris), pour le temps consacré au recueil des données de l'étude DISCO (chapitre 5).

à **Caroline Rooryck-Thambo** (Bordeaux) pour ta relecture et tes conseils.

à **Philippe Maury** (Toulouse) pour la coordination du projet *NKX2.5* (chapitre 5).

aux nombreux médecins qui se sont investis dans les études multicentriques initiées au cours de cette thèse, en particulier à ceux avec qui s'est noué au fil des mois et des échanges un contact privilégié: **Shubhayan Sanatani** (Vancouver, Canada), **Lynne Nield** (Toronto, Canada), **Anne Dubin** (Stanford, USA), **Michael Ackerman** (Mayo Clinic, USA), **Christopher McLeod** (Mayo Clinic, USA), **Dominic Abrams** (Boston, USA), **Emile Bacha** (New York, USA), **Peter Schwartz** (Milan, Italy), **Elijah Behr** (London, UK), **Hugues Abriel** (Bern, Switzerland), **Andrew Davis** (Melbourne, Australia), **Jonathan Skinner** (Auckland, New Zealand), **Takeshi Aïba** (Osaka, Japan) et **Minoru Horie** (Otsu, Japan).

Merci à ceux qui ont connu cette thèse de l'extérieur et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler durant ces cinq dernières années à l'Hôpital Marie-Lannelongue,

en particulier à **Emre Belli**, **Bertrand Stos**, **Virginie Lambert**, **Dominique Piot**, pour votre enseignement de la cardiologie pédiatrique et les moments partagés au lit du malade.

à **Philippe Brenot**, **Ryad Bourkaib**, **Jean-Yves Riou**, **Claude-Yves Angel**, pour m'avoir appris la cardiologie interventionnelle et beaucoup aidé à prendre confiance dans les situations d'extrême urgence et dans les procédures techniquement difficiles.

à **Odile Messeguer**, ma secrétaire, pour tes attentions et ton écoute.

à **Nathalie Mignerot** et **Alexis Catteau** pour votre aide et votre amitié.

Merci à **Elijah Behr** (London, UK), pour son accueil comme postdoctorant au Cardiovascular Sciences Research Center, St George's University of London dans quelques semaines.

Enfin et surtout je remercie du fond du coeur ceux sans qui je ne pourrais rien entreprendre

à **Gabrielle,**

Pour ton amour et le bonheur que tu me donnes chaque jour. Merci d'avoir accepté de partager beaucoup de nuits avec cette thèse et avec les malades de l'hôpital Marie-Lannelongue; merci pour ta présence, tes conseils, ta confiance.

à **mes parents,**

Je ne pense pas que beaucoup de monde aurait parié sur le fait que je puisse soutenir une thèse un jour (et *a fortiori* deux) lorsque je remontais systématiquement le soir dans ma chambre ré-apprendre mes leçons de l'école primaire. Merci d'avoir toujours cru en nous, d'avoir veillé sur nous, de nous avoir transmis le sens de l'effort et le souci de prendre soin les uns des autres.

à **Julien, Florence, Marie et Alix** mes frère et soeurs, **Albin et Kelly** mes beau-frère et belle-soeur, **Elouan, Agathe et Beatriz-Emmanuelle**, mes neveu et nièces. Merci pour le bonheur que nous partageons depuis toujours et la force que je puise dans ma fratrie. Sans vous je serais resté quelque part au bord du chemin.

à **Véronique et Philippe, Valentine, Pierre, Baptiste et Martin**, ma belle-famille, que chaque rencontre me permet de connaître et d'apprécier davantage.

à **Athanase et Florence, Jean-Marc et Caroline, Annaïk et Jean-Sébastien, Dotsé, Raphaël et Marie, Christophe, Maxime et Emmanuelle, Jean-Guillaume, Briac, Hervé et Lolita, Geoffroy et Julie, Barthélémy et Ana, David et Cynthia, Clément et Anna**, pour votre amitié si précieuse.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des publications et des communications

Liste des prix et bourses de recherche

Liste des figures, des tableaux et des abréviations

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------|
| Liste des publications | p.11 |
| Liste des communications et exposés sur invitation | p.13 |
| Liste des prix et bourses se rapportant au travail de these | p.17 |
| Liste des figures | p.18 |
| Liste des tableaux | p.20 |
| Liste des abbreviations | p.21 |
| INTRODUCTION, PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS | p.22 |
| CHAPITRE 1: ÉLÉMENTS GÉNÉRAUX | p.27 |
| I- INTRODUCTION | p.28 |
| II- LE SYSTÈME DE CONDUCTION CARDIAQUE | p.28 |
| II.1- Embryogénèse et développement | |
| II.2- Anatomie du système cardionecteur | |
| II.3- Principes d'électrophysiologie | |
| II.4- Bases génétiques des anomalies du système de conduction | |
| III- ANOMALIES DU SYSTÈME DE CONDUCTION CARDIAQUE DANS LES CARDIOPATHIES CONGÉNITALES: EXEMPLE DE LA DOUBLE DISCORDANCE | p.52 |
| III.1- Généralités | |
| III.2- Anatomie et anomalies associées | |
| III.3- Troubles de conduction associés aux cardiopathies avec discordance AV | |
| IV- HÉRÉDITÉ ET GÉNÉTIQUE | p.61 |
| IV.1- Modèles génétiques | |
| IV.2- Stratégies pour l'identification des facteurs génétiques impliqués dans une maladie génétique complexe | |
| CHAPITRE 2: LES TROUBLES DE CONDUCTION DU SUJET JEUNE | p.68 |
| I- INTRODUCTION | p.69 |
| II- DÉFINITION DES TROUBLES DE CONDUCTION ET SPÉCIFICITÉS DE L'ÉLECTROCARDIOGRAMME EN PÉDIATRIE | p.70 |
| III- LA BRADYCARDIE DU NOURRISSON ET DE L'ENFANT | p.74 |
| III.1- Problématique et objectifs | |
| III.2- Résumé du travail | |
| Article: Baruteau AE et coll. Evaluation and management of bradycardia in neonates and children. <i>En révision.</i> | |
| IV- LE BLOC ATRIO-VENTRICULAIRE EN PÉDIATRIE | p.101 |
| IV.1- Problématique et objectifs | |
| IV.2- Résumé du travail | |
| Article: Baruteau AE et coll. Congenital and childhood atrio-ventricular block: pathophysiology and contemporary management. <i>En révision.</i> | |
| V- LES TROUBLES DE CONDUCTION HÉRÉDITAIRES | p.137 |
| V.1- Problématique et objectifs | |
| V.2- Résumé du travail | |
| Article: Baruteau AE et coll. Inherited progressive cardiac conduction disorders. <i>Current Opinion in Cardiology</i> 2015;30:33-39. | |

| | | |
|--|--|-------|
| CHAPITRE 3: ETUDE DES BASES GÉNÉTIQUES ET MOLECULAIRES DU BLOC ATRIO-VENTRICULAIRE DIAGNOSTIQUE <i>IN UTERO</i> ET AU COURS DE L'ENFANCE, SANS ANOMALIE DE L'ARCHITECTURE CARDIAQUE | | p.146 |
| I- | INTRODUCTION | p.147 |
| II- | Etude #1: CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES DU BLOC ATRIOVENTRICULAIRE ISOLÉ ET NON-IMMUN EN PÉDIATRIE | p.148 |
| | II.1- Problématique | |
| | II.2- Objectifs | |
| | II.3- Méthodologie | |
| | II.4- Principaux résultats | |
| | <u>Article:</u> Baruteau AE et coll. Characteristics and long-term outcomes of non-immune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicenter study. <i>European Heart Journal</i> 2012;33:622-9. | |
| III- | Etude #2: DÉPISTAGE PARENTAL ET ESTIMATION DE L'HÉRITABILITÉ | p.163 |
| | III.1- Problématique | |
| | III.2- Objectifs | |
| | III.3- Méthodologie | |
| | III.4- Principaux résultats | |
| | <u>Article:</u> Baruteau AE et coll. Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood nonimmune isolated atrioventricular block. <i>Circulation</i> 2012;126:1469-1477. | |
| IV- | Etude #3: ETUDE DES GÈNES DES CONNEXINES (<i>GJA5</i> , <i>GJA1</i> , <i>GJC1</i>) | p.185 |
| | IV.1- Rappels sur les connexines | |
| | IV.2- Problématique | |
| | IV.3- Objectif | |
| | IV.4- Méthodologie | |
| | IV.5- Principaux résultats | |
| | <u>Article:</u> Makita et coll. A connexin40 mutation associated with a malignant variant of progressive familial heart block type I. <i>Circulation Arrhythmia and Electrophysiology</i> 2012;5:163-172. | |
| V- | Etude #4: ETUDE DU GÈNE <i>TRPM4</i> | p.222 |
| | V.1- Rappels sur <i>TRPM4</i> | |
| | V.2- Problématique | |
| | V.3- Objectif | |
| | V.4- Méthodologie | |
| | V.5- Principaux résultats | |
| | <u>Article:</u> Syam et coll. TRPM4 variants in congenital atrioventricular block. <i>Soumis.</i> | |
| VI- | Etude #5: RECHERCHE DE VARIANTS RARES PAR L'ANALYSE DE TRIOS | p.285 |
| | VI.1- Problématique et objectifs | |
| | VI.2- Méthodologie | |
| | VI.3- Recherche de variants <i>de novo</i> | |
| | VI.4- Recherche de variants hétérozygotes composites | |
| VII- | DISCUSSION | p.294 |

| | |
|--|-------|
| CHAPITRE 4: ETUDE DES TROUBLES DE CONDUCTION ET DES RELATIONS GENOTYPE PHENOTYPE CHEZ LES ENFANTS PORTEURS D'UNE MUTATION SCN5A | p.304 |
| I- INTRODUCTION | p.305 |
| II- RAPPELS CONCERNANT LES CANALOPATHIES SCN5A | p.306 |
| II.1- Canal sodique cardiaque et courant sodique | |
| II.2- Syndromes et phénotypes associés aux mutations SCN5A | |
| II.3- Variabilité phénotypique des mutations SCN5A | |
| III- Etude #6: ETUDE DES ENFANTS PORTEURS D'UNE MUTATION SCN5A | p.328 |
| III.1- Problématique | |
| III.2- Objectif | |
| III.3- Méthodologie | |
| III.4- Principaux résultats | |
| III.5 Exemples de tracés ECG issus de notre étude | |
| <u>Article:</u> Baruteau AE et coll. Genotype-Phenotype correlation in pediatric SCN5A mutation carriers: new insights for a better risk stratification in neonates and children. <i>En cours de rédaction.</i> | |
| IV- PERSPECTIVES | p.387 |
| CHAPITRE 5: ETUDE DES BASES GENETIQUES ET MOLECULAIRES DU BLOC ATRIO-VENTRICULAIRE DIAGNOSTIQUE IN UTERO ET AU COURS DE L'ENFANCE, ASSOCIE A UNE CARDIOPATHIE CONGÉNITALE | p.389 |
| I- INTRODUCTION | p.390 |
| II- Etude #7: ETUDE DES TROUBLES DE CONDUCTION ET DU PHÉNOTYPE CARDIOVASCULAIRE DES PATIENTS PORTEURS D'UNE MUTATION NKX2.5 | p.391 |
| II.1- Problématique | |
| II.2- Objectif | |
| II.3- Méthodologie | |
| II.4- Principaux résultats | |
| <u>Article:</u> Maury P, Baruteau AE et coll. Cardiac phenotype and prognosis of patients with mutations in NKX2.5 gene. <i>En cours de rédaction.</i> | |
| III- Etude #8: DISCO: UNE ETUDE DES TROUBLES DE CONDUCTION ASSOCIES AUX MALFORMATIONS CARDIAQUES CONGÉNITALES COMPLEXES AVEC DISCORDANCE ATRIO-VENTRICULAIRE | p.397 |
| III.1- Problématique | |
| III.2- Objectif | |
| III.3- Méthodologie | |
| III.4- Structure du réseau | |
| III.5- Chronologie de l'étude et résultats préliminaires | |
| IV- DISCUSSION ET PERSPECTIVES | p.418 |
| CHAPITRE 6: DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION | p.421 |
| ANNEXES | p.431 |
| Annexe #1 Description des cardiopathies congénitales | |
| Annexe #2 Documents supplémentaires concernant l'étude DISCO | |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | p.443 |

LISTE DES PUBLICATIONS
se rapportant au travail de thèse

CHAPITRE 2

Article #1

Baruteau AE, Perry JC, Sanatani S, Horie M, Dubin AM. **Evaluation and management of bradycardia in neonates and children.** *En révision.*

(Revue de la littérature).

p.76

Article #2

Baruteau AE, Pass RH, Thambo JB, Spotnitz HM, Le Pennec S, Behaghel A, Perdreau E, Combes N, Liberman L, McLeod CJ. **Congenital and childhood atrio-ventricular block: pathophysiology and contemporary management.** *En révision.*

(Revue de la littérature).

p.103

Article #3

Baruteau AE, Probst V, Abriel H. **Inherited progressive cardiac conduction disorders.** *Current Opinion in Cardiology* 2015;30:33-39.

(Revue de la littérature - 2013 Impact Factor: 2.59).

p.139

CHAPITRE 3

Article #4

Baruteau AE, Fouchard S, Behaghel A, Mabo P, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Leclercq C, Daubert JC, Schott JJ, Le Marec H, Probst V. **Characteristics and long-term outcomes of non-immune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicenter study.** *European Heart Journal* 2012;33:622-9.

(Article Original - 2013 Impact Factor: 14.72).

p.155

Article #5

Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S, Mabo P, Schott JJ, Dina C, Chatel S, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Martins RP, Delasalle B, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Daubert JC, Le Marec H, Probst V. **Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood nonimmune isolated atrioventricular block.** *Circulation* 2012;126:1469-1477.

(Article Original - 2013 Impact Factor: 14.95).

p.175

Article #6

p.192

Makita N, Seki A, Sumitomo N, Chkourko H, Fukuhara S, Watanabe H, Shimizu W, Bezzina CR, Hasdemir C, Mugishima H, Makiyama T, Baruteau A, Baron E, Horie M, Hagiwara N, Wilde AA, Probst V, Le Marec H, Roden DM, Mochizuki N, Schott JJ, Delmar M. **A connexin40 mutation associated with a malignant variant of progressive familial heart block type I.** *Circulation Arrhythmia and Electrophysiology* 2012;5:163-172.

(Article Original - 2013 Impact Factor : 5.42).

Article #7

p.230

Syam N, Chatel S, Sottas V, Rougier JS, Baruteau A, Baron E, Amarouch MY, Daumy X, Probst V, Schott JJ, Abriel H. **TRPM4 variants in congenital atrioventricular block.** *Soumis.*

(Article original).

CHAPITRE 4

Article #8

p.336

Baruteau AE, Kyndt F, Wilde AA, Horie M, Blom NA, Vink S, Junichi O, Le Marec H, Schott JJ, Lachaud M, Denjoy I, Fressart V, Lupoglazoff JM, Aiba T, Shimizu W, Bos JM, Tester DJ, Winbo A, Skinner J, Jadhav M, Davis A, Stephenson EA, Zahavich L, Dagradi F, Crotti L, Spazzolini C, Wong L, Behr E, Dubin AM, Franciosi S, Sanatani S, Jong-Hoepfner A, Liberman L, Rieubland C, Van Hare GF, Kaski JP, Rudic B, Yung TC, Kwok SY, Tfelt-hansen J, Adrums DJ, Triedman JK, Shah M, Guyomarc'h-delasalle B, Ackerman MJ, Schwartz PJ, Probst V. **Genotype-Phenotype correlations in pediatric SCN5A mutation carriers: new insights for a better risk stratification in neonates and children.** *En cours de rédaction.*

(Article original).

CHAPITRE 5

Article #9

p.396

Maury P, Baruteau AE, Grandjbakhch E, Bessiere F, Bouvagnet P, Kyndt F, Hascoët S, Di Filippo S, Hidden-Lucet F, Chevalier P, Bonnet D, Probst V, Maltret A. **Cardiac phenotype and prognosis of patients with mutations in NKX2.5 gene.** *En cours de rédaction.*

(Article original).

LISTE DES COMMUNICATIONS
se rapportant au travail de thèse

Heart Rhythm Society's Scientific Sessions. 2009. Boston, MA, USA.

- 1- Baruteau AE, Schott JJ, Mabo P, Daubert JC, Le Marec H, Probst V. **Non-immune isolated atrioventricular block in childhood: a French multicenter study.** Communication orale. Abstract: *Heart Rhythm*. 2009. 39:AB19-1.

European Society of Cardiology Congress. 2009. Barcelona, Spain.

- 2- Baruteau AE, Schott JJ, Mabo P, Daubert JC, Le Marec H, Probst V. **Non-immune isolated atrioventricular block in childhood: a French multicenter study.** Communication affichée. Abstract: *Eur Heart J Suppl*. 2009. 30:994.

American Heart Association's Scientific Sessions. 2010. Chicago, IL, USA.

- 3- Baruteau AE, Schott JJ, Villain E, Maltret A, Thambo JB, Bretonneau A, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Daubert JC, Le Marec H, Mabo P, Probst V. **Clinical presentation and long-term outcome of non-immune and isolated atrioventricular block when congenital or diagnosed during childhood: a French multicentric study on 141 patients.** Communication orale. Abstract: *Circulation*. 2010. 122:A14021.

Journées Européennes, Société Française de Cardiologie. 2011. Paris, France.

- 4- Baruteau AE, Schott JJ, Villain E, Maltret A, Thambo JB, Bretonneau A, Marçon F, Rouault F, Gournay V, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Daubert JC, Le Marec H, Mabo P, Probst V. **Clinical characteristics and long-term outcome of isolated and non-immune atrioventricular block when congenital or diagnosed during childhood: a French multicentric study on 141 patients.** Communication orale. Abstract: *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2011. 3:97-98.

Heart Rhythm Society's Scientific Sessions. 2011. San Francisco, CA, USA.

- 4- Baruteau AE, Behaghel A, Mabo P, Chatel S, Schott JJ, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Fouchard S, Carre F, Daubert C, Le Marec H, Probst V. **Electrocardiographic screening in asymptomatic parents from children affected by non-immune isolated atrio-ventricular block.** Communication affichée. Abstract: *Heart Rhythm*. 2011. 8:S349.

European Heart Rhythm Association – Europace. 2011. Madrid, Spain.

- 5- Baruteau AE, Behaghel A, Chatel S, Mabo P, Schott JJ, Daubert C, LeMarec H, Probst V **Clinical characteristics and long-term prognosis of non-immune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicenter study.** Communication affichée. Abstract: *Europace*. 2011. 13:P508.
- 6- Baruteau AE, Behaghel A, Chatel S, Mabo P, Schott JJ, Daubert C, LeMarec H, Probst V **Electrocardiographic screening in asymptomatic parents from children affected by non-immune isolated atrio-ventricular block.** Communication affichée. Abstract: *Europace*. 2011. 13:P1240.

European Society of Cardiology Congress. 2011. Paris, France.

- 7- Baruteau AE, Behaghel A, Chatel S, Mabo P, Schott JJ, Daubert C, LeMarec H, Probst V **Systematic screening for cardiac conduction abnormalities in parents of children with non-immune isolated AV block.** Communication orale. Abstract: *Europace*. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/europace/eur221>
- 8- Baruteau AE, Behaghel A, Chatel S, Mabo P, Schott JJ, Daubert C, LeMarec H, Probst V **Long-term clinical outcomes of idiopathic pediatric heart block: a French multicenter study.** Communication orale. Abstract: *Europace*. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/europace/eur231>

Journées Européennes, Société Française de Cardiologie. 2012. Paris, France

- 9- Baruteau AE, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Fouchard S, Chatel S, Behaghel A, Leclercq C, Daubert JC, Schott JJ, Le Marec H, Mabo P, Probst V. **Clinical presentation and long-term clinical outcomes of non-immune, isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood.** Communication orale. Abstract: *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2012;4:104-105.
- 10- Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S, Dina C, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Martins R, Chatel S, Schott JJ, Daubert JC, Le Marec H, Mabo P, Probst V. **Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood non-immune isolated atrioventricular block.** Communication affichée. Abstract: *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2012. 4:110.

Association for European Paediatric Cardiology Congress. 2012. Istanbul, Turkey.

- 11- Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Chatel S, Dina C, Schott JJ, Daubert JC, Le Marec H, Mabo P, Probst V. **Diagnostic value of parental electrocardiographic screening in congenital and childhood, non-immune, isolated atrioventricular block.** Communication orale. Abstract: *Cardiology in the Young*. 2012. 22:S16.

American Heart Association's Scientific Sessions. 2012. Los Angeles, CA, USA.

- 12- Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S, Mabo P, Schott JJ, Dina C, Chatel S, Delasalle B, Daubert JC, Le Marec H, Probst V. **Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance in congenital and childhood, non-immune, isolated atrioventricular block.** Communication orale. Abstract: *Circulation* 2012;126:A11989.

Printemps de la Cardiologie. 2013. Marseille, France.

- 13- Daumy X, Trujillano D, Baruteau A, Duboscq-Bidot L, Lindenbaum P, Chatel S, Kyndt F, Fouchard S, Ossowski S, Le Marec H, Estivill X, Probst V, Redon R, Schott JJ. **Application of next generation sequencing technologies to find new variants in cardiac conduction defects.** Communication orale.

Biophysical Society, Annual Meeting. 2014. San Francisco, CA, USA.

- 14- Syam N, Chatel S, Rougier JS, Sottas V, Baruteau A, Probst V, Schott JJ, Abriel H. **TRPM4 Genetic Variants in Patients with Congenital Atrio-Ventricular Block.** Communication orale. Abstract: *Biophysical Journal*. 2014. 106(S1):762a.

Congrès médico-chirurgical de la Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale et Rencontres Francophones Multidisciplinaires des Cardiopathies Congénitales. 2015. Martinique, Antilles.

- 15- Maury P, Baruteau A, Gandjbakhch E, Bessière F, Bouvagnet P, Kyndt F, Hascoet S, Di Filippo S, Hidden-Lucet F, Chevalier P, Bonnet D, Probst V, Maltret A. **Cardiac Phenotype and prognosis of patients with mutations in *NKX2.5* gene.** Communication orale.

**LISTE DES EXPOSES SUR INVITATION
se rapportant au travail de thèse**

2011. Nouméa, Nouvelle-Calédonie. Océan Pacifique, France.

- 1- Baruteau A. **Bloc atrioventriculaire diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance.**
Réunion de Formation Médicale Continue, Centre Hospitalier Territorial de Nouméa.

2012. Toulouse, France.

- 2- Baruteau A. **Bloc atrioventriculaire idiopathique chez le nourrisson et l'enfant: arguments pour une héritabilité.** Congrès Médico-Chirurgical de la Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale.

2014. Reims, France.

- 3- Baruteau A. **Les nouveaux troubles héréditaires de la conduction cardiaque.**
Congrès Médico-Chirurgical de la Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale.

LISTE DES PRIX ET BOURSES DE RECHERCHE
se rapportant au travail de thèse

- 1- Bourse de Recherche Philippe Coumel sur l'Electrocardiographie et les Troubles du Rythme.
2009. Société Française de Cardiologie. Paris, France
- 2- Premier Prix de la Compétition Jeune Chercheur (Recherche clinique).
2011. Société Française de Cardiologie. Paris, France
- 3- Young Investigator Award.
2012. Joint Scientific Sessions of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology and the Japanese Society of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery. Istanbul, Turkey
- 4- Prix de Thèse Bernard Thomas de Labarthe.
2013. Université Rennes-1. Rennes, France
- 5- Bourse de Recherche Hélène de Marsan sur les Cardiopathies Congénitales.
2013. Société Française de Cardiologie. Paris, France
- 6- First Scientific Research Grant for Junior Members.
2014. Association for European Paediatric and Congenital Cardiology. Köln, Germany
- 7- Bourse de Recherche
2015. Philippe Foundation. New York, NY, USA
- 8- Bourse de Recherche
2015. Fondation Lefoulon-Delalande, Institut de France. Paris, France
- 9- Academic Research Grant Training Fellowship
2015. European Heart Rhythm Association, European Society of Cardiology. Milan, Italy

LISTE DES FIGURES

- Figure 0-1** Plan de la thèse
- Figure 1-1** Principales étapes de l'organogénèse cardiaque
- Figure 1-2** Développement du coeur à partir du premier et du second champ cardiaque
- Figure 1-3** Contributions du premier et du second champ cardiaque dans la formation du système de conduction
- Figure 1-4** Champs cardiaques et induction des cardiomyocytes
- Figure 1-5** Système de conduction et jonction atrioventriculaire
- Figure 1-6** Le noeud atrioventriculaire, seule structure communiquant entre le massif atrial et le massif ventriculaire dans le coeur normal
- Figure 1-7** Représentation schématique de la jonction atrioventriculaire
- Figure 1-8** Propriétés électrophysiologiques du noeud atrioventriculaire
- Figure 1-9** Vascularisation du noeud atrioventriculaire
- Figure 1-10** Principaux courants ioniques responsables des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains et canaux ioniques associés
- Figure 1-11** Canaux ioniques et modification du potentiel membranaire
- Figure 1-12** Potentiel d'action dans les cardiomyocytes sans activité pacemaker et dans les cellules nodales douées d'automatisme
- Figure 1-13** Principaux gènes impliqués dans les anomalies de conduction
- Figure 1-14** Représentation schématique de la double discordance
- Figure 1-15** Anomalies des voies de conduction dans la discordance atrioventriculaire
- Figure 1-16** ECG d'un patient porteur d'une double discordance
- Figure 1-17** Transmission des maladies monogéniques et complexes
- Figure 2-1** Définition électrocardiographique des blocs atrioventriculaires
- Figure 2-2** ECGs illustrant les variations physiologiques liées à l'âge des paramètres électriques au cours de l'enfance
- Figure 3-1** Carte des treize centres français participants à l'étude #1
- Figure 3-2** Enregistrement Holter ECG chez un nourrisson de 3 mois (étude #2)
- Figure 3-3** Electrocardiogramme 12-dérivations chez un enfant de 5 ans (étude #2)
- Figure 3-4** Représentation schématique d'une jonction communicante
- Figure 3-5** Patron d'expression des trois principales connexines cardiaques dans le coeur de souris adulte
- Figure 3-6** Profil d'expression de l'ARN messager des connexines cardiaques au sein de la jonction atrioventriculaire
- Figure 3-7** Enregistrement des courants jonctionnels entre deux cellules d'une paire isolée par la technique du double patch-clamp
- Figure 3-8** Représentation schématique du canal TRPM4 et localisation des mutations
- Figure 3-9** Effet du canal TRPM4 sur les canaux calciques non-voltage-dépendants et sur les canaux calciques voltage-dépendants
- Figure 3-10** Variant allélique identifié dans le gène *NKX2.5* (étude #5)
- Figure 3-11** Stratégie de recherche et principaux résultats dans l'exploration du BAV pédiatrique isolé et non-immun
- Figure 4-1** Canal sodique cardiaque et son complexe macromoléculaire
- Figure 4-2** Représentation du canal sodique
- Figure 4-3** Fonctionnement du canal sodique en conditions pathologiques: effets électrophysiologiques d'une mutation *SCN5A* perte de fonction

- Figure 4-4** Fonctionnement du canal sodique en conditions pathologiques: effets électrophysiologiques d'une mutation *SCN5A* gain de fonction
- Figure 4-5** Syndrome du QT long congénital compliqué de torsades de pointes et d'une fibrillation ventriculaire
- Figure 4-6** Distribution des valeurs de QT corrigé chez les sujets sains et chez les sujets atteints de LQTS
- Figure 4-7** Stratification du risque basée sur le génotype et le phénotype dans le LQTS
- Figure 4-8** Représentation des trois types ECG observés dans le syndrome de Brugada
- Figure 4-9** Représentation des mécanismes électrophysiologiques pouvant expliquer la co-existence d'un LQT3 et d'un BrS causés par une même mutation *SCN5A*
- Figure 4-10** Variabilité phénotypique associée aux mutations du gène *SCN5A*
- Figure 4-11** *SCN5A Ped.* Study: planisphère des 25 centres participants
- Figure 4-12** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 267 (London, UK)
- Figure 4-13** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 399 (Osaka, Japan)
- Figure 4-14** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 115 (Stanford, Palo Alto, CA, USA)
- Figure 4-15** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 393 (Tokyo, Japan)
- Figure 4-16** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 234 (Paris, France)
- Figure 4-17** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 269 (London, UK)
- Figure 4-18** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 359 (Toronto, Canada)
- Figure 4-19** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 14 (Amsterdam, The Netherlands)
- Figure 4-20** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 12 (Amsterdam, The Netherlands)
- Figure 4-21** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 100 (Auckland, New Zealand)
- Figure 4-22** Tracés du patient *SCN5A Ped.* 93 (Copenhagen, Denmark)
- Figure 5-1** Représentation du potentiel d'action dans différentes parties du système de conduction cardiaque
- Figure 5-2** ECG de patients porteurs d'une mutation *NKX2.5*
- Figure 5-3** Etude DISCO: planisphère des 64 centres participants
- Figure 5-4** Exemple de cahier d'observation de l'étude DISCO
- Figure 6-1** Continuum de complexité des bases génétiques des maladies électriques primitives
- Figure 6-2** Représentation schématique des modèles génétiques soutenant une maladie complexe
- Figure 6-3** Loci identifiés par les études d'association pangénomique comme modulateurs des paramètres ECG dans la population générale
- Figure 7-1** Principes de l'analyse segmentaire
- Figure 7-2** Topologie ventriculaire
- Figure 7-3** Connexions atrioventriculaires dans les cardiopathies univentriculaires
- Figure 7-4** Alignement des principaux segments cardiaques
- Figure 7-5** Les différents cardiotypes, connexions et alignements

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---------------------|---|
| Tableau 1-1 | Bases génétiques des anomalies du système de conduction cardiaque |
| Tableau 2-1 | Paramètres ECG anormaux chez l'adulte mais qui peuvent être Normaux chez l'enfant |
| Tableau 2-2 | Valeurs ECG normales chez l'enfant, en fonction de l'âge |
| Tableau 2-3 | Valeurs seuils retenues pour la définition des principales anomalies électriques en pédiatrie, en fonction de l'âge |
| Tableau 3-1 | Caractéristiques de l'étude #1 |
| Tableau 3-2 | Caractéristiques de l'étude #2 |
| Tableau 3-3 | Mutations décrites dans <i>TRPM4</i> et troubles de conduction associés |
| Tableau 3-4 | Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude #4 |
| Tableau 3-5 | Caractéristiques cliniques des 15 propositus (étude #5) |
| Tableau 3-6 | Tableau récapitulatif des 19 variants <i>de novo</i> identifiés (étude #7) |
| Tableau 3-7 | Validation des variants d'intérêt chez les 15 enfants atteints de BAV |
| Tableau 3-8 | Récapitulatif du nombre de variants identifiés à l'aide de l'hypothèse d'hétérozygotie composite |
| Tableau 3-9 | Récapitulatif des 66 variants validés par inspection visuelle |
| Tableau 3-10 | Gènes candidats considérés dans le BAV pédiatrique isolé et non-immun |
| Tableau 4-1 | Pathologies et phénotypes cliniques associés à des mutations dans Le gène <i>SCN5A</i> |
| Tableau 4-2 | Différents types de syndrome du QT long congénital et leur substrat génétique |
| Tableau 4-3 | Score diagnostique du LQTS (score de Schwartz) |
| Tableau 4-4 | Différents types de syndrome de Brugada et leur substrat génétique |
| Tableau 4-5 | Caractéristiques de l'étude #6 |
| Tableau 4-6 | Classification topologique des mutations <i>SCN5A</i> observées dans notre étude |
| Tableau 5-1 | Synopsis de l'étude DISCO (étude #8) |
| Tableau 5-2 | Liste des médecins co-investigateurs et des centres participants (étude #8) |

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

| | |
|-------|---|
| ACA | Aborted cardiac arrest |
| AHA | American Heart Association |
| BAV | Bloc atrioventriculaire |
| BBD | Bloc de branche droit |
| BBG | Bloc de branche gauche |
| bpm | Battements par minute |
| BrS | Syndrome de Brugada |
| CHD | Congenital heart disease |
| CIA | Communication interatriale |
| CIV | Communication interventriculaire |
| CMD | Cardiomyopathie dilatée |
| CNV | Copy Number Variation (variation de nombre de copies) |
| Cx | Connexine |
| DAI | Défibrillateur automatique implantable |
| DHPLC | Denaturing high performance liquid chromatography |
| ECG | Electrocardiogramme |
| EEP | Exploration électrophysiologique |
| ESA | Extrasystole atriale |
| ESC | European Society of Cardiology |
| ESV | Extrasystole ventriculaire |
| FA | Fibrillation atriale |
| FV | Fibrillation ventriculaire |
| HBAG | Hémibloc antérieur gauche |
| HBPG | Hémibloc postérieur gauche |
| HRS | Heart Rhythm Society |
| ICD | Défibrillateur automatique implantable |
| IRB | Institutional Review Board |
| LQT3 | Syndrome du QT long congénital type 3 |
| MSIN | Mort subite inexplicée du nourrisson |
| PA | Potentiel d'action |
| pb | paires de bases |
| PCCD | Troubles de conduction progressifs héréditaires |
| PM | Pacemaker |
| SCC | Système de conduction cardiaque |
| SCD | Sudden cardiac death |
| SNA | Système nerveux autonome |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SV | Supraventricular |
| TdP | Torsade de pointes |
| TV | Tachycardie ventriculaire |
| VF | Ventricular fibrillation |
| VT | Ventricular tachycardia |
| WPW | Wolff-Parkinson-White |

INTRODUCTION, PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

Le bloc atrioventriculaire (BAV) est une altération de la propagation du potentiel d'action sur la voie nodo-hissienne, qui expose au risque de mort subite. La physiopathologie du BAV, en particulier lorsqu'il survient *in utero* ou au cours de l'enfance, est hétérogène et complexe. Certaines formes sont héréditaires et à ce jour plusieurs mutations ont été décrites dans quelques gènes impliqués dans le développement des voies de conduction ou dans la propagation de l'influx électrique au sein du système cardionecteur. Cependant, si l'existence de troubles de conduction héréditaires chez l'enfant est connue de longue date, ses bases génétiques et moléculaires sont très imparfaitement comprises et peu étudiées, principalement du fait de la faible prévalence de ce phénotype dans la population pédiatrique.

L'orientation de notre laboratoire, créé par le Pr. Denis Escande en 1996, est de contribuer à améliorer la prise en charge de la mort subite par la découverte de nouvelles bases moléculaires et voies de signalisation dans le domaine cardiovasculaire. L'institut du thorax fondé en 2004 vise à consolider les relations entre cliniciens et scientifiques – cardiologues, généticiens, physiologistes, bioinformaticiens – par la découverte des bases moléculaires de l'activité électrique cardiaque normale et anormale. L'identification de mutations génétiques associées aux troubles du rythme et/ou de la conduction cardiaque héréditaires, est en effet un des vecteurs majeurs de compréhension et de prise en charge de la mort subite d'origine cardiaque. L'unité Inserm 1087 – CNRS 6291 possède aussi une expertise dans les domaines de la génomique des canaux ioniques, de la physiologie moléculaire et cellulaire et des animaux transgéniques permettant une approche intégrée de la physiologie et de la physiopathologie cardiaques.

Les canalopathies cardiaques forment un groupe de maladies électriques comprenant un risque d'arythmie modulé par des variants génétiques rares affectant les propriétés électriques des cardiomyocytes. Il s'agit principalement du syndrome du QT long congénital, du syndrome du QT court congénital, du syndrome de Brugada, de la maladie de Lev-Lenègre familiale, des formes héréditaires de dysfonction sinusale, de la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique et des formes familiales de fibrillation atriale. Ces maladies génétiques, transmises sur un mode essentiellement autosomique dominant, sont par définition liées à une altération dans un gène unique. L'expressivité de ces pathologies est variable, avec un spectre phénotypique allant du porteur sain dû à une non pénétrance à des présentations cliniques très sévères. Cette constatation sous-entend qu'une mutation dans un gène majeur est nécessaire mais non suffisante pour développer la maladie, d'autres facteurs endogènes ou environnementaux étant impliqués dans la modulation du trait phénotypique. L'identification de ces modulateurs demande une évolution conceptuelle des modèles génétiques, la constitution de grandes bases de données cliniques, une grande rigueur dans l'analyse des phénotypes afin d'être en mesure de caractériser

avec précision les variations d'expressivité, et le développement de nouvelles technologies pouvant répondre à ce nouveau défi.

Cette thèse s'est inscrite dans ce contexte. Centralisée à l'institut du thorax de Nantes pendant quatre ans, elle a été menée pendant les trois premières années en relation étroite avec le pôle de chirurgie cardiaque pédiatrique et congénitale de l'Hôpital Marie-Lannelongue / Université Paris-Sud, puis au cours d'une quatrième année dans l'unité d'électrophysiologie pédiatrique du Department of pediatric cardiac surgery au Morgan Stanley Children's Hospital at New York Presbyterian / Columbia University. Volontairement axée sur le versant clinique de cette approche génétique intégrée, elle a eu pour objectif de créer et de développer des réseaux de recherche clinique, de constituer de grandes cohortes de cas index et de sujets apparentés, de caractériser les données phénotypiques du BAV en pédiatrie.

Le BAV diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance connaît une grande diversité phénotypique. Afin de progresser dans notre compréhension de ses bases génétiques et moléculaires, nous avons mené plusieurs études abordant successivement: (a) le BAV isolé, c'est-à-dire survenant en l'absence d'anomalie de l'architecture cardiaque; (b) le BAV rencontré dans les canalopathies sodiques, dues à une mutation du gène *SCN5A*; et enfin (c) le BAV malformatif, associé à une malformation cardiaque congénitale.

Suivant ce fil conducteur, notre travail s'articule autour de cinq axes (Figure 0-1):

1- le chapitre 1 est constitué d'une série de rappels initiaux concernant le développement et l'anatomie des voies de conduction, ainsi que l'électrophysiologie et la génétique du système de conduction cardiaque. Des rappels sur l'anatomie de la discordance atrioventriculaire permettent ensuite d'introduire les troubles de conduction associés aux malformations cardiaques congénitales. Enfin sont exposés brièvement les principaux modèles génétiques et les stratégies d'identification de variants alléliques dans les maladies génétiques complexes.

2- le chapitre 2 est une mise au point sur les troubles de conduction du sujet jeune. Après un bref rappel des spécificités de l'électrocardiogramme pédiatrique, cette mise au point est illustrée par trois revues de la littérature abordant successivement l'évaluation et la prise en charge de la bradycardie du nourrisson et de l'enfant; les mécanismes physiopathologiques et la prise en charge du bloc atrio-ventriculaire en pédiatrie; et les bases génétiques des troubles de conduction héréditaires (3 articles, 2 d'entre eux en cours de révision);

3- le chapitre 3 est consacré à l'étude des bases génétiques et moléculaires du BAV diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance, lorsque celui-ci survient sans anomalie sous-jacente de l'architecture cardiaque. Il détaille notre stratégie de recherche clinique et les deux études multicentriques nationales ayant permis de mettre en évidence une forte héritabilité dans cette

forme de troubles de conduction. Puis il présente les travaux de recherche fondamentale qui en ont découlé (4 articles, 1 d'entre eux en cours de soumission);

4- le chapitre 4 s'intéresse aux troubles de conduction et aux relations génotype-phénotype chez les enfants porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*. Après des rappels sur le canal Nav1.5 et le spectre phénotypique des canalopathies sodiques cardiaques, sont exposés la méthodologie et les premiers résultats de l'étude multicentrique internationale que nous avons conduit (1 article en cours de rédaction);

5- le chapitre 5 expose notre approche de l'étude des bases génétiques et moléculaires du bloc atrioventriculaire associé aux cardiopathies congénitales. Une première étude multicentrique nationale s'est intéressée au phénotype cardiovasculaire et au pronostic des patients porteurs d'une mutation du gène *NKX2.5*. Une seconde étude (étude DISCO, en cours) est présentée: il s'agit d'un projet de recherche multicentrique international initié dans le cadre de cette thèse, qui vise à préciser les troubles de conduction associés aux malformations cardiaques congénitales complexes avec discordance atrioventriculaire (1 article en cours de rédaction).

Les travaux présentés dans ma thèse émergent tous d'un travail collectif ayant impliqué de nombreuses personnes que je citerai au fur et à mesure de cet exposé. Dans les différentes études présentées ici, ces personnes ont contribué à identifier des malades, à recueillir ou à analyser des données, à produire des résultats, à faire progresser la réflexion et à partager des responsabilités. En particulier, les travaux de biologie moléculaire et de bioinformatique présentés ici ont été réalisés par l'équipe de l'unité Inserm 1087 - CNRS 6291 à l'institut du thorax, Université de Nantes. L'objectif de ces recherches est de permettre une meilleure compréhension des bases génétiques et moléculaires du BAV diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance, dans le but d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués et *in fine* la prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces patients.

Figure 0-1: Plan de la thèse

**Bases génétiques et moléculaires du bloc atrioventriculaire (BAV)
diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance**

Chap.1: Eléments généraux

- . Embryogénèse, anatomie, électrophysiologie, génétique du système de conduction
- . Anomalies des voies de conduction et double discordance
- . Hérité et génétique

Chap. 2: Les troubles de conduction du sujet jeune

- . ECG et troubles de conduction en pédiatrie
- . Bradycardie du nourrisson et de l'enfant (article #1, en révision)
- . BAV en pédiatrie (article #2, en révision)
- . Troubles de conduction héréditaires (article #3, *Curr Opin Cardiol* 2015)

Chap.3: Bases génétiques et moléculaires du BAV sur coeur sain en pédiatrie

- . BAV isolé non-immun en pédiatrie (article #4, *Eur Heart J* 2012)
- . Dépistage parental et héritabilité (article #5, *Circulation* 2012)
- . Etude des gènes des connexines (article #6, *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2012)
- . Etude du gène *TRPM4* (article #7, soumis)
- . Recherche de variants rares par l'analyse de trios

Chap.4: Etude des troubles de conduction et des relations genotype-phenotype chez les enfants mutés *SCN5A*

- . Variabilité phénotypique des canalopathies *SCN5A*
- . Etude des enfants porteurs d'une mutation *SCN5A* (article #8, en rédaction)

Chap.5: Etude des bases génétiques et moléculaires du BAV sur cardiopathie congénitale en pédiatrie

- . Troubles de conduction et phénotype cardiovasculaire des patients mutés *NKX2.5* (article #9, en rédaction)
- . Troubles de conduction associés à la discordance atrioventriculaire (étude DISCO)

CHAPITRE 1: ÉLÉMENTS GÉNÉRAUX

I- INTRODUCTION

On estime que le coeur humain bat en moyenne 2,5 milliards de fois au cours d'une vie normale, cette performance étant due à l'activité des cellules du système de conduction cardiaque (SCC) [Park *et al*, 2012]. Les éléments fonctionnels qui composent ce dernier – assurant la genèse et la propagation de l'influx électrique – comprennent les noeuds sinusal et atrio-ventriculaire, le faisceau de His et le réseau de Purkinje. Le SCC humain peut être l'objet d'atteintes ayant pour effet d'altérer la genèse du potentiel d'action, sa propagation ou ces deux processus à la fois. Les troubles en question résultent le plus souvent de pathologies acquises telles qu'une ischémie ou un infarctus du myocarde, une dégénérescence fibroscléreuse liée à l'âge, des complications secondaires à une intervention chirurgicale ou une intoxication médicamenteuse. Rares sont les troubles de conduction d'origine héréditaire, mais chaque nouvelle mutation qui est découverte présente un intérêt majeur, car elle permet de mieux cerner les mécanismes moléculaires qui régissent le développement et le fonctionnement du SCC. Grâce à la mise en œuvre d'une approche multidisciplinaire fondée sur le dépistage génétique chez l'homme, l'analyse biophysique et l'emploi de souris transgéniques, il a été possible d'identifier de nombreuses familles de gènes ayant pour rôle d'assurer le fonctionnement physiologique normal du SCC [Park *et al*, 2012].

Ce premier chapitre a pour objectif de synthétiser les notions contemporaines de notre compréhension du développement, de l'anatomie, de l'électrophysiologie et de la génétique du SCC; de présenter des notions élémentaires concernant les anomalies des voies de conduction dans les cardiopathies congénitales, la discordance atrioventriculaire étant un "modèle" de malformation cardiaque pour l'étude des troubles de conduction associés à une anomalie de l'architecture cardiaque; et de rappeler quels sont les principaux modèles génétiques et les stratégies employées pour l'identification des facteurs génétiques impliqués dans une maladie génétique complexe.

II- LE SYSTÈME DE CONDUCTION CARDIAQUE

Le SCC est un ensemble de cellules spécialisées dans la genèse ou la propagation du potentiel d'action aboutissant, dans les conditions physiologiques, à une contraction régulière et synchrone des deux ventricules. Si les études anatomiques sont déjà anciennes, de nombreux travaux de recherche contemporains visent à mieux caractériser sa modélisation, les mécanismes de son développement, ses bases génétiques et ses propriétés électrophysiologiques.

II.1- EMBRYOGÉNÈSE ET DÉVELOPPEMENT

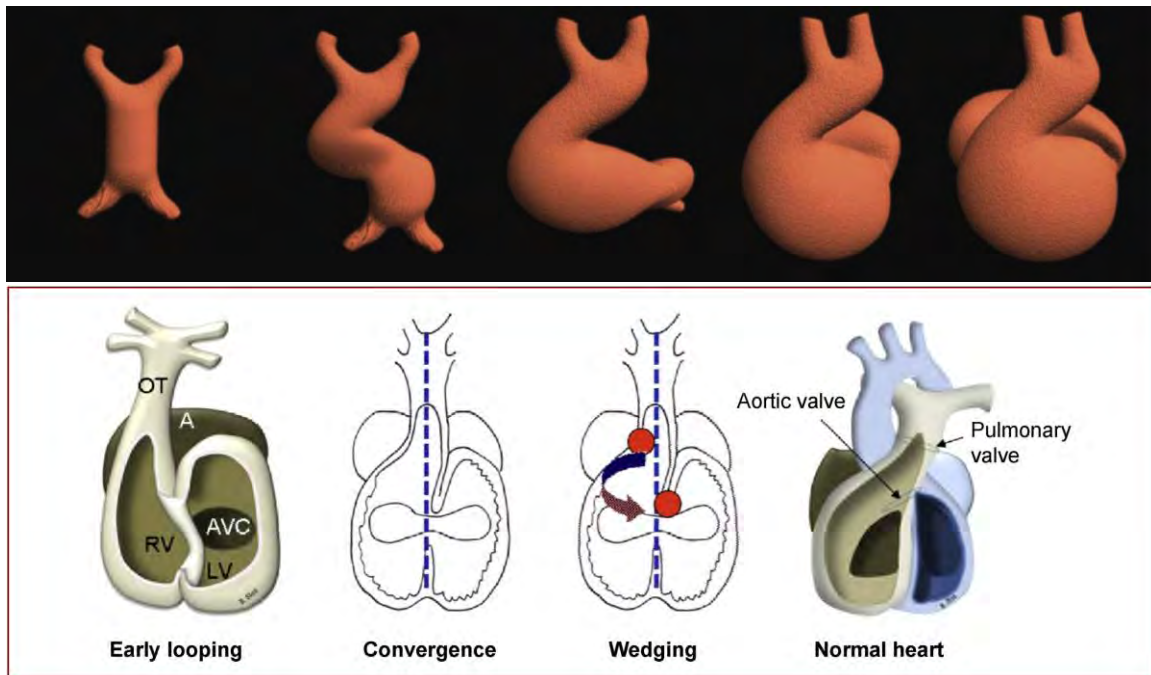
Au cours de son développement le coeur passe du tube cardiaque primitif – une structure tubulaire dotée de contractions péristaltiques – à une structure tridimensionnelle à quatre cavités fonctionnant comme une double pompe (Figure 1-1). La direction du front de dépolarisation responsable de la contraction cardiaque change au cours de l'organogénèse cardiaque pour qu'*in fine* la contraction du massif ventriculaire soit initiée à l'apex.

Le coeur commence à battre en présentant des contractions rythmées dès la troisième semaine de vie intra-utérine, bien avant le développement du SCC. Or, dès le stade du tube cardiaque primitif, avant même la formation de la boucle cardiaque, un complexe électrique multiphasique relativement comparable au complexe QRS du coeur adulte peut être enregistré [Van Mierop *et al*, 1967]. Par ailleurs, l'utilisation de colorations voltage-dépendantes a montré dans le coeur d'embryon de poulet l'existence de potentiels d'action rythmés avant même l'apparition des premières contractions cardiaques [Moorman *et al*, 1994]. La non-différenciation de certaines portions du myocarde primitif en cardiomyocytes contractiles donne naissance au système de conduction dit central, c'est-à-dire le noeud sinusal, le noeud atrioventriculaire et le faisceau de His [Epstein *et al*, 2010]. La propagation du potentiel d'action à travers le coeur se fait *via* des voies de conduction spécialisées (noeud atrioventriculaire, tronc du faisceau de His et sa branche gauche), qui sont en réalité les reliquats du myocarde primitif non différencié provenant du premier champ cardiaque (Figures 1-2 et 1-3). Le noeud sinusal et la branche droite du faisceau de His quant-à-eux dérivent du myocarde primitif issu du second champ cardiaque [Liang *et al*, 2015; Christoffels *et al*, 2010; Boukens *et al*, 2012]. Ce myocarde primitif est caractérisé par des vitesses de conduction électrique basses, liées à des canaux calciques lents et à une faible densité en jonctions communicantes. En revanche, le myocarde primitif qui se différencie en cardiomyocytes contractiles va développer de nombreuses jonctions communicantes permettant une transmission plus rapide de l'influx, comme en témoigne la détection de la connexine 43 qui devient alors décelable dans le massif atrial et dans le massif ventriculaire [Boukens *et al*, 2012].

A ce stade, la contraction péristaltique devient une contraction synchrone [Chaudhry *et al*, 2014]. Cette différenciation cellulaire aboutit à l'existence de segments dont la morphologie et les propriétés fonctionnelles sont distinctes, comprenant dans le sens du flux sanguin: une chambre d'admission à conduction lente, une oreillette primitive à conduction rapide, une jonction atrioventriculaire à conduction lente, un ventricule primitif à conduction rapide et une voie d'éjection à conduction lente. L'existence de deux segments contractiles à conduction rapide

explique comment le tube cardiaque primitif peut fonctionner à ce stade, sans système de conduction cardiaque organisé et sans valve atrioventriculaire. Le système de conduction cardiaque ne peut se former normalement que si les septa interatrial, interventriculaire et conal sont normalement formés et alignés [Jongbloed *et al*, 2012]. La formation des noeuds sinusal et atrioventriculaire est dépendante d'une voie moléculaire incluant *Id2*, *Tbx5* et *NKX2.5* [Moskowitz *et al*, 2007]. Les bases moléculaires et la régulation transcriptionnelle impliquées dans le développement du SCC sont extrêmement complexes et encore mal comprises (Figure 1-4) [Chaudhry *et al*, 2014; Boukens *et al*, 2012; Bruneau *et al*, 2001]. L'ensemble des régulateurs transcriptionnels sont également impliqués dans la formation des cavités cardiaques, avec une activité d'activation et/ou de répression temporelle et spatiale de gènes responsables de l'excitabilité des cardiomyocytes, en particulier *SCN5A* et *SCN10A* [van den Boogaard *et al*, 2012; Arnolds *et al*, 2012].

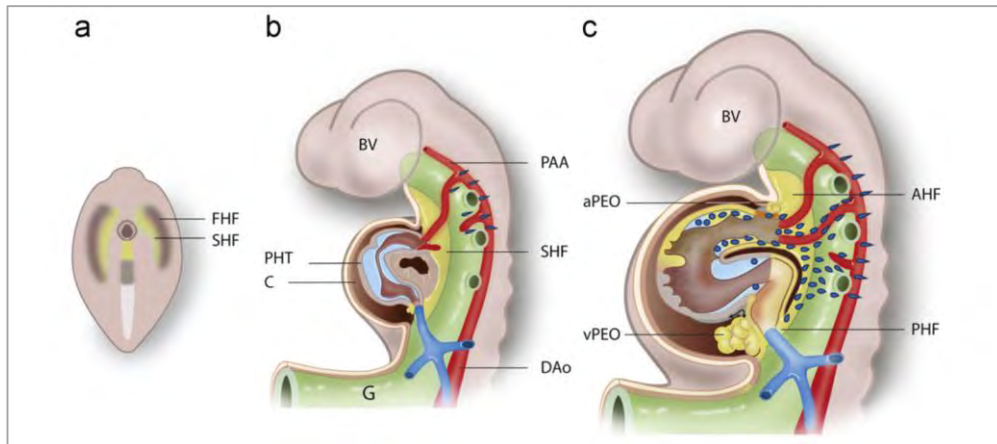
Figure 1-1: Principales étapes de l'organogénèse cardiaque



Au 23ème jour de vie intra-utérine, le tube cardiaque primitif s'incurve vers la droite. Cette première phase, appelée "early looping" est suivie d'un phénomène de convergence puis de wedging permettant de passer progressivement d'une structure tubulaire à une structure tridimensionnelle à quatre cavités.

Adapté de [Schleich *et al*, 2013]

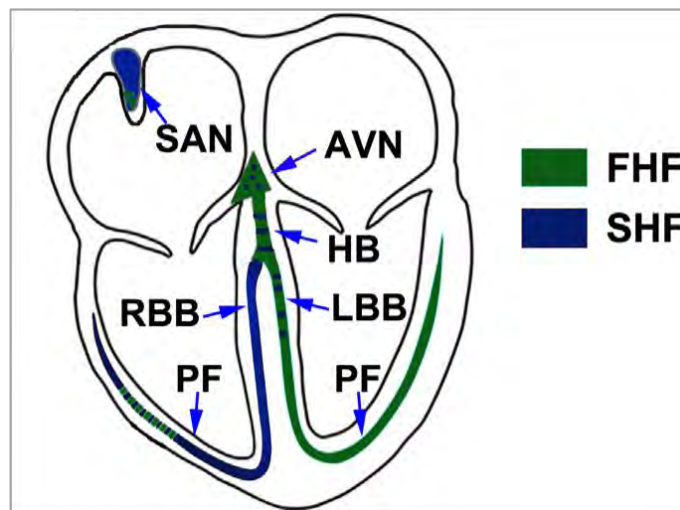
Figure 1-2: Développement du coeur à partir du premier et du second champ cardiaque



a: aux stades initiaux du développement embryonnaire, les premier et second champs cardiaques sont présents dans l'embryon primitif; b et c: représentation schématique du tube cardiaque primitif. Le champ cardiaque primitif forme le tube cardiaque primitif puis secondairement la jonction atrioventriculaire et le ventricule gauche. Le second champ cardiaque, situé en arrière du tube cardiaque primitif, va donner lieu aux pôles artériel et veineux du tube cardiaque primitif, puis ensuite aux voies d'éjection, au ventricule droit et au massif atrial. FHF: premier champ cardiaque (first heart field); SHF: second champ cardiaque.

Adapté de [Jongbloed et al, 2012]

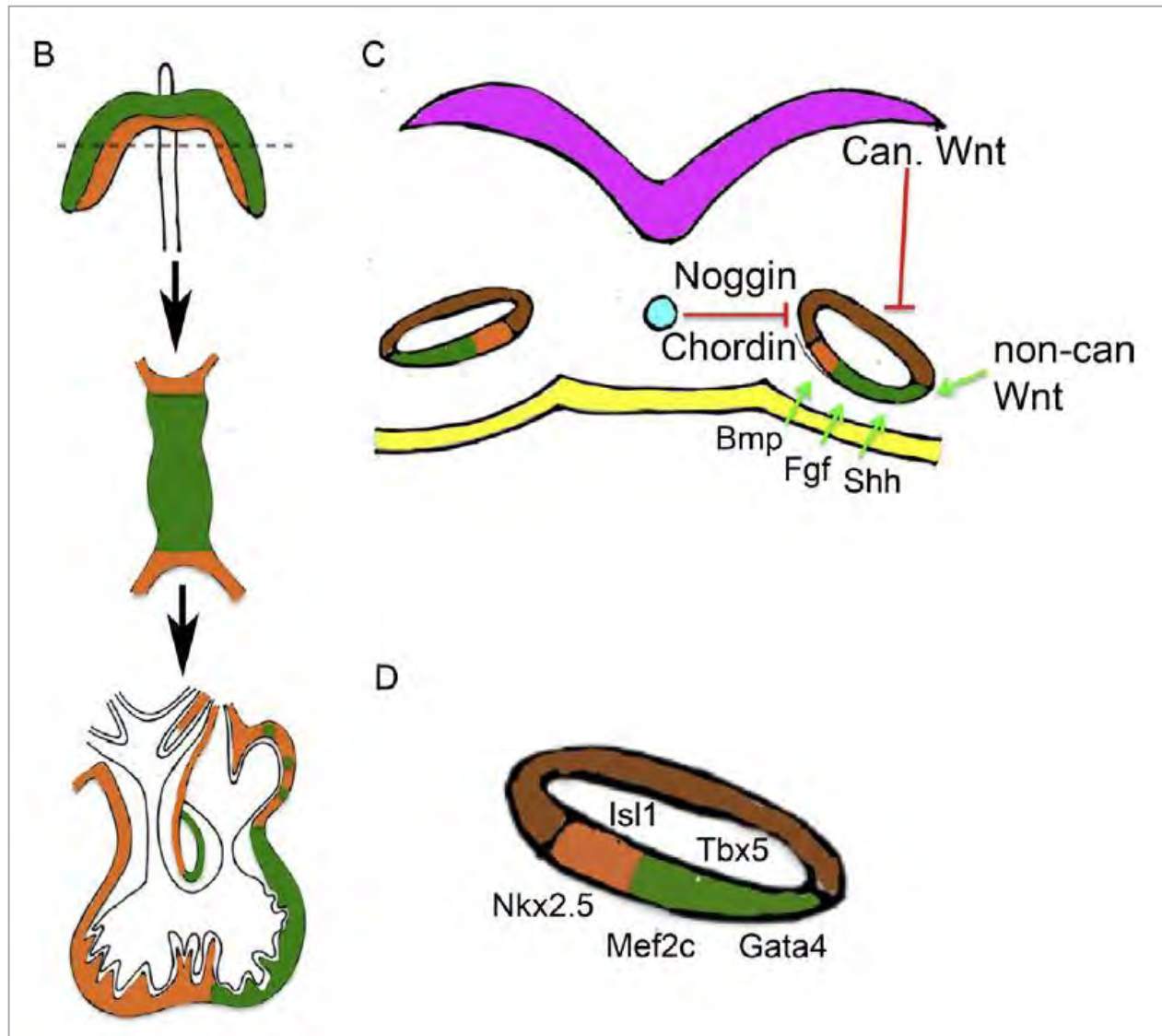
Figure 1-3: Contributions du premier et du second champs cardiaques dans la formation du système de conduction



Des études de lignées cellulaires réalisées à différentes étapes du développement embryonnaire suggèrent les contributions respectives du premier champ cardiaque (FHF, en vert) et du second champ cardiaque (SHF, en bleu) dans le développement des voies de conduction. Le noeud sinusal et la branche droite du faisceau de His dérivent du second champ cardiaque alors que le noeud atrioventriculaire, le tronc du faisceau de His et sa branche gauche dérivent du premier champ cardiaque.

Adapté de [Liang et al, 2015]

Figure 1-4: Champs cardiaques et induction des cardiomyocytes



B: Modèle des premier et second champs cardiaques actuellement admis dans l'organogénèse cardiaque. Les progéniteurs cardiaques proviennent de deux champs issus de l'embryon primitif. Les cellules du champ cardiaque primitif (en vert) forment le tube cardiaque primitif mais concernent uniquement le ventricule gauche, le canal atrioventriculaire et quelques portions du massif atrial dans le coeur définitif. Ceci est dû au fait que les cellules du second champ cardiaque (en orange) viennent former les poles crânial et caudal du tube cardiaque primitif et contribuent ainsi à la formation des voies d'éjection, du ventricule droit et de la majorité du massif atrial dans le coeur définitif à quatre cavités. La ligne en pointillé indique le niveau de la section de la coupe de l'image C; C: Des facteurs inhibiteurs, sécrétés par le tube neural et la notochorde, limitent la formation du mésoderme cardiaque alors que des facteurs de stimulation issus de l'endoderme et du mésoderme latéral stimulent la formation du mésoderme cardiaque; D: Les facteurs de transcription majeurs issus du mésoderme cardiaque initient une réaction en cascade qui résulte en la formation de cardiomyocytes différenciés.

Adapté de [Chaudhry et al, 2014]

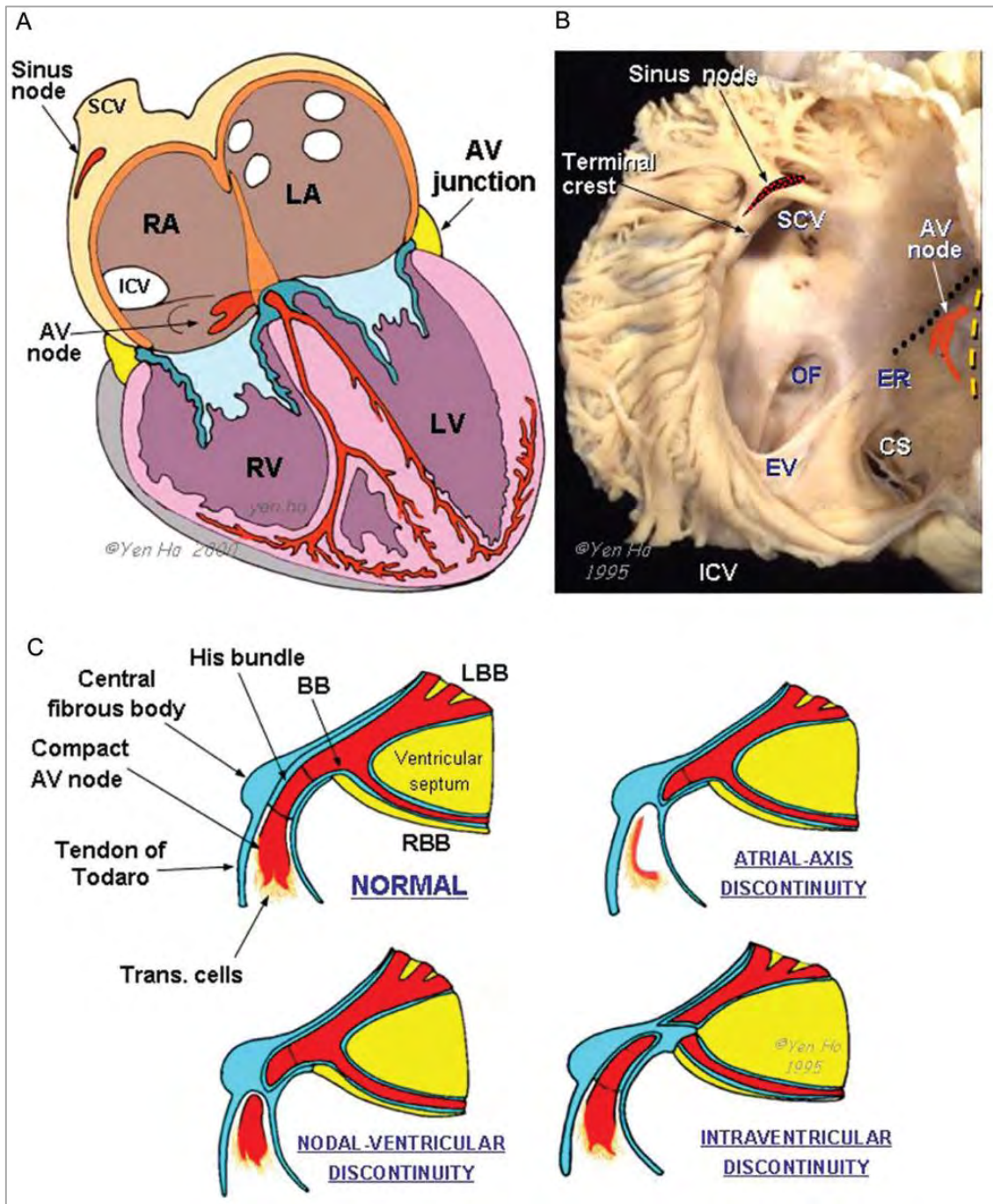
II.2- ANATOMIE

A la suite des travaux *princeps* de Tawara (1906), de Keith et Flack (1907) et d'Aschoff (1910), on sait que l'influx électrique naît du nœud sinusal, est conduit à travers le myocarde atrial selon des voies ayant des caractéristiques d'anisotropie hétérogènes, jusqu'au nœud atrioventriculaire (AV) [Kurian *et al*, 2010]. Au niveau du nœud AV, l'influx est ralenti pour laisser à la contraction atriale le temps nécessaire au remplissage ventriculaire. Il est ensuite transmis rapidement dans le tronc du faisceau de His, ses branches et le réseau des fibres de Purkinje pour déclencher une contraction synchrone des deux ventricules de l'apex vers la base, permettant ainsi l'éjection du sang dans les gros vaisseaux (Figure 1-5).

La localisation et les caractéristiques morphologiques du système de conduction ont été clarifiées au cours des dernières décades grâce à l'émergence des techniques d'immunohistochimie, qui ont permis de distinguer les cellules spécialisées dans la genèse (activité pacemaker) et la propagation (activité de conduction) de l'influx électrique, à la différence des autres cardiomyocytes responsables de la contraction du cœur [Moorman *et al*, 2005]. Le nœud sinusal, ou nœud de Keith et Flack, est situé à la jonction entre la veine cave supérieure et l'oreillette droite. Chez la majorité des individus, il est positionné juste sous la crête de l'auricule atrial droit (Figure 1-5) [Anderson *et al*, 1979].

Dans le cœur humain normal, le nœud atrioventriculaire est la seule structure myocardique qui permet de faire communiquer le massif atrial et le massif ventriculaire, à travers le plan des valves atrioventriculaires (Figure 1-6). Ce nœud AV est localisé au sommet d'une zone triangulaire située dans l'endocarde de l'oreillette droite, nommé le triangle de Koch (1909), et délimité par la continuation de la valve d'Eustachi, le tendon de Todaro et le feuillet septal de la valve tricuspide (Figure 1-7). Le sinus coronaire forme la base de ce triangle. Ce triangle comprend deux isthmes: l'isthme cavotricuspide, connu pour être impliqué dans les circuits responsables des formes communes de flutter atrial; et l'isthme septal situé entre le sinus coronaire et le feuillet septal de la tricuspide, qui correspond à la voie de conduction lente dans la jonction atrioventriculaire [Anderson *et al*, 2009]. Le nœud AV fait partie de la jonction atrioventriculaire qui est divisée en trois zones distinctes: la zone transitionnelle, la portion compacte et l'extension nodale inférieure en communication avec le tronc du faisceau de His [Dobrzynski *et al*, 2013; Boyett *et al*, 2009]. Cette approche anatomique est relativement corrélée à l'activité électrophysiologique des différents types cellulaires (Figures 1-8 et 1-9) [Dobrzynski *et al*, 2013; Brugada *et al*, 2013].

Figure 1-5: Système de conduction et jonction atrioventriculaire

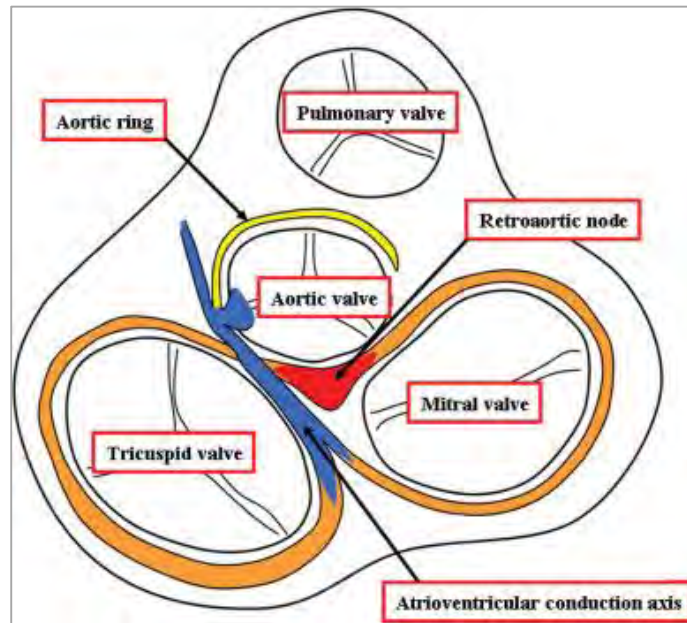


A: Représentation du système de conduction cardiaque; B: l'oreillette droite est ouverte pour montrer le triangle de Koch délimité par la valve tricuspide en avant, le tendon de Todaro en arrière, et le sinus coronaire en bas; C: Ces quatre images montrent les composantes normales de la jonction atrioventriculaire et les variétés anatomiques de discontinuité qui sont le substrat anatomique du bloc atrioventriculaire.

AV, atrioventriculaire; BB, branche du faisceau de His; LBB, branche gauche; EV, valve d'Eustachie; ICV, veines cave inférieure; LA, oreillette gauche; LV, ventricule gauche; RA, oreillette droite; RV, ventricule droit; Trans., transitionnel.

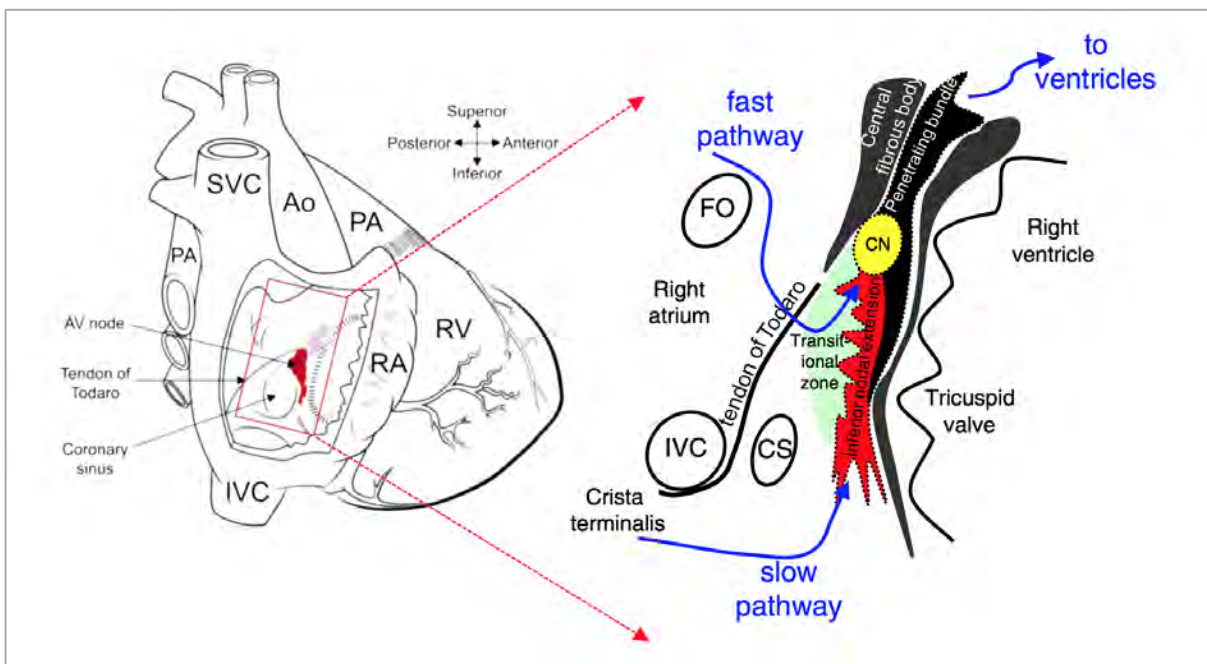
Adapté de [Brugada et al, 2013]

Figure 1-6: Le nœud atrioventriculaire, seule structure communiquant entre le massif atrial et le massif ventriculaire dans le cœur normal



Adapté de [Anderson *et al*, 2009]

Figure 1-7: Représentation schématique de la jonction atrioventriculaire

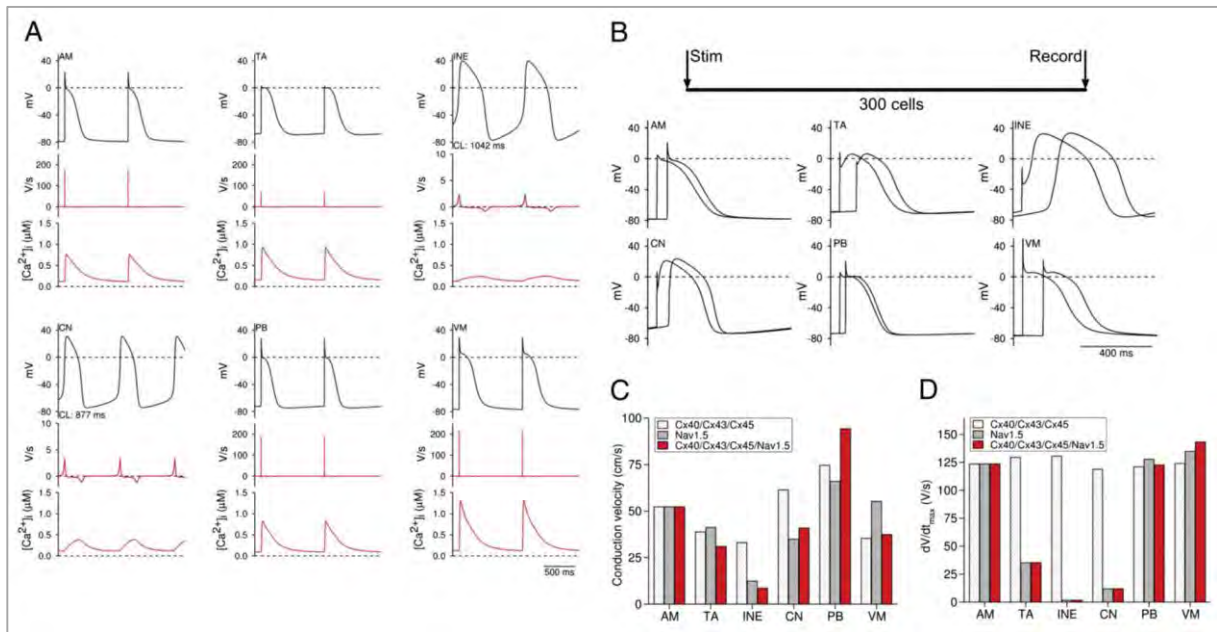


Adapté de [Dobrzynski *et al*, 2013]

La vascularisation du nœud AV dépend d'une branche de l'artère coronaire droite dans 90% des cas et d'une branche de l'artère circonflexe dans 10% des cas (Figure 1-10) [Kawashima *et al*, 2011]. Enfin comme le nœud sinusal, le nœud AV est richement innervé par des fibres sympathiques et parasympathiques, mais à l'inverse du nœud sinusal, les zones d'innervation par ses différentes fibres sont bien différenciées [James *et al*, 1967]. La stimulation par le parasympathique droit a moins d'effet sur le nœud AV que sur le nœud sinusal et inversement la stimulation parasympathique gauche entraîne une plus grande influence sur le nœud AV que sur le nœud sinusal.

Le faisceau de His est situé entre le noyau fibreux central et le septum membraneux. Il est localisé à la base du septum membraneux le long de la partie gauche de la crête du septum interventriculaire [Anderson *et al*, 2009]. Il peut parfois être situé sur la partie droite du septum, ce qui modifie la morphologie de la partie proximale des branches. L'anatomie de la branche gauche du faisceau de His est sujette à une grande variabilité interindividuelle. Le plus souvent, la branche gauche traverse le septum sous forme d'une large bande en dessous de la sigmoïde aortique non-coronaire. Parfois, l'origine de la branche gauche est fine même si elle provient d'un tronc du faisceau de His situé à la partie gauche du septum. En cas de tronc du faisceau de His situé à la partie droite du septum, la branche gauche est généralement fine. Le plus souvent, il n'existe pas de véritable division entre une branche antéro-supérieure et une branche postéro-inférieure de la branche gauche du faisceau de His. Lorsqu'une division entre ces deux héli-branches est présente, il y a de très nombreuses interconnexions entre ces héli-branches. Cependant, malgré la grande variabilité anatomique de la division de la branche gauche, la notion d'héli-branches antérieure et postérieure reste cliniquement intéressante [Elizari *et al*, 2007]. La branche droite du faisceau de His est située en dessous de la partie droite du septum interventriculaire en direction de l'apex du ventricule droit et vers la base du muscle papillaire antérieur. Les branches droites et gauches du faisceau de His se transforment ensuite en un réseau de fibres de Purkinje situées à la surface de l'endocarde des ventricules. L'entrelacement de ces fibres ayant une vitesse de conduction rapide permet à l'influx électrique d'arriver quasi simultanément dans l'ensemble de l'endocarde du ventricule droit et du ventricule gauche pour assurer – en physiologie – une contraction synchrone des deux ventricules.

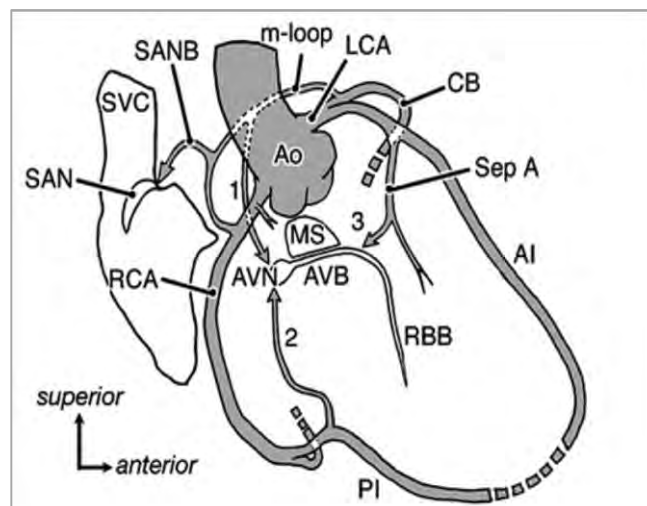
Figure 1-8: Propriétés électrophysiologiques du noeud atrioventriculaire



A: aspect du potentiel d'action dans le myocarde atrial (AM), la zone transitionnelle (TA), l'extension nodale inférieure (INE), la zone compacte (CN), le tronc du faisceau de His (PB) et le myocarde ventriculaire (VM) chez l'homme. La première ligne de chaque graphique montre le potentiel transmembranaire, la seconde ligne le taux de modification du potentiel transmembranaire, et la troisième ligne la concentration de calcium intracellulaire. B: vitesse de conduction dans chacune des 6 régions. C et D: vitesse de conduction et dV/dt_{max} dans chacune des six régions, en fonction de l'expression tissulaire des connexines et/ou du canal sodique.

Adapté de [Dobrzynski et al, 2013]

Figure 1-9: Vascularisation du noeud atrioventriculaire



Ao: aorte; AVB: tronc du faisceau de His; AVN: nœud atrioventriculaire; CB: artère circonflexe; LCA: tronc commun de la coronaire gauche; MS: septum interventriculaire membraneux; PI: artère interventriculaire postérieure; RBB: branche droite du faisceau de His; RCA: artère coronaire droite; SAN: nœud sinusal; SANB: artère du nœud sinusal; SVC: veine cave supérieure.

Adapté de [Kawashima et al, 2011]

II.3- ELECTROPHYSIOLOGIE DU SYSTÈME DE CONDUCTION CARDIAQUE

Les cellules cardiaques sont entourées d'une membrane formée d'une bicouche lipidique imperméable à l'eau et aux ions mais traversée par des structures protéiques hydrophiles constituent des canaux qui, lorsqu'ils sont ouverts, laissent passer les ions et génèrent donc ainsi un courant. Lorsqu'elles sont excitées par un stimulus (électrique, mécanique, chimique), les cellules répondent par un potentiel d'action qui traduit les variations du potentiel membranaire en fonction du temps. Le potentiel d'action (PA) est responsable de la propagation de l'influx nerveux. Il s'agit donc 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 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- à travers les canaux ioniques spécifiques dépendants du potentiel et des échangeurs sont responsables du PA. La morphologie des PA est différente d'un type cellulaire à l'autre, selon que les cellules sont spécialisées dans l'automatisme, l'excitabilité, ou la conduction. Il existe également une hétérogénéité régionale (ventriculaire/auriculaire, épicarde/myocarde/endocarde). Cette hétérogénéité est due à une expression topologique différentielle des canaux ioniques [Gaborit *et al.* 2007].

Le potentiel d'action des cardiomyocytes contractiles comprend cinq phases (Figure 1-11):

a/ la phase 0, dite de dépolarisation (annulation voire inversion du potentiel membranaire, l'extérieur de la cellule devenant négatif par rapport à l'intérieur, Figure 1-11) due à l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants (principalement $NaV1.5$ codé par *SCN5A*) et au courant I_{Na} . Elle entraîne l'activation d'autres canaux ioniques dépendants du potentiel.

Les phases 1 à 3 du potentiel d'action représentent la repolarisation. Elles sont dues à l'action conjuguée de courants repolarisants (principalement potassiques) et dépolarisants (principalement calciques):

b/ la phase 1: repolarisation initiale rapide mais incomplète et brève.

c/ la phase 2: phase de plateau.

d/ la phase 3: repolarisation terminale relativement lente ramenant le potentiel membranaire à sa valeur de repos.

e/ la phase 4: phase diastolique pendant laquelle le potentiel reste à sa valeur de repos (période réfractaire), ou dans les cellules douées d'automatisme, décrit une depolarization diastolique lente jusqu'au potentiel seuil (Figure 1-12).

Ces variations de potentiel de membrane sont dues à des mouvements ioniques transmembranaires passifs. Les variations de conductance (perméabilité de la membrane à l'ion considéré) dépendent de l'ouverture et de la fermeture des canaux membranaires, régis par 4 paramètres: (a) chaque canal est généralement spécifique pour un ion donné (filtre de sélectivité); (b) la majorité de ces canaux sont voltage-dépendants, c'est -à-dire que chargés électriquement, ils s'ouvrent (activation) ou se ferment (inactivation) en fonction du potentiel membranaire qui modifie leur conformation moléculaire; (c) chaque canal obéit à la loi du tout ou rien (il est soit ouvert, soit fermé): l'intensité du courant généré est donc fonction du nombre de canaux ouverts et la probabilité d'ouverture du canal est fonction du niveau du potentiel membranaire; (d) le gain de fonction ou la perte de fonction d'un canal peut modifier le potentiel d'action et générer des troubles de conduction et/ou des arythmies cardiaques; cette modification fonctionnelle peut resulter d'une altération canalaire directe (mutation de la protéine) ou indirecte via la modification de l'environnement de ce canal (protéine partenaire, trafic canalaire)

Figure 1-11: Canaux ioniques et modification du potentiel membranaire

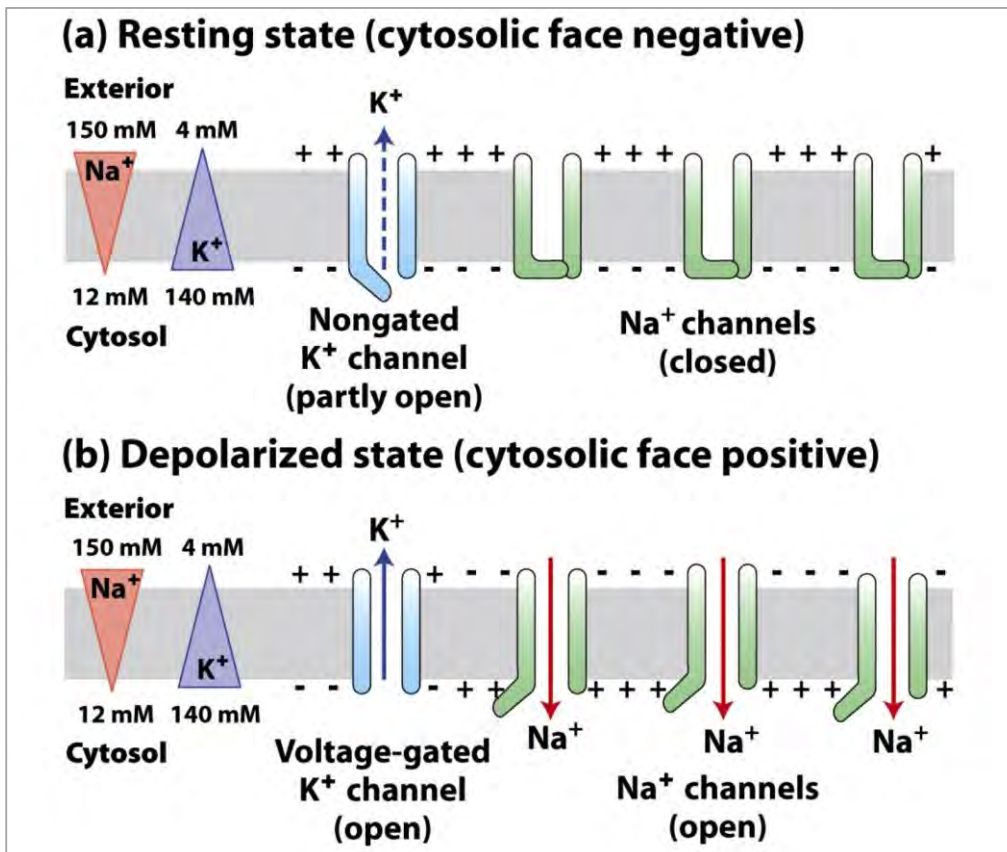
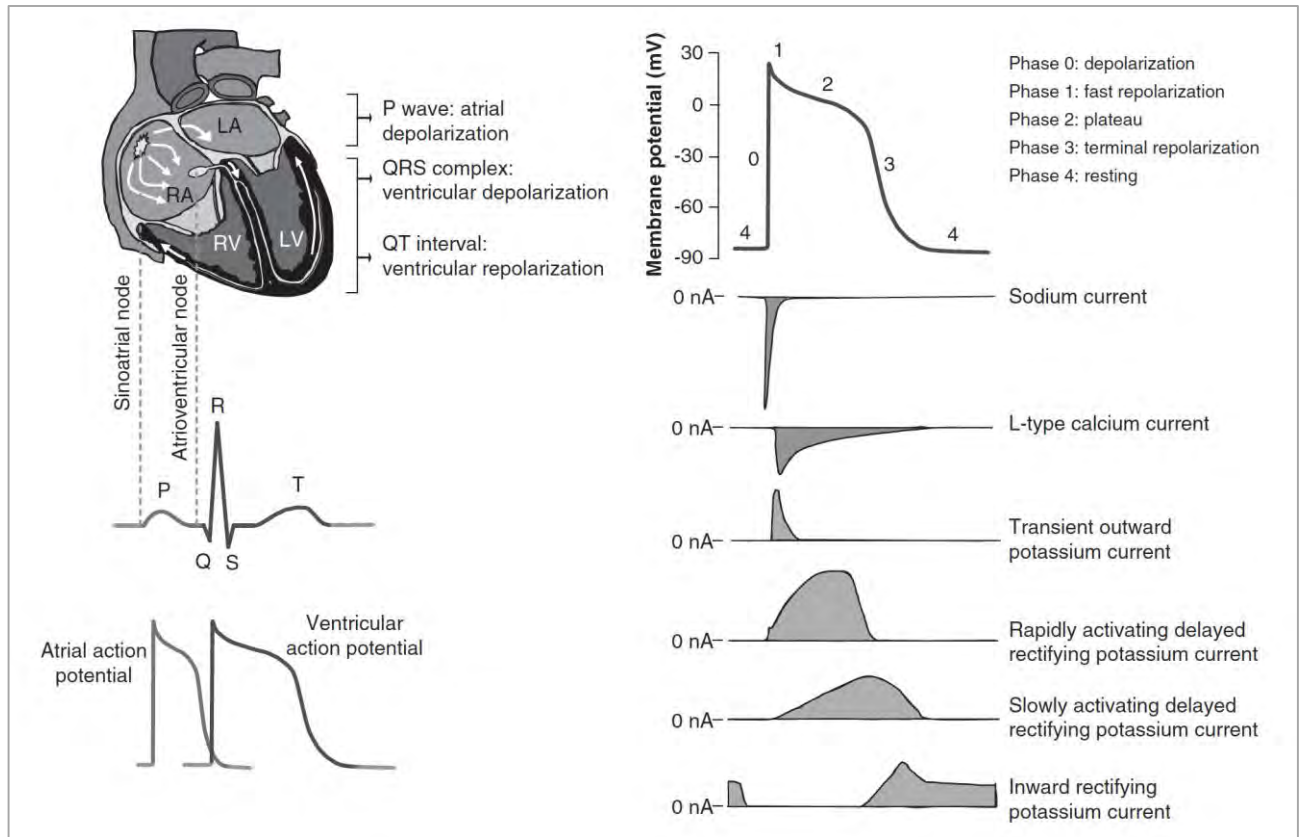


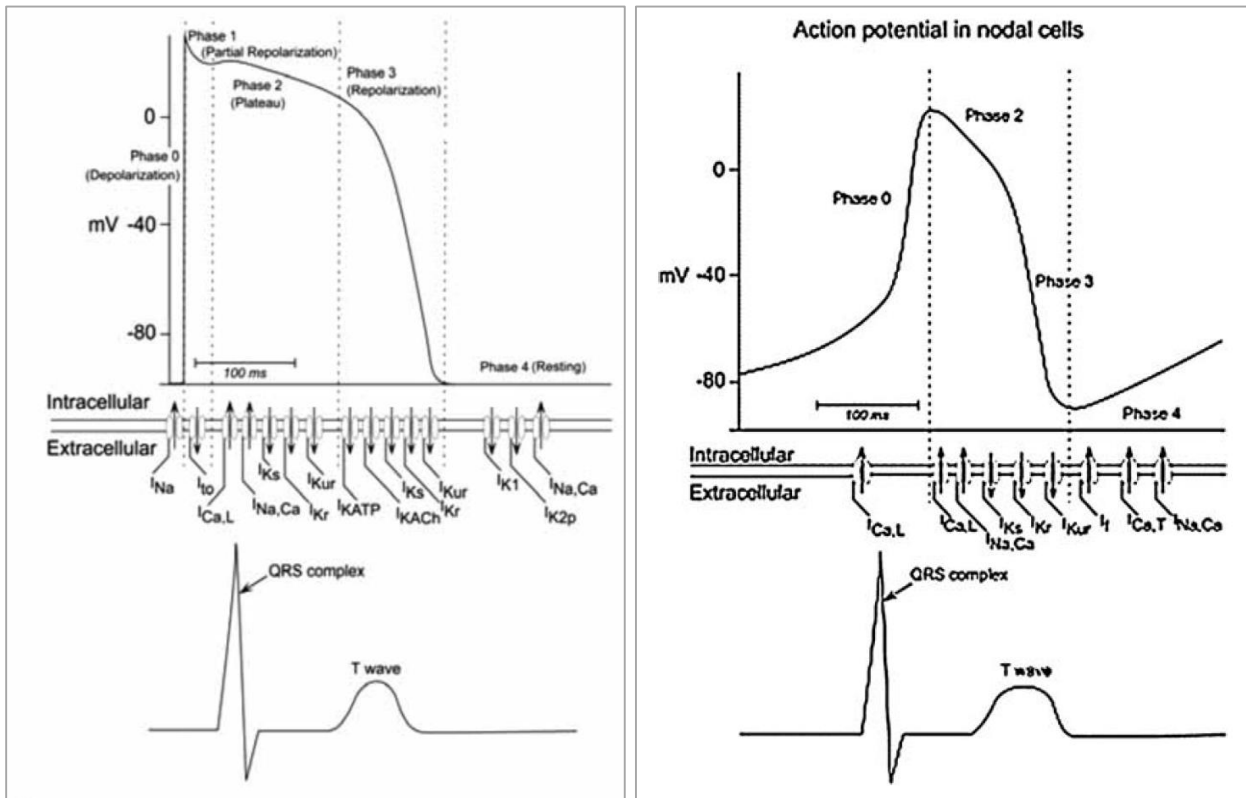
Figure 1-10: Principaux courants ioniques responsables des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains et canaux ioniques associés



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.

Adapté de [van Hoesjen et al, 2014]

Figure 1-12: Potentiel d'action dans les cardiomyocytes sans activité pacemaker (image de gauche) et dans les cellules nodales douées d'automatisme (image de droite)



Le potentiel d'action des cellules nodales douées d'automatisme diffère en phase 4 de celui d'un autre cardiomyocyte. Une depolarisation diastolique lente apparait en phase 4, due à une courant calcique entrant et permet à la cellule d'atteindre son seuil de depolarisation spontanée.

Adapté de [Wolf et al, 2006 et Wolf et al, 2008]

II.4- ANOMALIES GÉNÉTIQUES DU SYSTÈME DE CONDUCTION CARDIAQUE

A ce jour, des mutations dans de nombreux gènes ont été identifiées comme étant responsables d'anomalies de la conduction cardiaque (Tableau 1-1 et Figure 1-13).

II.4.1- Troubles de l'automatisme

Des mutations ont été identifiées chez l'homme, qui, parce qu'elles perturbent l'horloge de voltage membranaire (*SCN5A* et *HCN4*), l'horloge calcique (*RYR2* et *CASQ2*) ou les deux à la fois (*ANKB*), altèrent le fonctionnement du noeud sinusal [Lakatta *et al.* 2010; Joung *et al.* 2009].

SCN5A (3p22.2). Plus de 14 mutations du gène *SCN5A* ont été identifiées comme responsables de formes héréditaires de dysfonction sinusale [Lei *et al.* 2002; Ruan *et al.*, 2009]. Benson *et al.* ont identifié 6 mutations de *SCN5A* chez 3 membres d'une même famille qui étaient atteints de dysfonction sinusale congénitale [Benson *et al.* 2003]. Ces derniers présentaient une hétérozygotie composite à l'égard des 6 allèles de *SCN5A* (G1408R+P1298L, T220I+R1623X, delF1617+R1632H). L'étude biophysique a montré que 2 de ces 6 mutations entraînaient une perte de fonction des canaux alors que T220I, P1298L et delF1617 avaient pour effets de diminuer la densité du courant I_{Na} et de provoquer un déplacement de la courbe d'inactivation voltage-dépendante dans le sens d'une hyperpolarisation. Smits *et al.* ont, par ailleurs, découvert une nouvelle mutation de *SCN5A*, E161K, chez deux individus appartenant à la même famille et qui présentaient une dysfonction symptomatique du noeud sinusal, un trouble généralisé de la conduction et un syndrome de Brugada, en lien avec une diminution de la densité du courant I_{Na} à un niveau 3 fois inférieur à la normale et un déplacement positif de la courbe d'activation voltage-dépendante [Smits *et al.* 2005]. Le déplacement négatif de l'inactivation voltage-dépendante et le déplacement positif de l'activation voltage-dépendante ont tous deux pour effet de réduire la fenêtre du courant I_{Na} . *SCN5A* est exprimé par les cellules périphériques du NS, mais ne l'est pas par les cellules centrales, qui sont les principales structures génératrices de l'influx électrique. En ayant recours à une simulation informatique, Butters *et al.* ont proposé un mécanisme visant à expliquer comment les mutations de *SCN5A* exprimées par les cellules de la portion périphérique du noeud sinusal perturbent l'automatisme des cellules centrales [Butters *et al.* 2010]. L'oreillette impose au noeud sinusal une importante charge hyperpolarisante qui est contrebalancée par l'expression de *SCN5A* dans les cellules périphériques [Butters *et al.* 2010; Fedorov *et al.* 2009]. De ce fait, la diminution du courant I_{Na} dans ces dernières contraint les cellules centrales à décharger davantage de potentiels hyperpolarisés, ce qui ralentit la fréquence des impulsions. De plus, une altération de la conduction des potentiels d'action a été objectivée au

Tableau 1-1: Bases génétiques des anomalies du système de conduction cardiaque

| Gène (locus) Protéine | MIM number | Anomalie de la conduction | Pathologies associées |
|---|---------------|---|---|
| Canaux ioniques | | | |
| SCN5A (3p22.2) Nav1.5 | 600163 | Dysfonction sinusale, paralysie atriale, maladie de Lenègre, BAV, Bloc de branche | Syndrome de Brugada et LQT3, fibrillation atriale, CMD |
| SCN1B (19q13.12) Scn1b | 600235 | Maladie de Lenègre | Syndrome de Brugada, fibrillation atriale, épilepsie |
| SCN10A (3p22.2) Nav1.8 | 604427 | BAV, bloc de branche | Syndrome de Brugada |
| TRPM4 (19q13.33) Trpm4 | 606936 | Maladie de Lenègre | Syndrome de Brugada |
| KCNJ2 (17q.24.3) Kir2.1 | 600681 | BAV, bloc de branche | Synd. d'Andersen-Tawil, fibrillation atriale, SQT3 |
| KCNK17 (6p21.2) TASK-4 | 607370 | BAV, bloc de branche | Tachycardie ventriculaire |
| HCN4 (15q24.1) HCN4 | 605206 | Bradycardie sinusale | Syndrome de Brugada, fibrillation atriale, non compaction du VG |
| Protéines de transport du Ca²⁺ | | | |
| RYR2 (1q43) Ryr2 | 180902 | Dysfonction sinusale, paralysie atriale, BAV | TVPC, DAVD, maladie d'Alzheimer |
| CASQ2 (1p13.1) Calséquestrine | 114251 | Bradycardie sinusale | TVPC |
| Jonctions communicantes | | | |
| GJA5 (1q21.2) Connexine 40 | 121013 | Paralysie atriale, BAV | Fibrillation atriale |
| Facteurs de transcription | | | |
| NKX2.5 (5q35.1) Nkx2.5 | 600584 | BAV, bloc de branche | Cardiopathies congénitales hypothyroïdie congénitale |
| TBX5 (12q24.21) Tbx5 | 601620 | Bradycardie sinusale, BAV, bloc de branche | Synd. de Holt-Oram |
| Protéines de la membrane nucléaire | | | |
| LMNA (1q22) Lamine A/C | 150330 | BAV | Cardiomyopathie dilatée, dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, maladie de Charcot-Marie-Tooth, lipodystrophie familiale |
| Protéines adaptatrices membranaires | | | |
| ANKB (4q25-q26) Ankyrine B | 600919 | Dysfonction sinusale, variabilité de la fréquence cardiaque | LQT4, syndrome Ankyrin-B |
| Régulateurs métaboliques | | | |
| PRKAG2 (7q36.1) Sous-unité G de l'AMPK | 602743 | BAV, Synd. de WPW | CMH, Glycogénose |
| Facteur de croissance transformant beta | | | |
| BMP2 (20p12.3) Protéine morphométrique osseuse de type 2 | 112261 | Synd. de WPW | brachydactylie |
| Défaut d'épissage | | | |
| SNT 3' de DMPK (19q13.32) | 605377 | BAV, Bloc de branche | Dystrophie myotonique de type I (maladie de Steinert) |

MIM: Mendelian Inheritance in Man; BAV: bloc atrioventriculaire; BrS: syndrome de Brugada; LQT: syndrome du QT long; SQT: syndrome du QT court; CMD: cardiomyopathie dilatée; CMH: cardiomyopathie hypertrophique; VG: ventricule gauche; TVPC: tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique; DAVD: dysplasie arythmogène du ventricule droit; cardiom.: cardiomyopathie; AMPK: protéine kinase activée par l'AMP; WPW: Wolff-Parkinson-White; SNT: séquence non traduite.

sein des préparations oreillette-nœud sinusal, laquelle prédispose au développement d'un bloc sinusal de sortie, couramment observé dans les dysfonction sinusales familiales [Butters *et al.* 2010].

HCN4 (15q24.1). Des mutations d'*HCN4* ont été identifiées chez des patients atteints de dysfonction sinusale [Liu *et al.* 2010; Biel *et al.* 2009]. En employant une stratégie fondée sur les gènes candidats, Schulze-Bahr *et al.* ont mis en évidence une délétion mononucléotidique affectant *HCN4* (1631delC) chez un patient présentant une bradycardie sinusale couplée à une incompetence chronotrope [Schulze-Bahr *et al.* 2003]. Le mutant 1631delC est dépourvu du domaine de liaison des nucléotides cycliques, ce qui le rend insensible à l'AMPc. D'autres mutations d'*HCN4* ont été identifiées dans 2 familles dont des membres étaient atteints de bradycardie sinusale asymptomatique. Les 2 mutations faux-sens, S672R et G480R, contribuaient à ce que l'activation des canaux se produise pour de plus hauts niveaux d'hyperpolarisation, de sorte que la densité des courants générés pendant la dépolarisation diastolique était diminuée [Milanesi *et al.* 2006; Nof *et al.* 2007]. Les travaux menés sur des modèles murins dépourvus de canaux HCN conduisent à penser que le gène *HCN4* est indispensable au développement et au chronotropisme du nœud sinusal au cours de l'embryogenèse, mais que, à l'âge adulte, il pourrait ne jouer qu'un rôle de renfort consistant à contrecarrer l'hyperpolarisation membranaire des cellules du nœud sinusal [Ludwig *et al.* 2008; Herrmann *et al.* 2007; Hoesl *et al.* 2008]. Ces données sont en accord avec le phénotype de bradycardie bénigne mis en évidence par Milanesi *et al.* et par Nof *et al.* dans 2 familles porteuses de mutations d'*HCN4* [Milanesi *et al.* 2006; Nof *et al.* 2007]. La conservation de la compétence chronotrope dans les modèles humains et expérimentaux de délétion d'*HCN4* est en faveur de l'existence d'autres mécanismes régissant l'automatisme du nœud sinusal et sa réponse aux stimuli sympathiques.

RYR2 (1q43) et CASQ2 (1p13.1). Les mutations des gènes qui codent pour les protéines régissant les mouvements du calcium au sein du réticulum sarcoplasmique sont responsables d'une dysfonction du nœud sinusal. En effet, la bradycardie sinusale est une manifestation courante de la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC), trouble du rythme héréditaire qui se caractérise par le développement d'une tachycardie ventriculaire bidirectionnelle ou polymorphe en réponse à un stress adrénergique et ce, en l'absence de cardiopathie structurale. Deux gènes responsables de TVPC ont été identifiés chez l'homme à ce jour; il s'agit des gènes codant respectivement pour le récepteur cardiaque à la ryanodine (RYR2) et pour la calséquestrine cardiaque (CASQ2). Le récepteur cardiaque à la ryanodine est le principal canal par lequel est libéré le calcium issu du réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes. La calséquestrine, qui est la première protéine de stockage du calcium dans le

réticulum sarcoplasmique, forme un complexe avec RYR2. Les mutations affectant ces protéines altèrent le processus de libération du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique, ce qui entraîne un efflux spontané d'ions Ca^{2+} sous l'action des catécholamines, avec pour conséquences un retard à la postdépolarisation et une activité déclenchée [Rizzi *et al.* 2008; Liu *et al.* 2006]. Postma *et al.* ont décelé 13 mutations faux-sens de RYR2 dans 12 familles à TVPC [Postma *et al.* 2005]. Ces familles totalisaient 54 membres porteurs d'une de ces mutations, qui présentaient tous une bradycardie sinusale de repos en l'absence de traitement médicamenteux. Il a récemment été décrit une forme de TVPC caractérisée par une amplification des manifestations de cardiomyopathie dilatée, de dysfonction du noeud sinusal, de bloc auriculo-ventriculaire progressif, de fibrillation atriale et de paralysie atriale, en lien avec une délétion génomique encadrée intéressant l'exon 3 de RYR2 [Bhuiyan *et al.* 2007]. La bradycardie sinusale est également une manifestation caractéristique des TVPC liées à une mutation de CASQ2. Postma *et al.* ont ainsi identifié 3 mutations non-sens de ce gène chez 3 membres de la même famille qui étaient atteints de TVPC et qui présentaient une bradycardie sinusale [Postma *et al.* 2002]. Le lien observé entre la bradycardie sinusale et les mutations affectant les gènes codant pour les protéines de transport du calcium au sein du RS conforte un peu plus l'hypothèse selon laquelle l'horloge calcique jouerait un rôle dans la conduction sino-auriculaire.

ANKB (4q25-q26). Les mutations du gène codant pour l'ankyrine B (*ANKB*) sont responsables de syndromes du QT long de type 4 et de formes familiales de maladie du sinus [Mohler *et al.* 2003; Le Souarnec *et al.* 2008]. L'*ANKB* est indispensable à un ancrage correct des canaux ioniques et des transporteurs aux domaines membranaires correspondants. Les souris présentant une haplo-insuffisance du gène *ANKB* (*AnkB*^{+/-}) développent une bradycardie sinusale marquée et une variabilité de la fréquence cardiaque de repos. L'analyse biochimique a révélé que l'un des échangeurs sodium-calcium (*NCX1*), la Na/K-ATPase (*NKA*), le récepteur IP3 (*IP3R*) et Cav1.3 présentaient tous une expression diminuée ainsi qu'un trouble de leur ancrage. Il apparaît donc que la dysfonction du nœud sinusal engendrée par les mutations d'*ANKB* résulte très vraisemblablement de la réduction des courants ioniques intervenant dans les deux types d'horloges décrits plus haut.

II.4.2- Blocs de conduction

Un bloc de conduction peut se produire à n'importe quel niveau du SCC sous la forme d'un bloc de sortie sino-auriculaire, d'un bloc auriculo-ventriculaire, d'un bloc infra-hissien ou d'un bloc de branche. Le trouble de la conduction peut être dû à l'altération d'un canal ionique ayant pour effet de modifier le profil des potentiels d'action ou à une anomalie de couplage entre les cardiomyocytes. Les troubles de la conduction cardiaque à caractère héréditaires résultent de

mutations de *SCN5A*, *SCN1B* et *TRPM4* (qui affectent la phase 0) ou de *KCNJ2* (qui altère les phases 3 et 4). L'excitabilité cardiaque normale n'est possible que si Nav1.5 et Kir2.1 (codé par *KCNJ2*) fonctionnent de façon correcte.

SCN5A (3p22.2). Le trouble progressif de la conduction cardiaque, ou maladie de Lev-Lenègre familiale, résulte d'une dégénérescence fibroscléreuse du faisceau de His-Purkinje liée à l'âge [Probst *et al.* 2003]. La propagation des influx électriques au sein du système de conduction ventriculaire proximal diminue progressivement, ce qui provoque des blocs de branche puis un bloc atrio-ventriculaire complet. Certaines mutations avec perte de fonction de *SCN5A* sont à l'origine d'une forme héréditaire de la maladie de Lev-Lenègre qui peut être isolée ou coexister avec un syndrome de Brugada ou un syndrome du QT long de type 3 [Probst *et al.* 2003]. Le trouble familial progressif de la conduction cardiaque sous-tend un risque élevé de bloc atrio-ventriculaire complet et de syncope d'Adams-Stokes sans dysrythmie ventriculaire [Kyndt *et al.* 2001]. Schott *et al.* ont identifié une mutation de *SCN5A* héritée conjointement à la maladie de Lenègre dans une vaste famille française [Schott *et al.* 1999]. Les individus atteints présentaient des troubles de la conduction de degré variable, ayant nécessité l'implantation d'un stimulateur cardiaque chez 4 d'entre eux en raison d'épisodes syncopaux ou d'un bloc atrio-ventriculaire complet. L'analyse de liaison génétique et le séquençage du gène candidat ont permis de mettre en évidence une substitution T>C en position +2 du site d'épissage donneur de l'intron 22 (IVS22+2 T>C), laquelle aboutit à un mutant dépourvu du segment sensible au voltage. L'analyse fonctionnelle a montré qu'aucun courant sodique entrant transitoire n'était généré en réponse à la dépolarisation, ce qui est en faveur d'une mutation avec un effet perte de fonction [Probst *et al.* 2003]. Dans une seconde famille hollandaise dont les apparentés présentaient des troubles de conduction étagés apparemment non progressifs associant BAV du premier degré et bloc de branche droite, une mutation de *SCN5A* résultant en un codon stop prématuré a été identifiée [Schott *et al.* 1999]. D'autres mutations du gène *SCN5A* associées à des troubles de conduction volontiers étagés, atrioventriculaires et/ou intraventriculaires, ont par la suite été publiées, faisant de *SCN5A* un gène majeur responsable d'anomalies de la conduction cardiaque [Tan *et al.* 2001; Wang *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 2003].

SCN1B (19q13.12). La majorité des patients atteints d'un syndrome de Brugada et d'un trouble de la conduction ne sont pas porteurs d'une mutation de *SCN5A*. C'est pourquoi les stratégies de séquençage des gènes candidats sont aujourd'hui centrées sur les modificateurs de l'expression ou de la fonction de Nav1.5. Watanabe *et al.* ont ainsi découvert des mutations de *SCN1B* dans 3 familles présentant des troubles de la conduction associés ou non à un syndrome de Brugada [Watanabe *et al.* 2008]. Chez ces individus, l'expression des sous-unités β mutantes

conjointement à celle de Nav1.5 avait pour effet de diminuer la densité du courant sodique.

SCN10A (3p22.2). Des études d'association pangénomique ont mis en évidence une association entre le gène *SCN10A*, codant pour le canal sodique Nav1.8, et la conduction atrioventriculaire ainsi que le syndrome de Brugada [Pfeufer *et al*, 2010; Bezzina *et al*, 2013]. Bien que le mécanisme causal exact des mutations *SCN10A* dans ces phénotypes cardiaques reste à éclaircir, il a été montré récemment que *SCN10A* régule l'expression de *SCN5A*, ce qui pourrait permettre d'expliquer son implication dans les troubles de conduction et dans le syndrome de Brugada [Hu *et al*, 2014; van den Boogaard *et al*, 2014].

TRPM4 (19q13.33). Le gène *TRPM4* (Transient receptor potential channel melastatin 4) code pour un canal cationique non sélectif activé par le calcium intracellulaire. Dans le coeur, on observe une répartition différentielle de ce canal selon le territoire considéré, *TRPM4* étant particulièrement exprimé dans le noeud sinusal, le massif atrial et le système de conduction cardiaque. Des études récentes ont mis en évidence des mutations du gène *TRPM4* chez l'homme dans le syndrome de Brugada [Liu *et al*, 2013] et les troubles de conduction atrioventriculaire et/ou intraventriculaire [Kruse *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010; Stallmeyer *et al*, 2012]. *TRPM4* a également été impliqué sur des modèles murins dans la régulation du rythme sinusal [Hof *et al*, 2013; Little *et al*, 2013] et l'hypertrophie myocardique [Demion *et al*, 2014; Kecskes *et al*, 2015]. A ce jour, 18 variants alléliques de *TRPM4* ont été associés à des troubles de conduction, suggérant que ce gène est un gène de susceptibilité important pour les anomalies de la conduction cardiaque chez l'homme [Kruse *et al*, 2014].

Le mécanisme des mutations *TRPM4* associées aux troubles de conduction correspond à un effet gain-de-fonction par dérégulation de la desumoylation (mécanisme de modification protéique posttranslationnelle) du canal *TRPM4*, qui a pour conséquence d'altérer l'endocytose du canal muté et donc d'augmenter la concentration de ce canal *TRPM4* à la surface de la cellule, sans modifier ses propriétés fonctionnelles [Kruse *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010]. Le phénotype des troubles conductifs associés à des mutations de *TRPM4* est très proche de celui associé à des mutations de *SCN5A*, si bien que ces deux canaux pourraient s'influencer mutuellement, faire partie de la même voie physiopathologique impliquée dans la genèse et la propagation de l'influx électrique [Abriel *et al*, 2012] ou cette constatation pourrait traduire le fait que l'activité principale du canal *TRPM4* est de donner lieu à un courant sodique entrant [Kruse *et al*, 2014].

KCNJ2 (17q24.3). Des mutations de *KCNJ2* ont été mises en évidence dans une affection autosomique dominante rare appelée syndrome d'Andersen-Tawil, qui associe une paralysie périodique, des anomalies morphologiques, une tachycardie ventriculaire polymorphe et un trouble de la conduction cardiaque [Almuqbil *et al*. 2015; Andelfinger *et al*. 2002; Plaster *et al*.

2001]. Les analyses électrocardiographiques pratiquées chez 96 sujets atteints de ce syndrome et qui appartenaient à 33 groupes familiaux distincts ont objectivé des altérations de la conduction intéressant différents étages depuis le nœud atrio-ventriculaire jusqu'au système de conduction distal [Zhang *et al.* 2005; Nguyen *et al.* 2013]. Dans les cardiomyocytes exprimant une sous-unité dominante négative de Kir2.1, la densité du courant I_{K1} était diminuée de 95 %, ce qui avait pour effet d'allonger notablement la durée des potentiels d'action. L'utilisation de modèles murins de syndrome d'Andersen-Tawil a montré que cette affection entraîne une diminution de la fréquence cardiaque et un ralentissement important de la conduction [McLerie *et al.* 2003].

KCNK17 (6p21.2). Le gène *KCNK17* code pour la protéine TASK-4, un canal potassique qui contribue au potentiel membranaire de repos. La protéine TASK-4 est exprimée dans le nœud atrioventriculaire et le réseau de Purkinje. Il a été récemment montré à propos d'un case report qu'une mutation de *KCNK17* ayant un effet gain-de-fonction du canal TASK-4 peut aggraver un ralentissement de la conduction causé par une mutation perte-de-fonction du canal sodique [Friedrich *et al.* 2014].

II.4.3- Voies de conduction accessoires

Le syndrome de Wolff-Parkinson-White (WPW) est dû à la pré-excitation du myocarde ventriculaire par l'intermédiaire d'une voie de conduction accessoire (le faisceau de Kent) qui court-circuite la voie de conduction lente physiologique passant par le nœud atrio-ventriculaire. Une telle pré-excitation ventriculaire est fréquente, la prévalence du trouble variant de 1,5 à 3 cas pour 1.000 [Gollob *et al.* 2001]. L'examen histologique de faisceaux de Kent prélevés chez des sujets humains a révélé que ces derniers étaient constitués de myocytes ventriculaires d'aspect normal exprimant la connexine 43 (Cx43) [Peters *et al.* 1994]. L'expression de jonctions communicantes à haute conductance permet à ces voies accessoires de pré-exciter le myocarde ventriculaire, cela se traduisant sur le tracé électrocardiographique par des espaces PR raccourcis et par des complexes QRS empâtés, liés à l'existence d'une « onde delta ». Le syndrome de WPW est un trouble essentiellement sporadique dont le mécanisme sous-jacent demeure inconnu; toutefois, de rares formes héréditaires ont été décrites [Koneru *et al.* 2012; Cohen *et al.* 2012]. Près de 3,5% des propositus atteints d'un syndrome de WPW auraient au moins un parent au premier degré présentant une voie de conduction accessoire [Vidaillet *et al.* 1987].

PRKAG2 (7q36.1). Des mutations de *PRKAG2* sont responsables d'une forme héréditaire de syndrome de WPW transmise sur le mode autosomique dominant [Liu *et al.*, 2013; Gollob *et al.*, 2001]. Le phénotype est marqué par une hypertrophie cardiaque, une pré-excitation ventriculaire et des troubles de conduction [Fabris *et al.*, 2013; Sternick *et al.*, 2011].

BMP2 (20p12.3). Une autre forme de syndrome de WPW résultant de la microdélétion de la région codant pour la protéine morphogénétique osseuse (PMO) de type 2 (Bmp2) au sein de 20p12.3 a été décrite. Elle se caractérise par la présence de déficits cognitifs variables et de troubles morphologiques [Lalani *et al.*, 2009; Sternick *et al.*, 2011; Le Gloan *et al.*, 2008]. Les PMO appartiennent à la superfamille des facteurs de croissance transformants β et jouent un rôle essentiel dans le développement cardiaque [Stroud *et al.* 2007].

II.4.4- Anomalies du développement des voies de conduction

Les cardiopathies congénitales sont les plus fréquentes des affections présentes à la naissance, touchant 1 à 2 % des nouveau-nés [Hoffman *et al.* 2002]. Les troubles du rythme peuvent être la conséquence d'anomalies de la spécification et/ou de la structuration du SCC, d'une malformation ou d'un refoulement des voies de conduction, d'altérations hémodynamiques, d'une hypoxie prolongée ou de séquelles postopératoires. Sur le plan embryologique, le système de conduction est issu des précurseurs cellulaires myocardiques présents dans le coeur foetal. C'est l'expression régionale de facteurs de transcription qui régit le processus conduisant ces cellules à se différencier en une lignée destinée à assurer la conduction cardiaque plutôt qu'en des cardiomyocytes [Bruneau *et al.* 2001; Christoffels *et al.* 2010; Moskowitz *et al.* 2007]. Les principaux facteurs de transcription identifiés à ce jour comme intervenant dans le développement du SCC humain sont les facteurs à boîte T et à boîte homéotique.

NKX2.5 (5q35.1). Le gène *NKX2.5*, qui appartient à la famille des homéodomaines, joue un rôle clé dans l'induction et le maintien du SCC. Les membres de cette famille partagent tous la même séquence conservée de liaison à l'ADN constituée de 60 acides aminés à laquelle a été donné le nom de boîte homéotique. Ces facteurs de transcription sont indispensables à l'organogenèse, car ils contrôlent la spécification et la différenciation des tissus. Le rôle de *NKX2.5* dans le développement du SCC humain a été établi à la suite de la découverte de mutations du gène correspondant au sein de 4 familles dont des membres étaient atteints de cardiopathie congénitale non syndromique et de bloc de la conduction auriculoventriculaire [Schott *et al.* 1998]. L'étude généalogique était en faveur d'un mode de transmission autosomique dominant et l'anomalie structurale la plus fréquente était une communication inter-auriculaire de type ostium secundum. A ce jour, de nombreuses substitutions mononucléotidiques intéressant *NKX2.5* ont été répertoriées chez des patients atteints de cardiopathies congénitales, ce qui démontre le rôle majeur que joue ce gène dans la cardiogenèse et dans la spécification et le maintien du SCC. Le phénotype cardiaque associé aux troubles de conduction est variable, les principales cardiopathies congénitales observées étant une communication inter-atriale ostium secundum,

une tétralogie de Fallot, un tronc artériel commun, un ventricule droit à double issue, une L-transposition des gros vaisseaux, une interruption de l'arche aortique, et une hypoplasie du cœur gauche, avec ou sans troubles de la conduction cardiaque [McElhinney *et al.* 2003; Baruteau *et al.* 2015]. Plus récemment la non-compaction du ventricule gauche, les périodes de Luciani-Wenckebach et la mort subite ont été ajoutées au spectre de manifestations cliniques liées à des mutations *NKX2.5* [Guntheroth *et al.* 2012; Ouyang *et al.* 2011].

TBX5 (12q24.21). Le syndrome de Holt-Oram est une affection autosomique dominante caractérisée par des anomalies préaxiales du segment radial (malformations du radius, des os du carpe et/ou des pouces) et par des troubles de la septation cardiaque [Al-Qattan *et al.* 2015]. Les anomalies septales consistent le plus souvent en des communications inter-auriculaires de type ostium secundum, des communications inter-ventriculaires de type musculaire et des canaux atrio-ventriculaires [Jhang *et al.* 2014]. Les patients atteints de ce syndrome présentent des troubles de la conduction cardiaque de degré variable, tels qu'une bradycardie sinusale ou un bloc auriculo-ventriculaire, associés ou non à une cardiopathie structurale. En 1997, Basson *et al.* ont effectué un dépistage génétique au sein de 2 familles où ségrégait le syndrome de Holt-Oram et ont mis en évidence des mutations intéressant *TBX5*, un facteur de transcription à boîte T [Basson *et al.* 1997]. Ce type de facteur, qui peut se comporter en tant qu'activateur ou répresseur transcriptionnel, joue un rôle majeur de régulation de la spécification et de la différenciation cardiaques. Sept membres de la famille des TBX sont exprimés dans le cœur en cours de développement, dont 3 (*TBX1*, *TBX5*, *TBX20*) se sont révélés impliqués dans les cardiopathies congénitales humaines [Stennard *et al.* 2005].

II.4.5- Troubles de conduction et maladies neuromusculaires

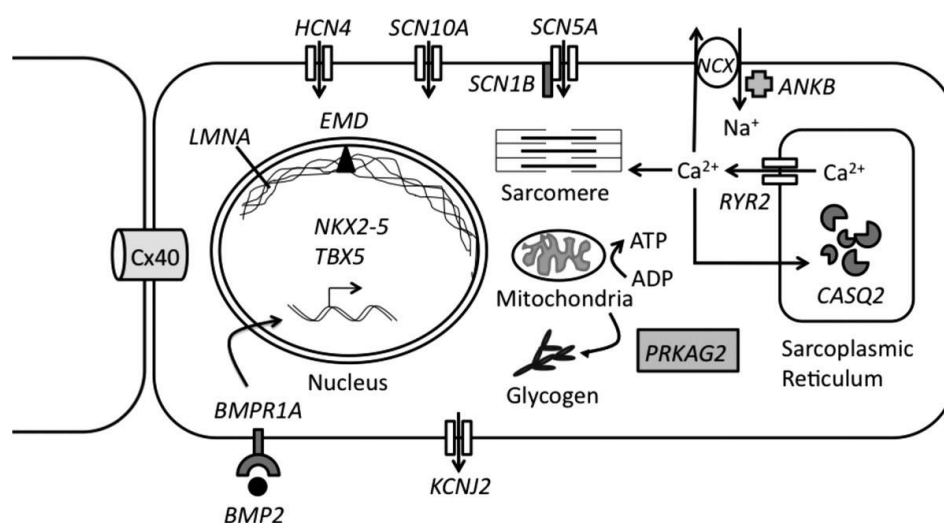
Les affections neuromusculaires forment un ensemble hétérogène de pathologies qui comportent très souvent une composante cardiaque. Il a été identifié un certain nombre de mutations intéressant les gènes qui régissent le cytosquelette, l'enveloppe nucléaire et la fonction mitochondriale. Le phénotype cardiaque revêt généralement la forme d'une cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique, d'anomalies de la conduction atrio-ventriculaire et de troubles du rythme atrial et ventriculaire [Hsu *et al.* 2010].

EMD (Xq28) et LMNA (1q22). Les mutations qui affectent l'enveloppe nucléaire sont à l'origine d'importantes altérations du SCC. La membrane interne de l'enveloppe nucléaire est une structure hautement organisée, composée de protéines membranaires intrinsèques et de protéines du cytosquelette nucléaire qui participent conjointement à l'organisation supérieure de la chromatine et à la régulation de la transcription [Ho *et al.* 2013]. Les lamines (A, B et C) sont des éléments

essentiels du réseau de filaments intermédiaires qui confère sa rigidité structurale à la membrane nucléaire interne. L'émérine, qui appartient à la famille des protéines nucléaires associées aux lamines, commande l'ancrage de la chromatine au cytosquelette. Les mutations affectant le gène de l'émérine (*EMD*) provoquent la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss liée à l'X, alors que celles qui influent sur les lamines A/C (*LMNA*) induisent une forme autosomique dominante de cette même maladie [Bonne *et al.* 1999]. Les sujets atteints d'une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss présentent une atrophie progressive de leurs muscles squelettiques au cours de leurs dix premières années de vie, puis une atteinte cardiaque (cardiomyopathie dilatée et bloc atrio-ventriculaire) au cours des années qui suivent [Groh *et al.* 2012; Hsu *et al.* 2010; Fatkin *et al.* 1999].

DMPK (19q13.32). La dystrophie myotonique de type 1 (DM1), ou maladie de Steinert, est la plus fréquente des dystrophies musculaires de l'adulte et se manifeste par une myotonie, une insulino-résistance, une fonte musculaire progressive, une cataracte et des troubles de la conduction cardiaque [Lau *et al.* 2015; Mahadevan *et al.* 1992]. Ces derniers, qui sont présents chez 70 % des patients atteints de DM1, peuvent consister en une bradycardie sinusale, un bloc auriculoventriculaire de degré variable ou un retard à la conduction intra-ventriculaire [Lau *et al.* 2015; Morgenlander *et al.* 1993]. La mutation génétique à l'origine de la DM1 est une expansion en n exemplaires du triplet CTG dans la région 3' non traduite (R3'NT) du gène *DMPK* (Dystrophy Myotonic Protein Kinase).

Figure 1-13: Principaux gènes impliqués dans les anomalies de conduction



Représentation schématique d'un cardiomyocyte du système de conduction cardiaque.

Adapté de [Park *et al.*, 2012]

III- ANOMALIES DU SYSTÈME DE CONDUCTION CARDIAQUE DANS LES CARDIOPATHIES CONGÉNITALES: EXEMPLE DE LA DOUBLE DISCORDANCE

La double discordance (discordance des connexions atrio-ventriculaire et ventriculo-artérielle) est une malformation cardiaque congénitale complexe pouvant être observée dans les cardiopathies uni- ou bi-ventriculaires. Elle s'associe toujours à des anomalies des voies de conduction (anomalie de position et/ou de nombre du noeud AV, anomalie de trajet du faisceau de His et de ses branches) prédisposant aux troubles de conduction AV natifs et/ou postopératoires.

Cinq éléments nous ont conduit à étudier et tenter de mieux caractériser les troubles de conduction associés aux cardiopathies en discordance AV dans le cadre de cette thèse:

a/ au niveau de la croix du coeur, cette malformation correspond à une inversion ventriculaire, étant à ce titre à un "modèle" anatomo-pathologique pour l'étude des troubles de conduction associés à une cardiopathie congénitale chez le sujet jeune;

b/ 5 à 10% des patients porteurs d'une double discordance sont en bloc complet dès la naissance;

c/ ce BAV est d'aggravation progressive, se présentant dans les quelques séries publiées (bien que rares, anciennes et sur de faibles échantillons de patients) avec un risque de BAV complet de 2% par an tout au long de la vie [D'Aliento *et al*, 1986];

d/ le phénotype ECG associe un allongement progressif de l'intervalle PR avec le temps, jusqu'à l'apparition d'un bloc AV du troisième degré avec un rythme d'échappement à complexes QRS fins [Kupersmith *et al*, 1974; Gillette *et al*, 1979];

e/ bien que l'allongement/étirement progressif des voies de conduction avec la croissance soit invoquée par les anatomistes pour expliquer l'apparition du BAV des doubles discordances, cette théorie est uniquement sous-tendue par de petites séries de pièces autopsiques et l'étiologie de ces troubles de conduction, comme celle de la double discordance n'est pas clairement identifiée à ce jour [Aiello *et al*, 2015; Wallis *et al*, 2011].

Notre hypothèse de travail développée plus loin (chapitre 5, étude #8) est que ces anomalies de conduction et ces anomalies de la latéralité partagent une origine génétique commune. Cette hypothèse est basée sur la double observation suivante:

a/ le phénotype ECG décrit dans la double discordance est très similaire à celui que nous avons observé dans le BAV pédiatrique isolé et non-immun et pour lequel nous avons mis en évidence une forte héritabilité [Baruteau *et al*, 2012];

b/ une composante héréditaire est évoquée par des travaux récents basés sur l'étude de quelques pedigree familiaux [Peyvandi *et al*, 2014; Unolt *et al*, 2013].

Les rappels ci-dessous permettront de mieux appréhender notre approche pour l'étude des bases génétiques et moléculaires des troubles de conduction associés aux cardiopathies congénitales avec discordance AV.

III.1- Généralités

Définition. La discordance AV est une malformation cardiaque congénitale complexe et rare qui se définit comme une inversion ventriculaire (Figure 1-14). Ainsi l'oreillette de morphologie droite (recevant le retour veineux systémique) est connectée via la valve mitrale au ventricule de morphologie gauche, et inversement l'oreillette de morphologie gauche (recevant le retour veineux pulmonaire) est connectée via la valve tricuspide au ventricule morphologiquement droit. Lorsque la relation ventriculo-artérielle est également discordante (c'est-à-dire le ventricule morphologiquement droit connecté à l'aorte et le ventricule morphologiquement gauche connecté au tronc de l'artère pulmonaire), on parle de double discordance. La majorité des cas de discordance AV s'intègre dans le cadre d'une double discordance.

Epidémiologie. L'incidence de la discordance AV n'est pas connue, celle de la double discordance est de 1/33.000 naissances vivantes, soit environ 0.05% des cardiopathies congénitales [Hoffman *et al*, 2002; Talner *et al*, 1980].

Étiologie: une composante héréditaire ? L'étiologie de la discordance AV est actuellement inconnue [Wallis *et al*, 2011]. Cependant des travaux récents, basés sur l'étude des apparentés des patients porteurs d'une discordance AV, suggèrent une composante héréditaire [Unolt *et al*, 2013]. Cette piste est relativement inattendue, dans la mesure où la double discordance semble être une cardiopathie sporadique, s'accompagne rarement de malformations extra-cardiaques et s'inscrit rarement dans un cadre syndromique. La "transposition corrigée" ne semble donc pas, *a priori*, partager une étiologie commune avec la "transposition complète" des gros vaisseaux, qui elle, bien qu'également d'apparence sporadique, s'associe volontiers à d'autres malformations cardiaques et/ou extra-cardiaques, et en particulier aux anomalies de la latéralité dans le cadre des syndrome d'hétérotaxie, principalement en cas d'isomérisme droit [Jacobs *et al*, 2006]. Cependant ces considérations sont en train d'évoluer et des avancées significatives ont été faites au cours des dix dernières années dans la compréhension des mécanismes génétiques impliqués dans la physiopathologie de la discordance ventriculo-artérielle.

D'une part, l'association de cas de double discordance et de syndromes d'hétérotaxie ont été rapportés dans certaines familles, de même que plusieurs cas de "transposition complète" des gros vaisseaux au sein d'autres familles [Marino *et al*, 2002; Thammineni *et al*, 2011]. D'autre part, certains auteurs ont rapporté la co-segrégation de cas de "transposition corrigée" et de

“transposition complète” parmi les apparentés au premier degré de plusieurs noyaux familiaux, suggérant très fortement un processus physiopathologique commun entre ces deux malformations [Digilio *et al*, 2001; Oyen *et al*, 2010]. Des travaux récents ont confirmé que la “transposition corrigée” n’est pas toujours une malformation sporadique et qu’elle peut s’inscrire dans un cadre familial. En cas de “transposition corrigée” le risque de récurrence de cardiopathie congénitale dans la fratrie du propositus est compris entre 2.6 et 5.2%, et la cardiopathie congénitale la plus fréquemment rencontrée chez les frères et soeurs du cas index est une “transposition complète” des gros vaisseaux [Piacentini *et al*, 2005; Peyvandi *et al*, 2014]. Sur le plan moléculaire, des mutations du gene *CRYPTIC* ont été rapportées à la fois dans des cas de syndrome d’hétérotaxie et dans des cas de “transposition complète” des gros vaisseaux [Gaio *et al*, 1999; Martins *et al*, 2008]. Et plusieurs mutations dans différents gènes connus pour être impliqués dans le processus de latéralisation du développement embryonnaire (*GDF1*, *PROSIT240*, *CFC1*, *FOXH1*, *ZIC3*, *NODAL* et *NKX2.5*) ont été rapportées comme étant responsables d’une discordance ventriculo-artérielle [Goldmuntz *et al*, 2002; Muncke *et al*, 2003; Karkera *et al*, 2007; De Luca *et al*, 2010]. Bien que ne concernant qu’une minorité de patients ayant une transposition des gros vaisseaux, ces études apportent un éclairage nouveau pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la discordance ventriculo-artérielle. Elles démontrent que la transposition des gros vaisseaux n’est pas toujours sporadique. Certaines formes de “transposition corrigée” ou de “transposition complète” peuvent s’inscrire dans un cadre familial et être dues à des mutations dans des gènes de la latéralité, rejoignant le cadre nosologique des syndromes d’hétérotaxie. L’étude des pedigree de ces formes familiales montre que celles-ci ne répondent pas aux lois de Mendel et suggère un processus oligogénique ou un processus plus complexe associant possiblement plusieurs facteurs génétiques et environnementaux [De Luca *et al*, 2010; Keavney *et al*, 2010].

III.2- Anatomie et anomalies associées

Anatomie. Dans la plupart des cas, la discordance AV s’associe à une discordance ventriculo-artérielle, ce qui signifie que les deux gros vaisseaux naissent des ventricules de morphologie inappropriée. Dans ce cas le ventricule de morphologie gauche est alors connecté au tronc artériel pulmonaire, et le ventricule de morphologie droite est en position systémique, sous-aortique. L’association d’une discordance atrioventriculaire et d’une discordance ventriculo-artérielle constitue alors une “double discordance”, encore appelée L-transposition des gros vaisseaux ou transposition congénitalement (ou physiologiquement) corrigée des gros vaisseaux [Jacobs *et al*, 2006; Hornung *et al*, 2010]. Le terme de “transposition corrigée” a été introduit dès 1875 par le baron Rokitansky dans sa description princeps de cette cardiopathie, pour signifier que cette connection anormale aux deux étages – atrioventriculaire et ventriculo-artériel – résulte en une

physiologie normale puisque le retour veineux systémique est dirigé vers la circulation pulmonaire et le retour veineux pulmonaire vers la circulation systémique [Wallis *et al*, 2011]. Cette terminologie de “transposition corrigée” permet également de différencier cette malformation de la “transposition complète” des gros vaisseaux, plus fréquente puisqu’elle concerne 1/3.500-5.000 naissances vivantes, et qui se caractérise quant à elle par une concordance atrioventriculaire et une discordance ventriculo-artérielle [Martins *et al*, 2008; Warnes *et al*, 2006].

En termes d’analyse segmentaire (voir en annexe), la “transposition corrigée” peut être décrite selon deux cardiotypes anatomiques: {S,L,L}, le plus fréquent et {I,D,D}, sa forme en miroir. Dans la forme {S,L,L}, le coeur est en situs solitus et levocardie. Les veines caves supérieure et inférieure sont situées à droite de la ligne médiane et rejoignent une oreillette de morphologie droite, située à droite. Cette oreillette droite se draine à travers une valve mitrale dans un ventricule de morphologie gauche situé à droite, lui-même connecté à un tronc artériel pulmonaire situé à droite. L’oreillette de morphologie gauche, située à gauche, reçoit les veines pulmonaires et se vide à travers une valve tricuspide dans un ventricule de morphologie droite situé à gauche, lui-même connecté à une aorte ascendante naissant en position antéro-gauche. Les deux gros vaisseaux naissent ainsi côte-à-côte, parallèles, contrairement à ce qui est observé dans un coeur d’architecture normale où les gros vaisseaux se croisent. Cette description d’une double discordance, atrioventriculaire et ventriculo-artérielle dans un coeur en L-loop peut également être nommée L-transposition.

La forme {I,D,D}, plus rare, est l’image en miroir de la forme {S,L,L}. le coeur est en situs inversus et dextrocardie. Les veines caves supérieure et inférieure sont situées du côté gauche de la ligne médiane et se drainent dans une oreillette de morphologie droite située à gauche. Cette oreillette morphologiquement droite se vide à travers une valve mitrale dans un ventricule de morphologie gauche situé à gauche, connecté à un tronc pulmonaire postéro-gauche. Le retour veineux pulmonaire se fait dans une oreillette de morphologie gauche située à droite, qui se draine à travers une valve tricuspide dans un ventricule de morphologie droite situé à droite, connecté à une aorte ascendante antéro-droite. Dans cette forme anatomique plus rare de double discordance, atrioventriculaire et ventriculo-artérielle, le coeur est en D-loop et l’appellation L-transposition est impropre car les deux gros vaisseaux sont en réalité en D-transposition (Figure 1-14).

En cas de syndrome d’hétérotaxie avec isomérisme droit ou gauche, les deux oreillettes ont un auricule de même morphologie et sont connectées à des ventricules distincts. Si la cardiopathie est biventriculaire, la moitié du coeur est alors en concordance AV et l’autre moitié en discordance AV, quelque soit la topologie ventriculaire.

Certaines formes de discordance AV sont plus complexes sur le plan anatomique et peuvent s’associer à une modification de la relation spatiale des ventricules entre eux: soit sous la forme d’une superposition des ventricules, le ventricule morphologiquement droit étant alors en règle

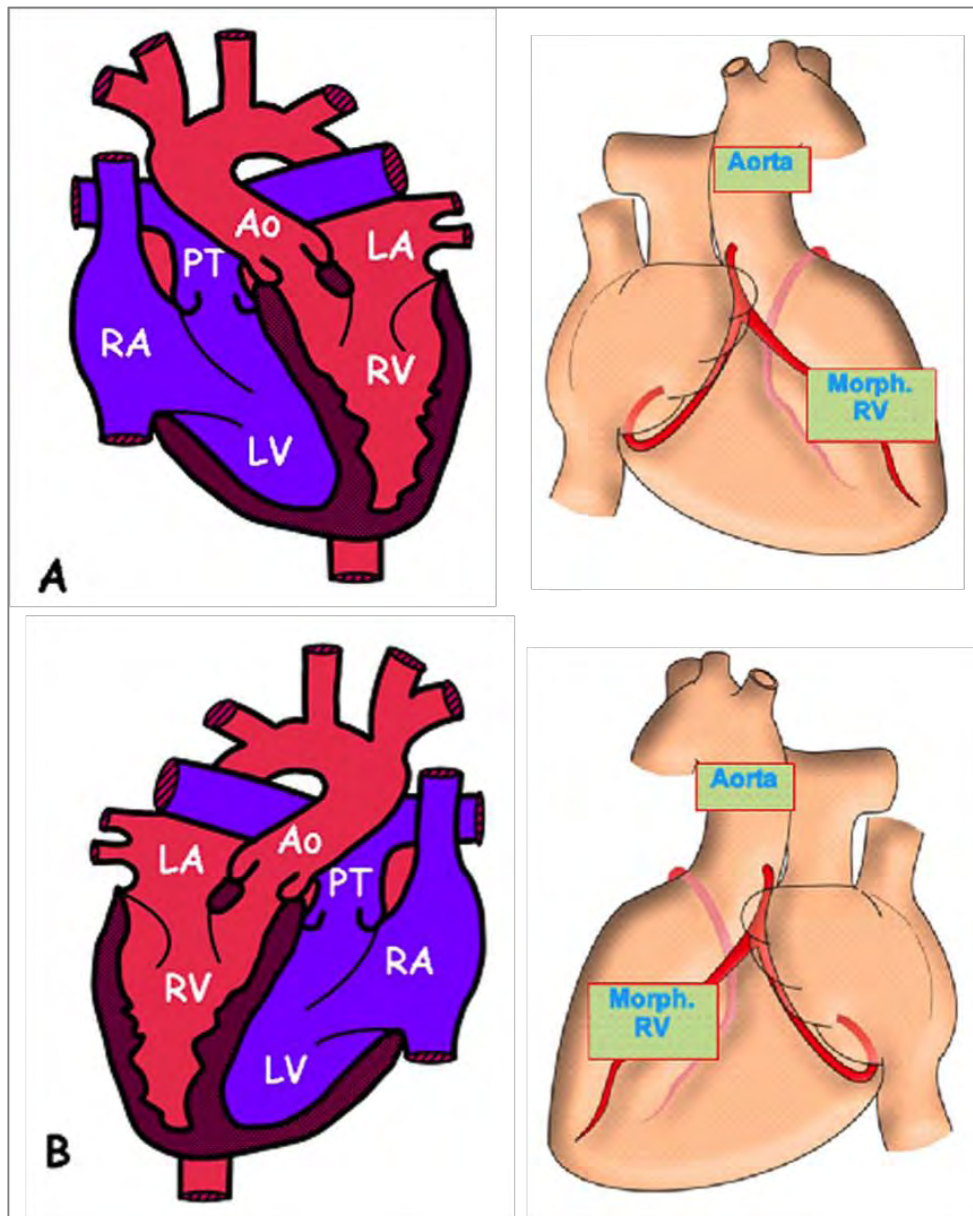
générale en position supérieure et le ventricule de morphologie gauche en position inférieure; soit sous la forme d'un coeur dit "en criss-cross" dû à une rotation de la jonction AV, ce qui signifie que la relation entre les chambres d'admission et les apex ventriculaires est l'opposé de ce qui serait attendu: dans cette configuration, malgré une discordance AV en situs solitus, le ventricule de morphologie droite peut siéger sur le côté droit du massif ventriculaire, le ventricule morphologiquement gauche étant positionné en bas et plus à gauche [Anderson *et al*, 1974; Marino *et al*, 1982; Martinez *et al*, 2008]. Dans ces dernières formes, heureusement rares, la direction de la loop cardiaque est discutable et la description segmentaire ardue.

Anomalies associées. La discordance AV et la double discordance peuvent se présenter comme des malformations isolées, à tel point que des cas de "transposition corrigée" sans anomalie associée de diagnostic tardif ou de survie prolongée chez des octogénaires ou nonagénaires ont été décrits [Orchard *et al*, 2010; Sim *et al*, 2013]. Mais dans la majorité des cas il existe une ou plusieurs malformations cardiaques associées, impactant le pronostic [Van Praagh *et al*, 1970; Mahle *et al*, 2006]. Les anomalies cardiaques associées les plus fréquentes sont une anomalie de la valve atrioventriculaire tricuspide, en position systémique (jusqu'à 90% des patients), une communication interventriculaire (CIV) (environ 70% des patients) et une sténose de la voie d'éjection ventriculo-pulmonaire (environ 40% des patients). Des anomalies des voies de conduction et du réseau coronaire sont également classiquement décrites [Shea *et al*, 1979; Van Praagh *et al*, 1998; Sharland *et al*, 2005].

III.3- Troubles de conduction associés aux cardiopathies avec discordance AV

Anomalies des voies de conduction. Des anomalies des voies de conduction sont classiquement décrites dans la discordance AV [Shea *et al*, 1979; Van Praagh *et al*, 1998; Sharland *et al*, 2005]. Le noeud AV normal est souvent hypoplasique. Situé à l'apex du triangle de Koch, il n'est pas capable d'assurer une conduction du signal électrique jusqu'aux ventricules, du fait d'un large espace créé par le malalignement des septa interatrial et interventriculaire. Cet espace est soit comblé par du septum interventriculaire membraneux, soit constitue une CIV perimembraneuse large. Il existe donc un autre noeud AV, situé plus en avant dans l'anneau mitral, qui lui, donne naissance au faisceau de His. Le trajet du faisceau de His est très long, antérolatéral, encerclant la voie d'éjection ventriculo-pulmonaire dans sa portion antéro-supérieure, avant de redescendre et de se bifurquer (Figure 1-15) [Lev *et al*, 1963; Anderson *et al*, 1973; Anderson *et al*, 1974]. En cas de sténose pulmonaire sévère, d'atrésie pulmonaire et/ou de situs atrial inversus, un noeud AV postérieur est décrit, relié au faisceau de His (Figure 1-15) [Kurosawa *et al*, 1990; Hosseinpour *et al*, 2004; Anderson *et al*, 2004; Anderson *et al*, 1978].

Figure 1-14: Représentation schématique de la double discordance

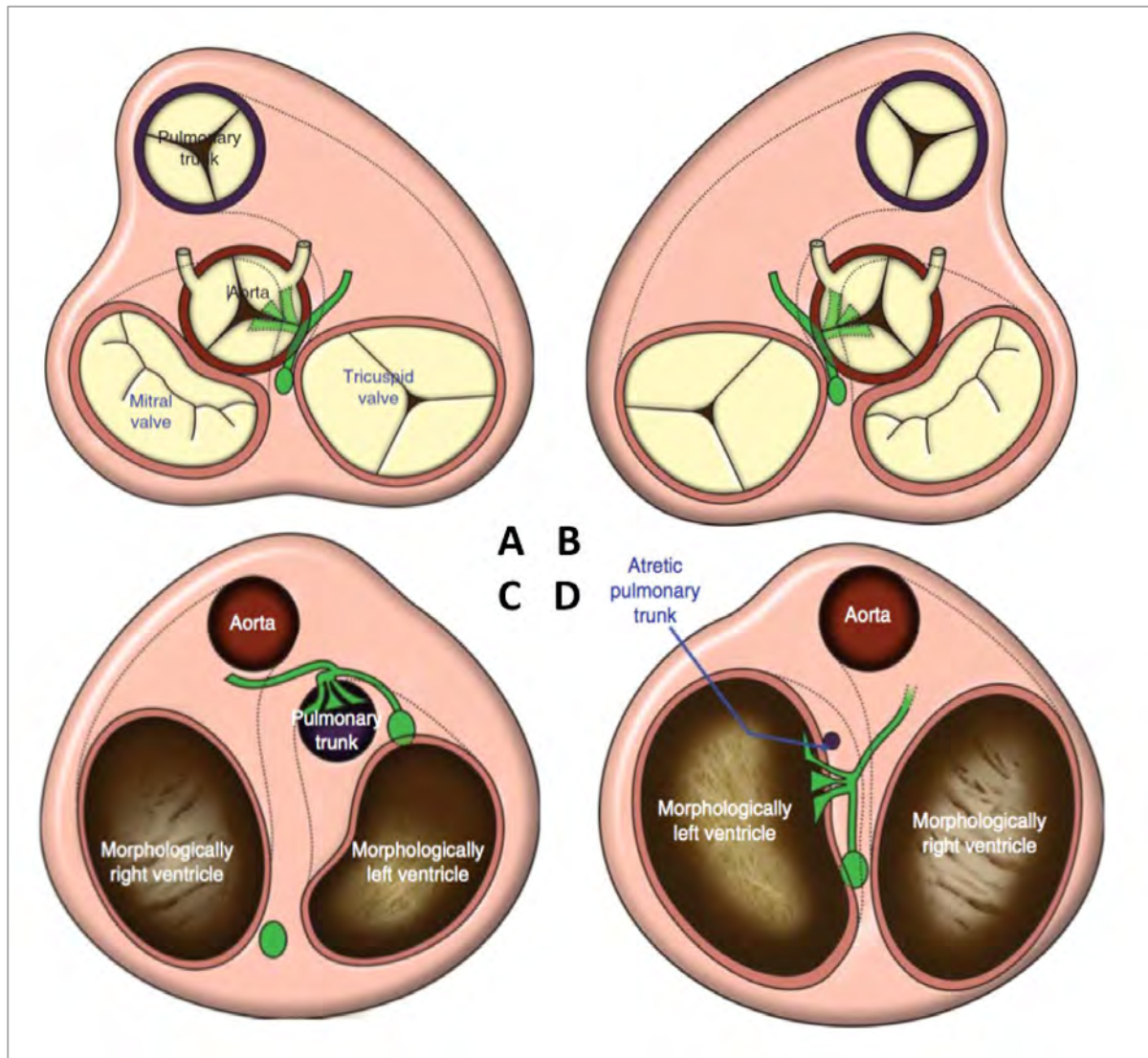


A: Double discordance en situs atrial solitus: cardiotype {S,L,L}. B: Double discordance en situs atrial inversus: cardiotype {I,D,D}.

RA signifie right atrium; LA: left atrium; RV: right ventricle; LV: left ventricle; PT: pulmonary trunk; Ao: aorta; morph. RV: morphologiquement right ventricle.

[Adapté de Wilkinson et al, 2011]

Figure 1-15: Anomalies des voies de conduction dans la discordance atrioventriculaire



A: Représentation de la base d'un coeur normal en situs viscerosolitus et D-loop, concordance atrioventriculaire et ventriculoartérielle. Après éversion du massif atrial, on distingue les valves AV et VA, la position normale du noeud AV et le trajet normal du faisceau de His et de ses branches (la branche verte trifurquée schématisant la branche gauche du faisceau de His); B: Représentation de la base d'un coeur en situs viscerosolitus et L-loop, concordance AV et VA. Le trajet des voies de conduction est également inversé "en miroir"; C: Représentation de la base d'un coeur en situs viscerosolitus, discordance AV et discordance VA (transposition corrigée). Un noeud AV postérieur est souvent présent mais il est en règle hypoplasique et déconnecté de l'axe nodo-hissien principal du fait du malalignement des septa interatrial et interventriculaire. Il existe un second noeud AV, situé plus en avant dans l'anneau mitral, qui lui, donne naissance au faisceau de His. Le trajet du faisceau de His est très long, antérolatéral, encerclant la voie d'éjection ventriculo-pulmonaire dans sa portion antéro-supérieure; D: Transposition corrigée avec atrésie pulmonaire, en situs viscerosolitus. Du fait de l'atrésie pulmonaire le malalignement entre les septa interatrial et interventriculaire est moins prononcé, permettant l'existence d'un unique noeud AV en position inférieure, connecté à un faisceau de His en position postéro-inférieure.

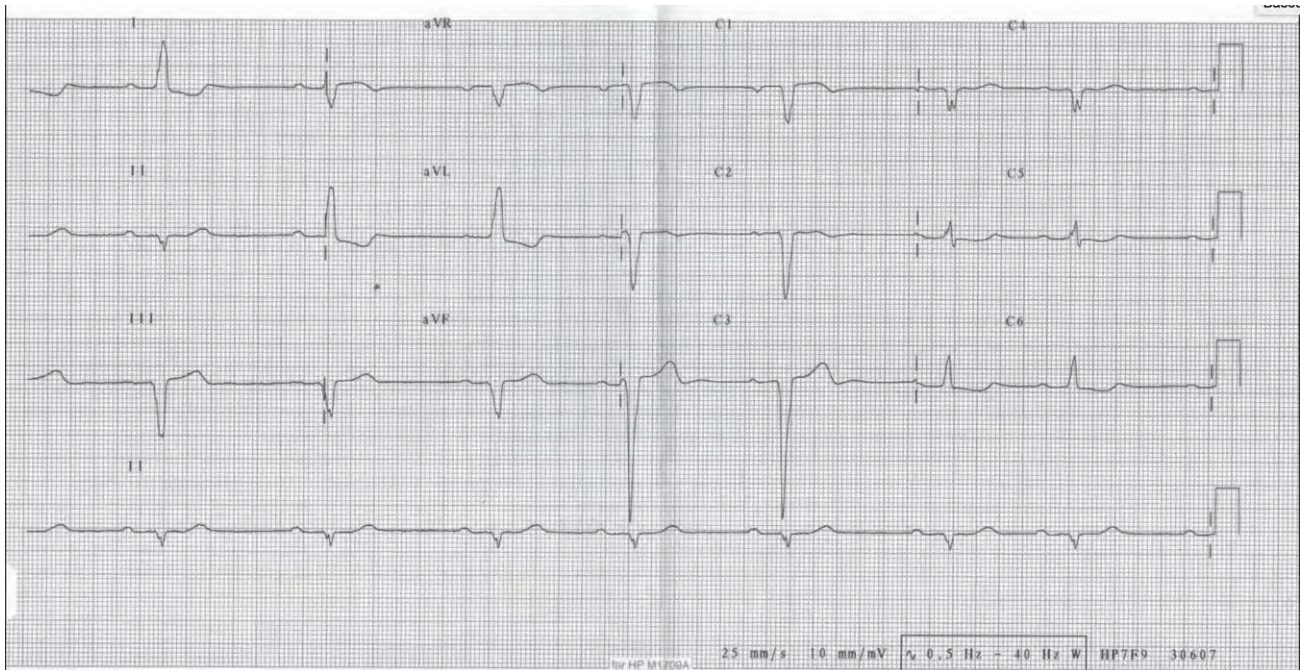
Modifié d'après [Smith et al, 2006; Hosseinpour et al, 2004].

Electrocardiogramme des discordances AV. L'électrocardiogramme 12-dérivations est toujours anormal en cas de double discordance. Dans les formes {S,L,L}, c'est-à-dire en situs viscero-atrial solitus et levocardie, l'aspect électrocardiographique est caractéristique (Figure 1-16). La dépolarisation ventriculaire se fait de la droite vers la gauche (soit l'inverse d'un coeur normal), débutant dans la région postérobasale du ventricule droit systémique. L'axe est le plus souvent gauche. On note la présence d'ondes q parfois profondes dans les dérivations inférieures et précordiales droites et l'absence d'onde q dans les dérivations précordiales gauches. En cas d'anomalies associées, on peut également retrouver une surcharge systolique des cavités droites et volumétrique des cavités gauches. Divers degrés de troubles de la conduction atrioventriculaire peuvent être dépistés, apparemment sans lien évident avec les potentielles anomalies cardiaques associées, et généralement en présence de complexes QRS fins traduisant un rythme d'échappement ventriculaire d'origine hisienne ou supra-hisienne. Ces troubles conductifs sont fréquents, puisque plus de 40% des patients naissent avec ou développent ces troubles de la conduction AV au cours de leur vie [Westerman *et al*, 1982; Graham *et al*, 2000; Sim *et al*, 2013]. Chez les patients porteurs d'une double discordance {L,D,D}, le noeud sinusal est situé à gauche et la dépolarisation ventriculaire se fait de la gauche vers la droite (comme dans un coeur normal), ce qui se traduit sur l'électrocardiogramme de surface par une onde P négative en V1, une onde R initiale dans les dérivations précordiales droites et une onde q initiale dans les dérivations précordiales gauches.

Environ 5 à 10% des patients porteurs d'une double discordance sont en bloc complet à la naissance. Parmi ceux nés avec une conduction AV normale, un déclin progressif de la conduction cardiaque est souvent observé au cours des deux premières décennies, conduisant 15 à 20% d'entre eux à être implantés d'un stimulateur cardiaque permanent pour bloc complet à l'adolescence, et 30% à l'âge adulte [Cardell *et al*, 1956; Friedberg *et al*, 1970; Hutha *et al*, 1983; Connelly *et al*, 1996]. Le risque de développer un bloc complet chez les nouveaux-nés ayant une conduction AV normale est estimé à 2% par an tout au long de leur vie. [D'Aliento *et al*, 1986] On observe alors un allongement progressif de l'intervalle PR avec le temps, jusqu'à l'apparition d'un bloc AV du troisième degré avec un rythme d'échappement à complexes QRS fins. Un risque de bloc AV traumatique s'additionne bien entendu en cas de chirurgie intracardiaque, en particulier en cas de fermeture de CIV perimembraneuse. Les rares études électrophysiologiques réalisées dans de petites séries ont confirmées que le site du bloc AV "natif" (non traumatique) est hisien ou supra-hisien [D'Aliento *et al*, 1986; Kupersmith *et al*, 1974; Gillette *et al*, 1979]. Il a été montré que seuls 20% des patients maintiendront une conduction AV normale tout au long de leur vie [D'Aliento *et al*, 1986]. Des arythmies supraventriculaires et ventriculaires ont également été rapportées chez les patients porteurs d'une double discordance, en lien avec des voies accessoires ou de la fibrose, mais on manque de données concernant leurs caractéristiques et

leur prévalence: tachycardies atriales, tachycardies par réentrée sur voie accessoire AV et syndrome de Wolff-Parkinson-White, second noeud AV, arythmies ventriculaires et mort subite [Benson *et al*, 1980; Nakajima *et al*, 1986; Gillette *et al*, 1992; Walsh *et al*, 2007; Liao *et al*, 2012; Sherwin *et al*, 2013].

Figure 1-16: ECG d'un patient porteur d'une double discordance



Electrocardiogramme de surface 12 dérivation enregistré au repos chez un patient de 24 ans, porteur d'une « transposition corrigée ». Rythme sinusal avec bradycardie sinusale à 40 battements/minute. Onde P relativement large (110 ms), intervalle PR long à 250 ms (bloc auriculo-ventriculaire du premier degré). QRS légèrement élargi (110 ms), axe gauche. Ondes Q profondes en DII, DIII, aVF, V1-V4 (dérivations inférieures et précordiales droites). Absence d'onde q dans les dérivation précordiales gauches.

[Adapté de Rythmopedia: <http://www.rhythmopedia.com>]

IV- HÉRÉDITÉ ET GÉNÉTIQUE

L'évolution du génie génétique au cours des années 1970 a permis l'émergence de la génétique moléculaire. Les années 1980 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], ou la myopathie de Duchenne [Dubowitz *et al*, 1986]. En octobre 2014, la base de données OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) comptabilisait 22.634 entrées, décrivant 14.831 gènes et 7.894 phénotypes [Amberger *et al*, 2015].

Le déterminisme des maladies cardiovasculaires, bien que complexe, voit sa compréhension s'améliorer grâce au développement de nouveaux outils cliniques et moléculaires. Dans la grande majorité des cas, les maladies cardiovasculaires ont des causes multiples et sont associées à des marqueurs et/ou facteurs de risque (âge, genre, surpoids, sédentarité, dyslipidémie, intoxication tabagique, hypertension artérielle systémique..) Pour certaines pathologies, une origine génétique est en revanche clairement identifiée. Ces maladies où l'implication des facteurs génétiques est prédominante correspondent, selon leur niveau de complexité, soit à des pathologies monogéniques (à transmission mendélienne) où un gène majeur est à l'origine du mécanisme physiopathologique, soit à des maladies génétiques complexes, multigéniques, où l'association de plusieurs gènes est nécessaire pour développer une pathologie.

IV.1- Modèles génétiques: du modèle monogénique à la maladie génétique complexe

La publication de cartes génétiques humaines dans les années 1990 et l'achèvement du séquençage du génome humain en 2001 ont permis une croissance exponentielle de la découverte des gènes morbides [International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Venter *et al*, 2001]. Ces avancées ont permis en premier lieu de mieux caractériser les pathologies monogéniques. L'approche gène candidat et l'approche d'analyse de liaison génome entier (ou clonage positionnel) ont été parmi les premières approches utilisées pour identifier ces gènes morbides, avant l'avènement des techniques de séquençage à haut débit.

Approche gène candidat. Cette stratégie consiste à rechercher et analyser les variants génétiques dans des gènes dont la fonction pourrait jouer un rôle dans la pathologie en question. Elle repose sur une bonne connaissance de la physiologie et de la fonction du gène. L'approche gène candidat cible donc un gène présumé impliqué dans la voie physiopathologique touchée d'après les données scientifiques relatives à son expression tissulaire, sa fonction ou son étude dans un modèle animal préalablement validé pour ce gène. C'est par cette méthode que le gène *SCN5A* a été identifié comme étant impliqué dans le syndrome de Brugada [Chen *et al*, 1998].

Approche d'analyse de liaison génome entier. L'analyse de liaison génome entier consiste à génotyper à l'aide de marqueurs polymorphes tous les individus d'une famille (sains et atteints) sur l'ensemble du génome et à identifier un locus partagé par tous les apparentés atteints et absent chez tous les apparentés sains. La composition génétique de l'intervalle identifié est ensuite examinée et le séquençage de cette région peut révéler l'implication d'un nouveau gène et donc d'une nouvelle voie physiopathologique. C'est une méthode de génétique inverse et sans *a priori* contrairement à l'approche gène candidat.

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 permis l'identification du gène en cause. Ces données suggèrent: a/ que la liaison est due au hasard (faux positif); b/ que le nombre de gènes à explorer est trop important; c/ que tous les gènes du locus ne sont pas encore identifiés; ou d/ que les régions non-codantes et les petits réarrangements génomiques (délétions, duplications, inversions) qui n'étaient peu ou pas explorées et sous-estimés il y a quelques années encore, pourraient avoir un rôle majeur dans le développement des pathologies héréditaires. Cette méthode nécessite de disposer de familles suffisamment grandes pour être génétiquement informatives et que la pathologie soit liée à un ou des gènes à effet majeur, démontrant ainsi l'implication de variants rares à effet fort.

Le séquençage haut débit ou séquençage nouvelle génération (NGS) a plus récemment rendu possible la réalisation d'**exomes**. Le séquençage d'exome consiste à capturer l'ensemble des séquences codantes du génome, c'est-à-dire la totalité des exons au nombre de 200 000 environ, pour séquencer seulement ces régions (avec leurs jonctions intron-exon) chez des patients donnés. Cette approche a permis l'identification récente de nombreux nouveaux gènes dans des syndromes malformatifs non encore étiquetés au niveau moléculaire. Le premier exemple d'identification d'un gène impliqué dans une maladie mendélienne par cette approche a été publié en janvier 2010 [Ng *et al*, 2010]. Il est à noter que la stratégie d'analyse est essentielle pour permettre de filtrer efficacement le nombre important de variants nucléotidiques identifiés. Par exemple, pour un exome donné, on identifie en moyenne 45 000 à 50 000 variants totaux incluant 20 000 à 25 000 variants codants. Après vérification sur différentes bases de données de SNPs, il reste environ 300 variants « privés » non synonymes (variants non-sens et faux-sens). Il semble difficile d'explorer alors l'ensemble des gènes suspects. Plusieurs stratégies peuvent être élaborées pour filtrer ces variants restants, en tenant compte notamment du mode de transmission de la maladie génétique. Ainsi pour une maladie autosomique récessive, on étudiera préférentiellement l'exome d'un enfant et de ses deux parents consanguins, à la recherche de mutations homozygotes chez le cas index et hétérozygotes chez chacun des parents. On comparera ces résultats avec d'éventuels résultats issus de cartographie par

homozygotie (analyse de liaison) sur puces à SNPs. Dans le cas d'une maladie autosomique dominante, on pourra choisir cette même stratégie des trios père-mère-enfant, à la recherche de mutations *de novo* chez le cas index.

Cependant plusieurs maladies génétiques initialement décrites comme étant monogéniques semblent finalement résulter d'un modèle génétique plus complexe. En effet, des contradictions avec le modèle monogénique ont conduit à la mise en évidence d'un modèle digénique, puis d'un modèle digénique triallélique [Kajiwara *et al*, 1994; Beales *et al*, 2001]. Le nombre théorique de gènes responsables d'une pathologie est fonction de la variance phénotypique que va apporter chaque allèle. La pathogénie de variants à effet modéré appelés "gènes de susceptibilité" ou "gènes de prédisposition" est observable si et seulement si la combinaison de leur impact phénotypique dépasse un seuil d'apparition de la maladie: c'est l'effet seuil. Dans ce modèle de maladie génétique complexe, chaque variant pris séparément ne peut provoquer un phénotype. On parle de modèle oligogénique, puisque les pathologies trouvent leur explication moléculaire dans une combinaison d'un nombre réduit de variants (supérieur à un, mais inférieur à quelques dizaines). La maladie de Hirschsprung est un modèle de maladie oligogénique, puisque la présence de trois facteurs de susceptibilité situés dans 3 loci différents est nécessaire et suffisante pour développer cette maladie [Gabriel *et al*, 2002].

On parle de modèle polygénique lorsque la combinaison de dizaines voire de centaines de variants est nécessaire à l'apparition d'une maladie. L'identification de ces variations génétiques suppose une puissance statistique plus élevée que pour l'identification de variants à effet plus fort. Cette puissance, et donc la probabilité d'identifier une liaison, est fonction du nombre d'individus génotypés, de la précision 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, plus la probabilité d'identifier des variants à effet faible est importante. La schizophrénie est un exemple de maladie polygénique [Purcell *et al*, 2009].

On pensait il y a quinze ans que les maladies rares pouvaient être expliquées par l'identification de variants rares à effet fort et que les pathologies fréquentes étaient associées à la combinaison de variants à effet modéré retrouvées plus fréquemment dans la population générale.[Doris *et al*, 2002] On s'est aperçu depuis qu'il est difficile de classer les maladies génétiques en fonction de leur modèle et on considère davantage aujourd'hui un continuum entre les formes monogéniques, oligogéniques et polygéniques d'une maladie. En effet, au sein de la majorité des maladies monogéniques sont constatés des défauts de pénétrance et d'expressivité, attribués à la présence de variants à effet mineur.[Kaab *et al*, 2005] A l'inverse, un modèle polygénique d'une maladie fréquente ne permet pas toujours d'expliquer l'ensemble des cas observés. Enfin outre les

facteurs génétiques, les facteurs environnementaux jouent également un rôle dans le déterminisme de la plupart de ces pathologies.

IV.2- Stratégies pour l'identification des facteurs génétiques impliqués dans une maladie génétique complexe

Etude d'association pangénomique. Le développement des technologies de séquençage et de génotypage à haut débit à partir des années 2000, basées sur les "puces à SNP" (DNA chips) a ouvert la voie à l'obtention rapide d'un très grand nombre de génotypes. Il est alors devenu envisageable de génotyper un grand nombre de marqueurs génétiques chez un grand nombre de sujets. Cette opportunité technologique a ouvert la voie à l'approche par étude d'association pangénomique ou « genome wide association study » (GWAS) dont le principe est une étude d'association à l'échelle d'une population. Ces études ont nécessité une évolution des cartes génétiques et des technologies ainsi que la constitution préalable de grandes cohortes de patients. L'objectif de cette approche est de détecter les variants génétiques prédisposant à une pathologie génétique complexe en génotypant des SNPs en déséquilibre de liaison avec ces variants et dont la position chromosomique est connue. Le déséquilibre de liaison entre un marqueur SNP et le locus en cause se traduit par une association allélique non aléatoire entre un allèle du marqueur génétique 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 individus atteints indiqueront que ces marqueurs sont: a/ eux-même causals; ou b/ en déséquilibre de liaison, c'est-à-dire physiquement proches du polymorphisme impliqué dans la pathologie. Cette approche a été rendue possible à l'échelle du génome entier grâce au projet HapMap qui a permis le développement de cartes denses de SNPs et d'obtenir des informations sur leur fréquence, leur répartition physique et les groupes de SNPs en déséquilibre de liaison qui permettent de limiter l'analyse ("TagSNP") [Ardlie *et al*, 2002; Frazer *et al*, 2007]. Une des premières études d'association pangénomique appliquée au génome entier utilisait 100.000 SNPs.[Klein *et al*, 2005] La disponibilité depuis 2005 de "puces" permettant de tester simultanément 300.000 SNPs (système Illumina) ou 500.000 SNPs (système Affymetrix) sur un grand nombre de patients et de sujets contrôles a permis le développement des études d'associations sur des pathologies très diverses.

Du point de vue clinique, les études d'association pangénomique requièrent de grandes cohortes de patients pour déterminer avec suffisamment de significativité statistique 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 le variant aura un impact phénotypique faible, plus son identification nécessitera d'augmenter la taille de la cohorte et/ou

d'augmenter l'homogénéité du phénotype de la population. Deux méthodes peuvent être utilisées concernant la population à étudier: soit une étude cas-contrôle qui permet de comparer la fréquence allélique de marqueurs entre une population de patients atteints et une population de sujets sains contrôles; soit l'utilisation des données de populations issues d'études épidémiologiques comme la population de Framingham (66.910 individus). Ces populations sont phénotypées pour un grand nombre de critères et permettent l'étude de la corrélation entre un génotype et un trait quantitatif. Une troisième stratégie combine les deux méthodes précédentes en ne gardant, au sein d'une population générale, que les patients situés aux extrêmes du trait quantitatif, ce qui demande 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 d'augmenter la puissance de l'étude pour détecter ainsi de nouveaux marqueurs de susceptibilité.

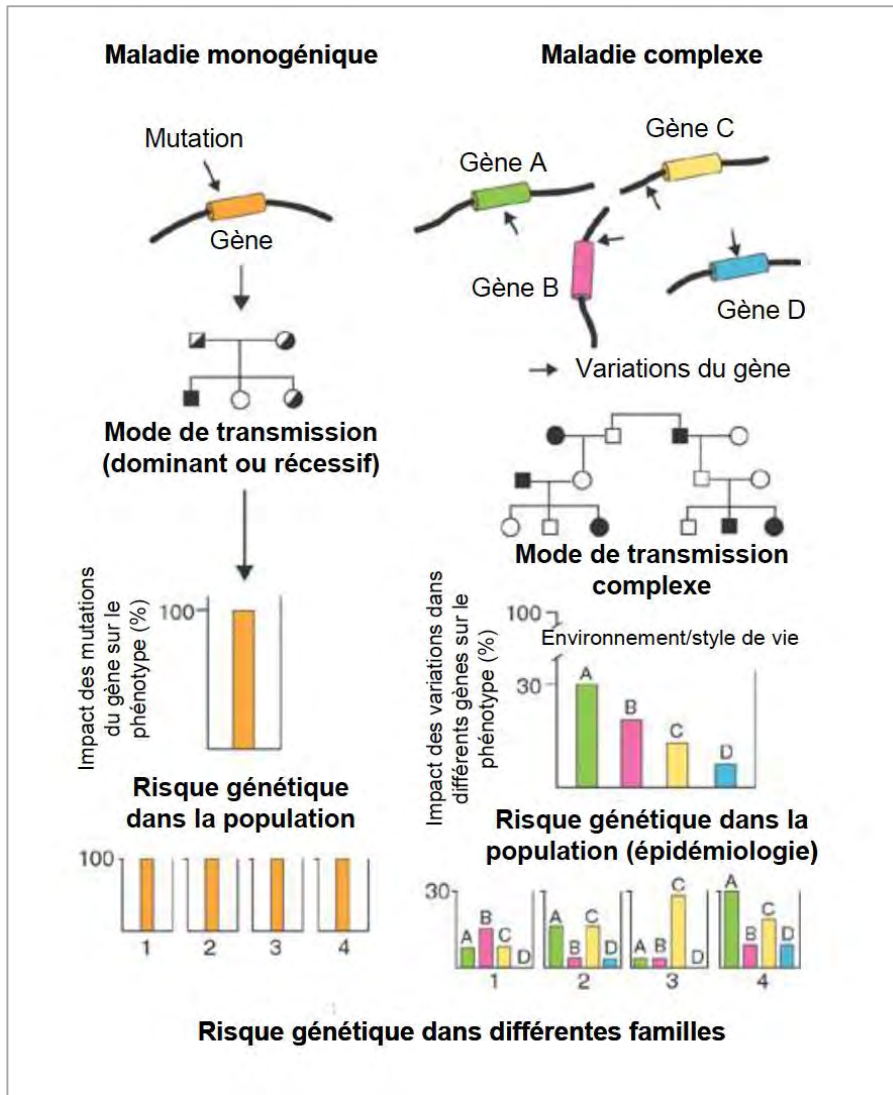
La méthode d'association pangénomique pourrait sembler la méthode définitive susceptible de repérer tous les déterminants génétiques d'une maladie, compte-tenu de sa haute densité de couverture du génome. Néanmoins la méthode souffre d'un certain nombre de limites. En effet, il est admis que ces études ne parviennent pas à expliquer la totalité de la variation d'un phénotype et donc de la relation génotype/phénotype des maladies complexes. Une des limites de cette approche est la mauvaise couverture de certaines zones du génome qui pourraient avoir une implication dans la variabilité du phénotype. 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 également prendre en considération les facteurs d'origine environnementale qui peuvent se combiner aux effets des variants génétiques.

Copy Number Variations. En plus des variations d'un seul nucléotide (SNP) est apparue en 2004 la notion de CNV (Copy Number Variations) traduisant la variation de nombre de copies d'ADN, c'est à dire des variations structurales à grande échelle du génome (un kilobase à plusieurs mégabases), correspondant à des duplications, des délétions, des associations de délétions et de duplications ou des remaniements multialléliques. La découverte des CNV révolutionne nos concepts sur la diversité des individus. Ces CNV sont identifiés par des puces à ADN de type CGH-array (Comparative Genomic Hybridization) ou des puces à SNPs. La première cartographie des variations du nombre de copies de l'ensemble du génome a permis de montrer que 12% du génome varie en nombre de copies (360Mb) avec un peu moins de 1500 régions concernées [Redon *et al*, 2006]. Des études plus récentes ont été réalisées à l'aide de puces à

oligonucléotides très hautement résolutive sur 41 individus sains HapMap, et ont établi une carte de 11700 CNVs putatifs de plus de 443 pb, dont 8599 CNVs ont été validés indépendamment et couvraient 3.7% du génome [Conrad et al. 2010]. Une autre étude portant sur 2500 individus sains montre que 5 à 10% de la population générale est porteuse de CNVs rares d'une taille supérieure à 500 Kb et que 1% des individus sains sont même porteurs de CNVs rares d'une taille supérieure à 1Mb [Itsara et al. 2009]. La taille de ces CNVs déterminée avec des puces à BACs n'était cependant pas précise. McCarroll *et al.* ont réétudié les 270 mêmes individus de Redon *et al.*, à l'aide d'une puce hybride SNP-CNV, et ont identifié des CNVs dans 82% des régions décrites mais ces CNVs étaient entre 5 et 15 fois plus petits en taille que ceux décrits initialement. Ainsi ces CNVs décrits par Redon *et al.* ne représenteraient pas 12% du génome mais moins de 5% du génome [McCarroll *et al.*, 2008]. Les études futures permettront de déterminer l'importance des CNVs dans les maladies monogéniques où ils pourraient contribuer aux variations d'expressivité des mutations (pénétrance) et dans l'apparition des maladies complexes.

Hérédité manquante. Les loci identifiés aujourd'hui par les études d'association pangénomiques correspondent donc à une augmentation de risque faible (en général inférieur à 1,3). Même associés ils expliquent généralement moins de 10 % de la variabilité d'un trait attribuée aux effets génétiques ; ainsi dans le cas de la surcharge pondérale, l'héritabilité du BMI (Body Mass Index) est considérée comme étant de 50%, le génotypage de 125 000 individus a identifié 32 variants n'expliquant que 1,45% de la variabilité génétique et les auteurs du travail considèrent par extrapolation que si l'étude de 730 000 sujets devrait conduire à l'identification d'environ 280 loci, ceux-ci n'expliqueraient toujours que 9 % de cette variabilité [Lango Allen *et al.*, 2010]. Il persiste ainsi une différence considérable entre héritabilité et résultats obtenus par les études d'association pangénomique: ce hiatus a été qualifié « d'héritabilité manquante » (missing heredity). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette héritabilité manquante: puces ADN ne testant que les SNPs relativement répandus c'est-à-dire dont l'allèle mineur a une fréquence supérieure à 5 % et donc ne prenant pas en cause des variants plus rares mais avec des effets forts, fréquences alléliques différentes d'une population à l'autre, non prise en cause dans ces études des effets non génétiques, non utilisation dans les analyses statistiques des méthodes de la génétique quantitative... Pour répondre à la première explication proposée, le projet « 1 000 génomes » a permis d'identifier des polymorphismes plus rares (environ 5 millions de SNPs sont nécessaires pour englober 95 % de ces polymorphismes dont l'allèle mineur a une fréquence égale ou supérieure à 1%), grâce aux nouvelles technologies de séquençage à haut débit.

Figure 1-17: Transmission des maladies monogéniques et complexes



Pour les maladies monogéniques (à gauche): une mutation unique est suffisante pour produire le phénotype clinique. Le risque génétique de développer la maladie est le même dans toutes les familles.
 Pour les maladies complexes (à droite): les variations dans différents gènes résultent en une prédisposition génétique. L'environnement et le style de vie contribuent à l'apparition des maladies complexes. Entre différentes familles, l'impact de ces gènes pourra être différent.

Adapté de [Peltonen et al, 2001]

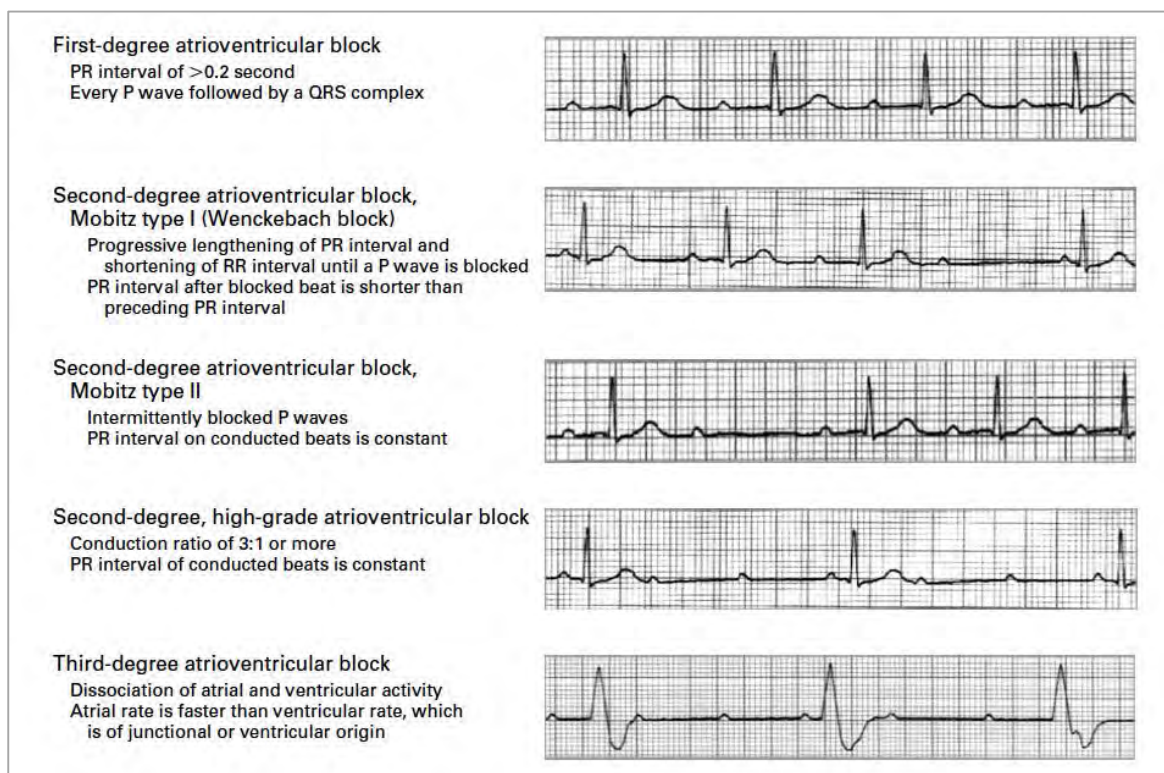
CHAPITRE 2: LES TROUBLES DE CONDUCTION DU SUJET JEUNE

I- INTRODUCTION

Les troubles de la conduction cardiaque du nourrisson et de l'enfant sont à la fois: 1/ une situation clinique rare pouvant engager le pronostic vital et justifiant une stratégie d'évaluation et une prise en charge claires et adaptées; et 2/ une thématique de recherche transversale de nombreuses équipes à travers le monde, dont les travaux visent à préciser une physiopathologie hétérogène et complexe.

Ce second chapitre a pour objectifs de: a/ rappeler les spécificités pédiatriques de l'électrocardiogramme; b/ clarifier les modalités d'évaluation et de prise en charge d'une bradycardie chez le nourrisson et l'enfant; c/ préciser l'approche diagnostique et thérapeutique du bloc atrio-ventriculaire en pédiatrie; et d/ exposer les connaissances actuelles sur les bases génétiques des troubles de conduction héréditaires. Ces trois derniers points ont chacun fait l'objet d'une revue de la littérature pour illustrer notre propos.

Figure 2-1: Définition électrocardiographique des blocs atrioventriculaires



Adapté de [Mangrum *et al*, 2000]

II- DÉFINITION DES TROUBLES DE CONDUCTION ET SPÉCIFICITÉS DE L'ÉLECTROCARDIOGRAMME EN PÉDIATRIE

Définition du bloc atrioventriculaire. Les blocs atrioventriculaires sont classés en trois niveaux différents dont la gravité va croissant (Figure 2-1) Les blocs AV peuvent être localisés dans le noeud AV, le tronc du faisceau de His, une des branches du faisceau de His ou dans une combinaison de ces précédents sites (troubles de conduction étagés). Dans la mesure où les blocs nodaux ont un meilleur pronostic et une prise en charge distincte que les blocs infra-nodaux, la localisation du site du bloc est importante en pratique clinique. Même si celui-ci ne pourra être déterminé avec précision que par une exploration électrophysiologique, l'électrocardiogramme de surface et la réponse à des stimuli non-invasifs peuvent aider à le préciser: le massage sinocarotidien aggrave un bloc AV nodal et améliore un bloc AV infranodal; l'injection d'atropine et l'exercice améliorent la conduction AV nodale et aggravent la conduction infranodale.

Spécificités pédiatriques de l'électrocardiogramme. Bien que les mécanismes électrophysiologiques soient les mêmes chez l'adulte et chez l'enfant, les modifications anatomiques et physiologiques liées à l'âge donnent lieu à certaines spécificités de l'électrocardiogramme de l'enfant, et à des valeurs des différents paramètres ECG qui sont à interpréter en fonction de l'âge. En effet, des particularités qui seraient considérées comme pathologiques chez un adulte peuvent être parfaitement physiologiques chez un enfant, du fait des modifications anatomophysiologiques du coeur en croissance (Tableau 2-1 et Figure 2.2).

Compte-tenu de la physiologie foetale, le ventricule droit est plus développé que le ventricule gauche à la naissance. Les modifications des résistances vasculaires systémiques et la fermeture des shunts physiologiques (foramen ovale et canal artériel) résultent en une augmentation progressive de la masse du ventricule gauche qui devient supérieure à celle du ventricule droit vers l'âge de 1 mois de vie extra-utérine. Le ratio entre la masse du ventricule droit et celle du ventricule gauche est comparable à celle de l'adulte vers l'âge de 6 mois.

En conséquence, du fait de l'hypertrophie ventriculaire droite néonatale, une déviation axiale droite, de larges ondes R dans les dérivation précordiales et des ondes T positives en V1 sont normales chez le nouveau-né. L'onde T dans la dérivation V1 s'inverse vers le septième jour de vie et reste généralement négative jusqu'à l'âge de 7 ans. A la naissance, l'axe du complexe QRS est généralement compris entre $+60^\circ$ et $+160^\circ$, l'onde R est prédominante dans les dérivation précordiales droites et l'onde S prédominante dans les dérivation précordiales gauches.

Vers l'âge de 1 an, l'axe change progressivement pour se positionner entre $+10^\circ$ et $+100^\circ$. Parallèlement la fréquence cardiaque au repos diminue progressivement d'environ 140 bpm à la

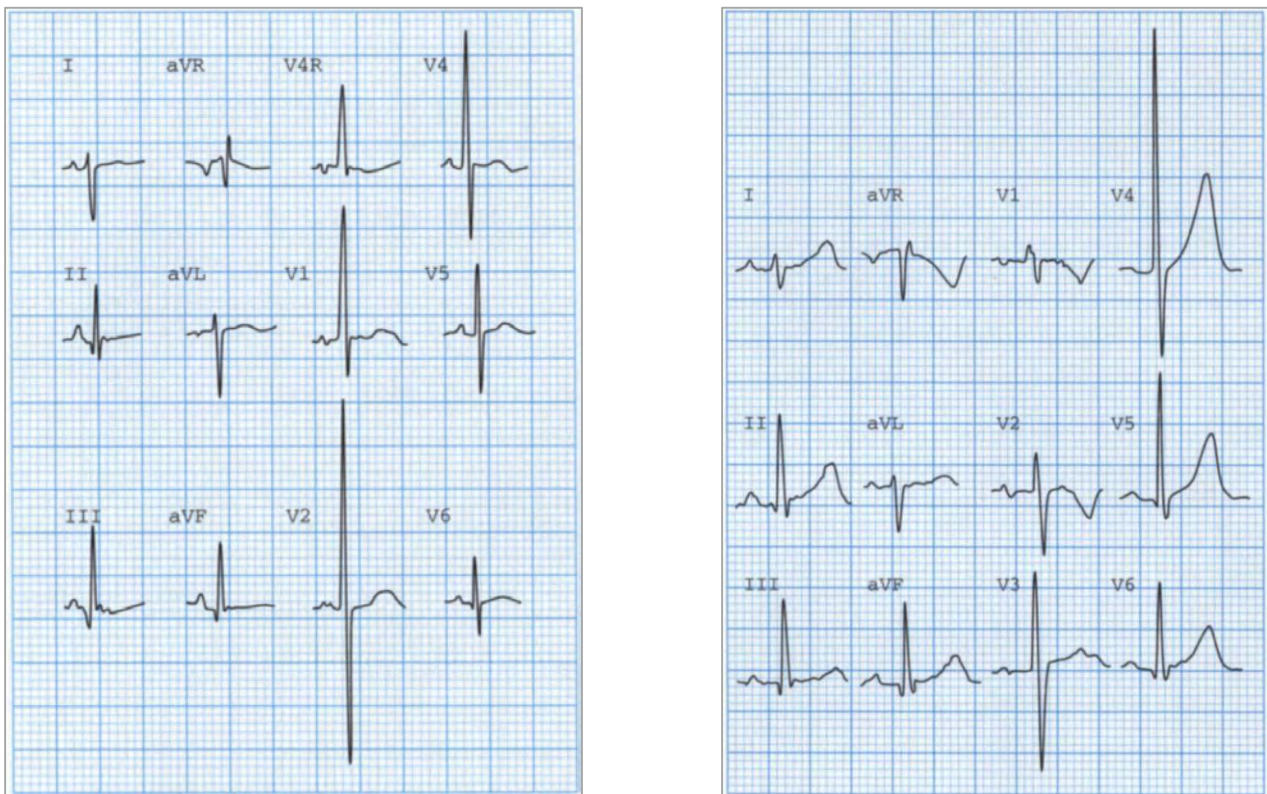
naissance à 120 bpm à l'âge de 1 an, 100 bpm à 5 ans et rejoint les valeurs adultes vers l'âge de 10 ans. La durée de l'intervalle PR diminue au cours des douze premiers mois, puis augmente progressivement durant l'enfance. La durée de l'onde P et celle du complexe QRS augmentent également avec l'âge (Tableau 2-2). La durée de l'intervalle QT dépend de la fréquence cardiaque et de l'âge, augmentant avec l'âge et diminuant avec la fréquence cardiaque. Une onde Q est généralement notée dans les dérivations latérales et inférieures, sans signification pathologique dans ces territoires.

Les valeurs seuils des mesures des différents intervalles de conduction ou de repolarisation en fonction de l'âge qui ont été retenus dans les travaux de cette thèse, en particulier le projet "SCN5A pédiatrique" au chapitre 4, sont présentés dans le tableau 2-3.

Tableau 2-1: Paramètres ECG anormaux chez l'adulte mais qui peuvent être normaux chez l'enfant

-
- 1- une fréquence cardiaque > 100 bpm
 - 2- un axe du complexe QRS > 90°
 - 3- une négativité des ondes T dans les dérivations précordiales droites
 - 4- des ondes R prédominantes dans les dérivations précordiales droites
 - 5- des intervalles PR et QT relativement courts
 - 6- une onde P et un complexe QRS relativement courts
 - 7- une onde Q dans les dérivations inférieures et latérales
-

Figure 2-2: Electrocardiogrammes illustrant les variations physiologiques liées à l'âge des paramètres électriques au cours de l'enfance



Tracé de gauche: Electrocardiogramme chez un nouveau-né de 3 jours de vie montrant une déviation axiale droite, une prédominance de l'onde R dans les dérivations V4R et V1 et une onde T encore positive en V1. La persistance d'une onde T positive dans les dérivations précordiales droites au-delà de la première semaine de vie est un signe d'hypertrophie ventriculaire droite.

Tracé de droite: Electrocardiogramme d'un enfant de 12 ans montrant un axe QRS dans les valeurs normales de celles d'un adulte, et la disparition de la prédominance de l'onde R dans les dérivations précordiales droites.

Adapté de [Goodacre et al, 2002]

Tableau 2-2: Valeurs ECG normales chez l'enfant, en fonction de l'âge

| Age | FC médiane (bpm) | PR (ms) | QRS (ms) | Amplitude de R (S) en V1 (mm) | Amplitude de R (S) en V6 (mm) |
|------------|-------------------------|----------------|-----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Naissance | 140 | 80-160 | <75 | 5-26 (1-23) | 0-12 (0-10) |
| 6 mois | 135 | 70-150 | <75 | 3-20 (1-17) | 6-22 (0-10) |
| 1 an | 120 | 70-150 | <75 | 2-20 (1-20) | 6-23 (0-7) |
| 5 ans | 100 | 80-160 | <80 | 1-16 (2-22) | 8-25 (0-5) |
| 10 ans | 80 | 90-170 | <85 | 1-12 (3-25) | 9-26 (0-4) |

FC: fréquence cardiaque

Adapté de [Fleming *et al*, 2011; Schwartz *et al*, 2002; Rijnbeek *et al*, 2001]

Tableau 2-3: Valeurs seuils retenues pour la définition des principales anomalies électriques en fonction de l'âge.

| | Nourrissons et jeunes enfants < 4ans | Enfants et adolescents ≥ 4 ans et < 16 ans | Adultes ≥ 16 ans |
|----------------------|--|--|-------------------------|
| BAV1 | PR ≥ 160 | PR ≥ 180 | PR ≥ 200 |
| BB incomplet | 80 ≤ QRS < 90 | 90 ≤ QRS < 100 | 110 ≤ QRS < 120 |
| BB complet | QRS ≥ 90 | QRS ≥ 100 | QRS ≥ 120 |
| TCNS | QRS ≥ 80 | QRS ≥ 90 | QRS ≥ 110 |
| HB | QRS < 120 | QRS < 120 | QRS < 120 |
| LQTS probable | QTc ≥ 470 | QTc ≥ 460 et syncope | QTc ≥ 460 et syncope |
| LQTS | QTc ≥ 480 | QTc ≥ 480 | QTc ≥ 480 |

Les valeurs sont exprimées en millisecondes. Seuls sont présentées ici les valeurs seuils des mesures des différents intervalles en fonction de l'âge. Les autres critères de mesure sont classiques et détaillés dans les références. BB: bloc de branche (droit ou gauche); TCNS: troubles de conduction intraventriculaires non spécifiques; HB: hémibloc (antérieur gauche ou postérieur gauche)

Adapté de [Priori *et al*, 2015; Surawicz *et al*, 2009; Schwartz *et al*, 2002; Rijnbeek *et al*, 2001]

III- LA BRADYCARDIE DU NOURRISSON ET DE L'ENFANT

III.1- Problématique et objectifs

La fréquence cardiaque constitue un signe d'appel majeur pour évaluer l'état physiologique des nourrissons et des enfants dans toutes les situations cliniques. Une bradycardie est un signe de gravité dans l'évaluation clinique d'un enfant malade et *a fortiori* d'un nourrisson [Akre *et al*, 2010]. Un rythme cardiaque lent peut répondre à des cadres nosologiques très variés, en particulier en pédiatrie. Dans la mesure où une bradycardie peut être physiologique mais peut aussi à l'inverse témoigner d'une anomalie du SCC exposant au risque de mort subite, une évaluation précise du rythme cardiaque et une orientation rapide du diagnostic étiologique sont indispensables devant un nourrisson ou un enfant ayant une fréquence cardiaque lente.

Cet article permet de placer les troubles héréditaires de la conduction atrioventriculaire du sujet jeune dans le contexte plus large de leurs diagnostics différentiels en pédiatrie, de leur évaluation clinique et de leur prise en charge. Avant sa soumission, il a été relu par le Pr. Edward P. Walsh, directeur du service d'électrophysiologie pédiatrique au Boston Children's Hospital / Harvard Medical School à Boston.

III.2- Résumé du travail

Ce travail est présenté dans l'article "**Evaluation and management of bradycardia in neonates and children**" situé à la fin de cette section. Il a été soumis à la revue *European Journal of Pediatrics* le 14/09/2015 (numéro de manuscrit: EJPE-D-15-01063, actuellement en cours de révision).

La bradycardie est un signe de gravité majeur dans l'évaluation d'un nourrisson ou d'un enfant présentant une affection aiguë ou la décompensation d'une pathologie chronique. La bradycardie se définit en pédiatrie comme une fréquence cardiaque inférieure à la normale pour l'âge. En effet, les modifications anatomiques et physiologiques d'un cœur en croissance produisent des paramètres électriques différents de ceux d'un cœur adulte et dont les normes varient avec l'âge.

Chez le nourrisson et l'enfant, un rythme cardiaque lent peut résulter d'une bradycardie sinusale, d'une bradycardie jonctionnelle ou d'un bloc atrioventriculaire de haut grade [Mangrum *et al*, 2000]. De très nombreuses étiologies sont à évoquer, certaines étant physiologiques. Une bradycardie peut survenir sur un cœur d'architecture normale ou s'associer à une malformation cardiaque congénitale. De nombreux variants dans différents gènes ont été identifiés à ce jour comme étant associés à des formes héréditaires de dysfonction sinusale ou de troubles de la conduction atrioventriculaire.

La prise en charge et le pronostic d'une bradycardie en pédiatrie sont étroitement liés à son étiologie. L'apparition de symptômes, le risque d'insuffisance cardiaque et le risque de tachyarythmies – en particulier de torsades de pointes – dues à la bradycardie motivent une intervention thérapeutique. En cas de retentissement hémodynamique, les recommandations communes des sociétés américaines de cardiologie et de pédiatrie (PALS: Pediatric Advanced Life Support) s'appliquent [Kleinman *et al*, 2010]. Les indications d'implantation d'un stimulateur cardiaque sont régies par les recommandations des sociétés américaines et européennes de cardiologie [Epstein *et al*, 2013; Brignole *et al*, 2013], rappelées dans cet article.

Quoi qu'il en soit, la reconnaissance des signes de gravité, un diagnostic étiologique précoce et si nécessaire une décision thérapeutique adaptée sont d'une importance majeure pour prévenir le risque de mort subite. Cette revue de la littérature a pour objectif de présenter une synthèse claire concernant l'évaluation et la prise en charge de la bradycardie du nourrisson et de l'enfant.

Evaluation and Management of Bradycardia in Neonates and Children

Alban-Elouen Baruteau^{a,b,c}, MD, James C. Perry^d, MD, Shubhayan Sanatani^e, MD,
Minoru Horie^f, MD, PhD, Anne M. Dubin, MD^g.

E-mail addresses:

Alban-Elouen Baruteau: alban-elouen.baruteau@u-bordeaux.fr

James C. Perry: jperry@rchsd.org

Shubhayan Sanatani: ssanatani@cw.bc.ca

Minoru Horie: horie@belle.shiga-med.ac.jp

Anne M. Dubin: amdubin@stanford.edu

Affiliations:

^aMorgan Stanley Children's Hospital, Division of Pediatric Cardiology, New York Presbyterian Hospital, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA; and ^bLIRYC Institute (Electrophysiology and Heart Modeling Institute), Division of Pediatric Cardiology, Hôpital Cardiologique du Haut Lévêque, Bordeaux-2 University, Bordeaux, France; and ^cL'Institut du Thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR6291, Nantes University, Nantes, France; and ^dRady Children's Hospital, Department of Pediatrics, Division of Cardiology, University of California, San Diego, San Diego, CA; and ^eBritish Columbia Children's Hospital, Department of Pediatric Cardiology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; and ^fDepartment of Cardiovascular and Respiratory Medicine, Shiga University of Medical Sciences, Otsu, Japan; and ^gLucile Packard Children's Hospital, Division of Pediatric Electrophysiology, Stanford University, Palo Alto, CA, USA.

Address correspondence to: Alban-Elouen Baruteau, Division of Pediatric Cardiology, Morgan Stanley Children's Hospital, New York Presbyterian / Columbia University Medical Center, 3959 Broadway, New York, NY 10032, USA, alban-elouen.baruteau@u-bordeaux.fr, +1-929-278-3452.

Short title: Pediatric bradycardia

Acknowledgements: The authors are grateful to Pr. Edward P. Walsh from Boston Children's Hospital, Harvard Medical School for his critical review of this manuscript and his useful comments.

Dr. Baruteau is supported by the 2015 Academic Research Grant from the European Heart Rhythm Association and a research grant from the Lefoulon Delalande Foundation - Institut de France.

Financial disclosure: None of the authors has any financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Word count: 4600.

Abstract (199 words)

Heart rate is commonly used in pediatric early warning scores. Age-related changes in the anatomy and physiology of infants and children produce normal ranges for electrocardiogram features that differ from adults and vary with age. Bradycardia is defined as a heart rate below the lowest normal value for age. Pediatric bradycardia most commonly manifests as sinus bradycardia, junctional bradycardia or atrioventricular block. As a result of several different etiologies, it may occur in an entirely structurally normal heart or in association with concomitant congenital heart disease. Genetic variants in multiple genes have been described to date in the pathogenesis of inherited sinus node dysfunction or progressive cardiac conduction disorders. Management and eventual prognosis of bradycardia in the young are entirely dependent upon the underlying cause. Reasons to intervene for bradycardia are the association of related symptoms and/or the downstream risk of heart failure or pause-dependent tachyarrhythmia. The simplest aspect of severe bradycardia management is reflected in the Pediatric and Advanced Life Support (PALS) Guidelines.

Conclusion: Early diagnosis and appropriate management are critical in many cases in order to prevent sudden death, and this review critically assesses our current practice for evaluation and management of bradycardia in neonates and children.

Keywords: bradycardia; atrioventricular block; sinus node dysfunction; sudden death; pacemaker

What is known:

- Bradycardia is defined as a heart rate below the lowest normal value for age. Age related changes in the anatomy and physiology of infants and children produce normal ranges for electrocardiogram features that differ from adults and vary with age.
- Pediatric bradycardia most commonly manifests as sinus bradycardia, junctional bradycardia or atrioventricular block.

What is new:

- Management and eventual prognosis of bradycardia in the young are entirely dependent upon the underlying cause. Bradycardia may occur in a structurally normal heart or in association with congenital heart disease. Genetic variants in multiple genes have been described.
- Reasons to intervene for bradycardia are the association of related symptoms and/or the downstream risk of heart failure or pause-dependent tachyarrhythmia. Early diagnosis and appropriate management are critical in order to prevent sudden death.

List of abbreviations: AV: atrioventricular; CHD: congenital heart disease; ECG: electrocardiogram; LQTS: long QT syndrome; PAC: premature atrial complex; PALS: Pediatric and Advanced Life Support; SACT: sinoatrial conduction time; SND: sinus node dysfunction; SNRT: sinus node recovery time

Contributors' statements: Dr. Baruteau conceptualized and designed the review article, drafted several parts of its initial version, and approved the final manuscript as submitted.

Dr. Perry contributed to draft the paragraph on management of bradycardia in neonates and children. He approved the final manuscript as submitted.

Dr. Sanatani contributed to draft the paragraph on approach of the patient with suspected bradycardia.

Dr. Horie contributed to draft the paragraph on genetic basis of pediatric bradycardia.

Dr. Dubin critically reviewed the whole paper and approved the final manuscript as submitted.

All authors approved the final manuscript as submitted and agreed to be accountable for all aspects of the work.

1 **1- INTRODUCTION**

2 Heart rate is an integral part of the clinical assessment of the child with acute illness, and is commonly used in
3 pediatric early warning scores [3,22,56,61]. Age related changes in the anatomy and physiology of infants and
4 children produce normal ranges for electrocardiogram (ECG) features that differ from adults and vary with age
5 [29]. Bradycardia is defined as a heart rate below the lowest normal value for age. But what is considered normal
6 in a 15 year-old adolescent may be markedly abnormal in the neonate [25,65]. Thus it is critical when defining
7 bradycardia in the pediatric population, to refer to normal values for age (Table 1). Bradycardia may be a sign of
8 a healthy athletic heart and increased vagal tone, but can also be a sign of conductive tissue disease and lead to
9 sudden death [53]. Thus both proper identification of rhythm and etiology and appropriate immediate therapeutic
10 measures are necessary when assessing the child with a low heart rate. This review article aims to provide a
11 comprehensive up-to-date approach for evaluation and management of bradycardia in neonates and children.

12
13

14 **2- ETIOLOGIES OF PEDIATRIC BRADYCARDIA**

15 Bradycardia most commonly manifests as sinus bradycardia, junctional bradycardia or atrioventricular (AV)
16 block in the pediatric population. These rhythms have several possible etiologies, which can be further divided
17 into either intrinsic or extrinsic causes (Table 2).

18

19 The most common extrinsic causes of bradycardia in the pediatric population include hypervagotonia, either
20 secondary to athletic conditioning, or other factors including breath-holding, increased intracranial pressure or
21 abdominal processes [2,41,72,73]. Cardiac vagal hyperactivity significantly contributes to the sinus bradycardia
22 observed in most malnourished adolescents with anorexia nervosa [20,43] Electrolyte disturbances may also
23 contribute to bradycardia in these patients, and heart rate is a predictor of spinal bone mineral density in
24 adolescents hospitalized for anorexia nervosa [20]. Apnea and bradycardia of the premature newborn is another
25 common cause of bradycardia in the infant [32,51].

26

27 Surgical procedures in patients with congenital heart disease can also result in sinus node dysfunction or AV
28 block. Congenital heart surgery commonly associated with post-operative sinus node dysfunction include atrial
29 septal defect repair, or transposition of great arteries s/p atrial switch procedure [77,83], whereas postoperative

30 complete atrioventricular block is mainly associated with mitral valve repair/replacement, aortic valve
31 repair/replacement atrioventricular canal surgery and ventricular septal defect surgery [47].
32
33 Congenital complete heart block, identified in utero or at birth in normal hearts, is found in 1 per 15.000 –
34 20.000 live born infants [14,53]. Maternal autoantibodies can be detected in over 95% of fetuses or newborns
35 presenting with atrioventricular block [18]. The pathophysiological process is believed to be due to immune-
36 mediated injury of the developing conduction system, which occurs as a result of transplacental passage of
37 maternal anti-SSA/Ro-SSB/La antibodies inducing a mechanistic sequence that inhibits or internalizes L-type
38 calcium channels [5,82]. Autoimmune congenital heart block is associated with a 8-16% neonatal mortality rate
39 and an approximately 10% risk of dilated cardiomyopathy development in survivors [37,55].
40
41 Non-immune heart block may be either inherited or acquired – due to acute or chronic infectious processes
42 (Lyme disease, Chagas disease, infectious endocarditis), myocarditis, surgical or catheterization-induced trauma,
43 drug-induced, coronary artery disease, hypersensitivity cardiomyopathy, metabolic abnormalities,
44 hypothyroidism or infiltrative processes. The most common class of medications causing bradycardia are the
45 beta-blockers [19,50]. However, most antiarrhythmic medications can cause some sinus node slowing or rarely,
46 AV block [67]. Bradycardia is frequently observed after potentially cardiotoxic chemotherapeutic agents are
47 administered [4].
48
49 Sinus node dysfunction or progressive cardiac conduction disease in structurally normal hearts may also be
50 inherited, presenting as primary electrical diseases [7]. Recent rapid advance in molecular genetics enabled us to
51 reveal a variety of genetic backgrounds underlying the pediatric bradycardia, especially of familial type, mainly
52 using the candidate gene approach method.
53 The development of the conduction system is a complex process. Several transcription factors, including
54 homeodomain proteins and T-box proteins, are essential for the morphogenesis of the cardiac conduction system
55 and the activation or repression of key regulatory genes: *GATA4*, *NKX2-5*, *TBX3* and *TBX5* [31]. Mutations in
56 the *TBX5* gene result in Holt-Oram syndrome [9,35], consisting of upper limb abnormalities, atrial septal defect
57 or ventricular septal defect and first-degree heart block or sinus bradycardia [59].
58 Mutations in *SCN5A*, which encodes for the alpha-subunit of the voltage-gated sodium channel have also been
59 associated with multiple conduction abnormalities, including long QT syndrome (LQTS) type 3 and Brugada

60 syndrome [63]. Patients with *SCN5A* mutations often display mixed arrhythmic phenotypes of cardiac sodium
61 channelopathies (overlap syndrome) [49]. Interestingly, age appears to influence type of conduction abnormality
62 seen; children with Brugada syndrome are more likely to present with bradycardia when compared to their adult
63 counterparts [1]. LQTS type 3 infants with gain-of-function type *SCN5A* mutations may display functional 2:1
64 AV block as a result of marked QT prolongation in addition to torsade de pointes form ventricular arrhythmias
65 [40]. Therefore, both *SCN5A* mutations with loss- and gain-of-function can lead to bradycardia in children.
66 Several other ion-channel coding genes have been associated with bradycardia including the *TRPM4* gene,
67 which results in familial AV block and right bundle branch block [44,48,70]. Genes associated with intracellular
68 calcium handling such as the *RyR2* and *CASQ2*, while more commonly associated with catecholaminergic
69 polymorphic ventricular tachycardia, have also been reported to produce sinus bradycardia [62], though it is
70 unclear why this occurs.

71
72

73 **3- APPROACH TO THE PATIENT WITH SUSPECTED BRADYCARDIA**

74 **History.** The history in approaching a patient with bradycardia focuses on two primary goals: the first is to
75 determine the presence of symptoms and establish symptom-rhythm correlation; the second is to identify an
76 etiology for the bradycardia [50]. Bradycardia is most commonly an incidental finding in the presence of
77 enhanced vagal tone [50,54]. ECGs, Holter and bedside monitors, and telemetry frequently capture this normal
78 and benign physiologic phenomenon [50]. The bradycardia in these instances is typically transient and due to
79 sinus node slowing. Sometimes this is accompanied by concurrent slowing of AV nodal conduction [50]. A brief
80 review of the clinical setting will quickly shed light on this common observation and, in such cases, no further
81 evaluation or intervention is required.

82

83 Bradycardia can be accompanied by symptoms of feeding difficulties in the infant and exercise intolerance in
84 older children. Syncope and presyncope are the most significant manifestations of bradycardia. The presence of
85 symptoms attributable to bradycardia is an indication for intervention.

86

87 Most sinus bradycardia is secondary to a non-cardiac process, such as those causing increased vagal tone [54].

88 There are many pathologic conditions in which this occurs, notably with illness in the gastro-intestinal system
89 and also in the nervous system [19]. Nausea is frequently accompanied by sinus bradycardia and occurs

90 ubiquitously [50]. The history will elucidate the cause of nausea or enhanced vagal tone in most cases. An
91 increasingly recognized group of patients are those pre-teen and teenagers presenting with a dysautonomia of
92 adolescence [2,13]. While these patients more commonly present with inappropriate sinus tachycardia, pre-
93 syncope and syncope occur in the context of bradycardia [13,52]. Vasovagal syncope is characterized by
94 sympathoexcitation, followed by vagal overcoming via the Bezold-Jarisch reflex. This reflex is generated by the
95 cerebral hypoperfusion due to vagal-activation-mediated sympathosuppression for the protection of
96 myocardium. Several factors are known to exacerbate and accelerate the vasovagal syncope including a/ fatigue,
97 dehydration, hypovolemia and reduced venous return; b/ blood shift and pooling in the lower body; c/
98 hypersensitivity of the stretch receptors in the left ventricular wall; and d/ fear, emotional stress, and reaction to
99 pain [36]. A detailed history excluding other causes is crucial and usually identifies the key elements of recent
100 rapid growth, pervasive non-specific complaints of palpitations or dizziness, a decrease in exercise tolerance,
101 and occasionally an inciting illness or injury (eg. concussion). A tilt table is not usually required, but can be
102 helpful in reproducing elements of the symptom-complex [2,13,52].

103

104 Medications are frequently the cause of bradycardia and have to be investigated.

105

106 Determining whether symptoms are secondary to bradycardia can be challenging. A chronically low heart rate
107 should theoretically not contribute to a new onset of symptoms, but certainly during rapid growth phases, this
108 appears to be the case. Additionally, meticulous documentation of the heart rate during symptoms should be
109 attempted before committing the child to an intervention such as a pacemaker [50]. Smartphone technology can
110 be helpful in this regard, with many children possessing this technology and a number of apps allowing
111 recording and tracking of heart rates.

112

113 **Family history.** A family history of individuals with early requirements for pacemaker insertion or septal
114 defects may point to a familial inherited heart rhythm disorder. Several genes have been implicated in
115 bradycardic rhythms [80]. A family history of sudden death in young, apparently healthy individuals may
116 indicate long QT syndrome [81]. In case of apparently idiopathic AV block, familial screening should be
117 considered and may provide strong arguments for heritability [8]. Autoimmune disorders are often familial as
118 well [68]. A history of maternal lupus or Sjogrens must be sought in any young individual presenting with
119 complete AV block [54]. Trisomy 21 is associated with hypothyroidism [17].

120

121 **Physical exam.** The physical exam does not usually contribute to determining the etiology of bradycardia. In the
122 newborn with complete congenital AV block secondary to maternal antibodies, a neonatal lupus can exist, with a
123 rash [15,16,54]. In the older patient, particularly young females, a low body mass index or significant weight
124 loss in the absence of a physical cause, is consistent with an eating disorder. The gradual reduction in metabolic
125 rate is accompanied by a lower body temperature and slow heart rate [20]. Physical manifestations of
126 hypothyroidism include a goiter in long-standing cases. Thyroid receptor $\alpha 1$ activation is markedly reduced by
127 thyroid hormone insufficiency, leading to a notable decline in expression of proteins such as enzymes that
128 regulate Ca^{2+} uptake and other proteins involved in cardiac contractility. This impairment of myocardial
129 contraction and relaxation leads to a reduction in heart rate [66,74,78].

130

131 **Electrocardiogram and Holter.** The ECG is of paramount importance in documenting and understanding
132 bradycardia. A slow sinus rate with a normal PR interval and QRS configuration indicates the sinus node as the
133 cause, either as exit block or sinus node dysfunction [50,54]. A gradually prolonging PR interval with non-
134 conducted P waves is seen in Wenckebach AV block. Complete dissociation of the P waves from the QRS
135 complexes is present in complete AV block. Care must be taken not to assume conduction is occurring if a P
136 wave appears to precede the occasional QRS. A very regular ventricular rhythm not influenced by P waves is
137 most consistent with absent AV conduction. Variability in the QRS rate suggests some degree of AV conduction
138 [50,54].

139

140 When cardiac repolarization is very long, the ensuing sinus beat may occur before the ventricle has repolarized.
141 This occurs in Long QT syndrome with a markedly increased QT interval. This is usually a transient
142 phenomenon in infants, but requires treatment directed at the underlying syndrome [11]. Another common cause
143 of bradycardia presenting in fetal life, and often persisting in the first month of life, is atrial ectopy [6]. Non-
144 conducted premature atrial complexes (PACs) occur during refractoriness of the conducting tissue and are not
145 followed by a ventricular depolarization. PACs can also reset the sinus node, resulting in a pause in the atrium.
146 In atrial bigeminy, one may observe a ventricular rate that is half the atrial rate. In the fetus, this may appear as a
147 bradycardic rhythm, which is abruptly normalized by doubling as the atrial bigeminy ceases, or as the PACs are
148 able to conduct [6].

149

150 An ambulatory ECG or Holter monitor is important in the work-up of bradycardia. Indications for pacemaker
151 insertion in AV block are based on average heart rates, determined by a 24-hour monitor. The Holter monitor
152 also provides important information on the range of ventricular rates attained by the junctional escape rhythm in
153 complete AV block [50]. The greater this range, the more favorable the prognosis in an early study in congenital
154 complete AV block. The Holter is also useful in assessing chronotropic responses in children in whom a graded
155 exercise test is not feasible, usually due to age or ability to perform a treadmill test [50]. The Holter monitor can
156 be helpful in establishing rhythm-symptom correlation in patients with frequent complaints.

157

158 **Echocardiography.** An echocardiogram is required to rule out complex forms of heart disease, which can be
159 associated with bradycardia [54,80]. While sinus bradycardia is a relatively common long-term complication of
160 post-operative heart disease, particularly that involving the atria or systemic veins, these conditions will have
161 been recognized and followed clinically [50]. Other conditions, which may have gone unrecognized, include
162 atrial defects, isomerism and AV-ventriculoatrial discordance [54,80]. All of these conditions may exist without
163 marked clinical findings and may present with bradycardia. In the current era of relatively widespread use of
164 echocardiography, however, this is less common. The echocardiogram has an important role in documenting
165 ventricular function and dimensions in the presence of known AV block. Ventricular dysfunction is an indication
166 for intervention in the AV block.

167

168 **Stress test.** A graded stress test can be performed using different methods. As alluded to above, a Holter monitor
169 with a young patient given instructions to be very active and to annotate the activities well will give important
170 information on the ability of the sinus and AV nodes to respond to enhanced adrenergic states. In older children,
171 running on a treadmill is a preferred option to assessing the response to exercise. There are heart rate determined
172 definitions for chronotropic incompetence and the diagnosis depends on not attaining a linear heart rate increase,
173 from baseline to peak heart rate, proportional to the maximal oxygen uptake (V_{O_2}) [64]. This increase can be
174 estimated using the age-predicted Chronotropic Index [64]. In the clinic or hospital setting, a patient being
175 evaluated for bradycardia can be asked to perform a few simple calisthenics, such as jumping jacks or ascending
176 stairs to crudely assess the heart rate response.

177

178 **Invasive testing.** Sinus node dysfunction (SND) can be diagnosed both invasively and non-invasively [45]. As
179 sporadic SND is more common than familial one, non-invasive pharmacological stimulation testing using

180 atropine, isoproterenol, or adenosine infusion, can uncover the dysfunction [26,60,75]. Transesophageal
181 electrophysiology studies also prove useful in SND diagnosis [34]. Intracardiac electrophysiology studies reveal
182 the sinus node recovery time (SNRT) and sinoatrial conduction time (SACT), the gold standard for SND
183 diagnosis [30,39,45,58,71]. The SNRT and SACT can be determined using atrial pacing and PAC. SNRT is a
184 measurement of the time between the last PAB and first spontaneous sinus beat, and is corrected by subtracting
185 the sinus cycle length from the SNRT (cSNRT). A prolonged cSNRT is indicative of SND (>550ms). SACT is a
186 measure of the time required for a sinus impulse to activate the atrium. Increased SACT yields a SND diagnosis
187 [30,39,45,58,71].

188

189

190 **4- MANAGEMENT OF BRADYCARDIA IN NEONATES AND CHILDREN**

191 **Early management algorithms.** Management and eventual prognosis of bradycardia in the young are entirely
192 dependent upon the underlying cause. The primary reasons to intervene for bradycardia, however defined, is the
193 association of related symptoms. A secondary consideration is the downstream risk of heart failure or pause-
194 dependent tachyarrhythmia. It must be said then that the simplest aspect of severe bradycardia management is
195 reflected in the Pediatric and Advanced Life Support (PALS) Guidelines (Figure 1) [42]. Under this scenario, the
196 bradycardia most frequently treated is sinus bradycardia, and is addressed by means of insuring adequate
197 ventilation first, obtaining cardiac rhythm monitoring, intravenous access and potentially utilizing exogenous
198 catecholamine and/or atropine.

199

200 Outside of basic PALS guidelines, each discrete cause of bradycardia will have its own series of management
201 options to consider. The majority of these causes tend to occur in the face of chronic conditions and require
202 consideration of rarely acute and more often sub-acute interventions.

203

204 In addition to the PALS Guidelines, a schema can be utilized to help determine intervention for bradycardia that
205 occurs with acute hemodynamic consequences and bradycardia that presents more potential long-term concerns
206 (Figure 2).

207

208 **Pacing guidelines.** The current AHA/HRS guidelines for pacing indications for children, adolescents, and
209 patients with congenital heart disease (CHD) are shown and focus on patients with symptoms of slow rates, high
210 grade AV blocks and slow rates for age or cardiac physiology [24]:

211

212 Class I

213 1. Permanent pacemaker implantation is indicated for advanced second-or third-degree AV block
214 associated with symptomatic bradycardia, ventricular dysfunction, or low cardiac output. (*Level of*
215 *Evidence: C*)

216 2. Permanent pacemaker implantation is indicated for SND with correlation of symptoms during age-
217 inappropriate bradycardia. The definition of bradycardia varies with the patient's age and expected
218 heart rate. (*Level of Evidence: B*)

219 3. Permanent pacemaker implantation is indicated for post- operative advanced second- or third-degree
220 AV block that is not expected to resolve or that persists at least 7 days after cardiac surgery. (*Level of*
221 *Evidence: B*)

222 4. Permanent pacemaker implantation is indicated for congenital third-degree AV block with a wide QRS
223 escape rhythm, complex ventricular ectopy, or ventricular dysfunction. (*Level of Evidence: B*)

224 5. Permanent pacemaker implantation is indicated for congenital third-degree AV block in the infant with
225 a ventricular rate less than 55 bpm or with congenital heart disease and a ventricular rate less than 70
226 bpm. (*Level of Evidence: C*)

227

228 Class IIa

229 1. Permanent pacemaker implantation is reasonable for patients with congenital heart disease and
230 sinus bradycardia for the prevention of recurrent episodes of intra-atrial reentrant tachycardia; SND
231 may be intrinsic or secondary to antiarrhythmic treatment. (*Level of Evidence: C*)

232 2. Permanent pacemaker implantation is reasonable for congenital third-degree AV block beyond the
233 first year of life with an average heart rate less than 50 bpm, abrupt pauses in ventricular rate that
234 are 2 or 3 times the basic cycle length, or associated with symptoms due to chronotropic
235 incompetence. (*Level of Evidence: B*)

- 236 3. Permanent pacemaker implantation is reasonable for sinus bradycardia with complex congenital
237 heart disease with a resting heart rate less than 40 bpm or pauses in ventricular rate longer than 3
238 seconds. (*Level of Evidence: C*)
- 239 4. Permanent pacemaker implantation is reasonable for patients with congenital heart disease and
240 impaired hemodynamics due to sinus bradycardia or loss of AV synchrony. (*Level of Evidence: C*)
- 241 5. Permanent pacemaker implantation is reasonable for unexplained syncope in the patient with prior
242 congenital heart surgery complicated by transient complete heart block with residual fascicular
243 block after a careful evaluation to exclude other causes of syncope. (*Level of Evidence: B*)
244
- 245 Class IIb
- 246 1. Permanent pacemaker implantation may be considered for transient postoperative third-degree AV
247 block that reverts to sinus rhythm with residual bifascicular block. (*Level of Evidence: C*)
- 248 2. Permanent pacemaker implantation may be considered for congenital third-degree AV block in
249 asymptomatic children or adolescents with an acceptable rate, a narrow QRS complex, and normal
250 ventricular function. (*Level of Evidence: B*)
- 251 3. Permanent pacemaker implantation may be considered for asymptomatic sinus bradycardia after
252 biventricular repair of congenital heart disease with a resting heart rate less than 40 bpm or pauses in
253 ventricular rate longer than 3 seconds. (*Level of Evidence: C*)
254
- 255 Class III
- 256 1. Permanent pacemaker implantation is not indicated for transient postoperative AV block with return of
257 normal AV conduction in the otherwise asymptomatic patient. (*Level of Evidence: B*)
- 258 2. Permanent pacemaker implantation is not indicated for asymptomatic bifascicular block with or without
259 first- degree AV block after surgery for congenital heart disease in the absence of prior transient
260 complete AV block. (*Level of Evidence: C*)
- 261 3. Permanent pacemaker implantation is not indicated for asymptomatic type I second-degree AV block.
262 (*Level of Evidence: C*)
- 263 4. Permanent pacemaker implantation is not indicated for asymptomatic sinus bradycardia with the longest
264 relative risk interval less than 3 seconds and a minimum heart rate more than 40 bpm. (*Level of*
265 *Evidence: C*)

266

267 **Sinus bradycardia and/or sinus node dysfunction.** Sinus bradycardia and/or sinus node dysfunction occurs in
268 a number of settings. Outside the spectrum of CHDs, sinus bradycardia is nearly always secondary to some other
269 cause, such as increased intracranial pressure, seizures, certain drug overdoses, hypothyroidism, congenital
270 central hypoventilation syndrome, athletic conditioning, long QT syndrome and eating disorders, which can
271 manifest varying degrees of slow sinus rates. Managing the underlying cause is the primary approach.
272 Temporary pacing is rarely needed, but when bradycardia is severe and treatment of the underlying cause not
273 expected to resolve it quickly enough, then a temporary transvenous pacing catheter can be placed, usually with
274 balloon-tipped or echo guidance, to the right ventricle. In very young infants, those with CHD and those with
275 myocarditis, a small surgical incision and epicardial temporary wire works quite well.

276

277 Sinus bradycardia in the newborn can be a sign of underlying Long QT syndrome and also be due to 2:1
278 conduction block due to very long QT intervals. Beta-blockade remains indicated for these patients and
279 epicardial pacing, usually dual chamber, is needed long-term.

280

281 In congenital central hypoventilation syndrome (“Ondine’s curse”), sinus arrest can be present and potentially
282 contribute to morbidity and mortality. Epicardial VVI pacing systems are useful and, with bipolar leads, do not
283 interfere with diaphragmatic pacemakers, if present.

284

285 **High-grade AV block.** Perhaps the clearest indications for management of bradycardia are in the setting of
286 high-grade atrioventricular blocks. Patients with congenital complete AV block who have rates that are too slow
287 or manifest wide QRS escape rhythms require permanent pacing system implantation. In the newborn and very
288 young patient, it is intuitively obvious that this requires an epicardial approach. There is remaining debate about
289 the need for initial dual chamber over single chamber pacing for newborns, to optimize AV synchrony [28].
290 Those receiving single chamber (VVIR) devices are traditionally upgraded to dual chamber pacing when they
291 are older/larger, often over ~40 kg. While transvenous pacing systems technically can be placed in younger,
292 smaller children, the practice is fraught with consequences of repeated entry into those venous structures and
293 risks of extraction of leads over many decades of life [79]. In recent years, it has been questioned whether all
294 children with congenital complete AV block might undergo biventricular pacing implantation to avoid the risks

295 of single site ventricular pacing on left ventricular function [31,57]. Data exists however to support epicardial
296 DDD systems with ventricular epicardial leads placed at the LV apex rather than the RV in most patients [38].
297
298 Myocarditis can include high grades of AV block and complete AV block requiring early pacing. As the disease
299 is commonly encountered in younger patients, temporary epicardial pacing wires can bridge the gap to observe
300 for recovery of conduction, by 1 week after presentation in 2/3, or until the patient is stable for a permanent
301 pacing system, necessary in ~1/4 [10]. AV block may also be observed in Lyme carditis and Kawasaki disease.
302 Management again depends on the patient's age and whether conduction returns, generally by 7-10 days, with a
303 narrow QRS and return of ventricular function.
304
305 Management of progressive AV block in the patient with congenitally corrected transposition depends on the
306 degree of block and patient age, as well as effect on underlying structural CHD. The patients warrant close
307 ambulatory monitoring to assess for development of high grade AV block [69].
308
309 Two items likely to undergo scrutiny that remain widespread in the language of pediatric cardiology warrant
310 comment regarding pacing guidelines: the "3 Second Rule" and the use of "critical" value lower heart rate cut-
311 offs.
312 The first, the 3 Second Rule, was promulgated soon after the publication in 1982 [12] of a burst suppression
313 pacing protocol performed in young patients with either surgical or congenital complete AV block in the early
314 days following CHD operations, as a means to predict outcome and development of symptoms. Those with
315 recovery times of 3.4 seconds or greater were more likely to be or to become symptomatic. This publication has
316 served as the reference, perhaps erroneously, for pacing indications in children for many years, including
317 patients without CHD and those well out of the early post-operative period. It has never been shown to be a risk
318 factor for prolonged asystole or sudden cardiac death. Also often cited is a 1983 manuscript on ventricular
319 pauses of 3 seconds or more [21]. This data refers to Holter findings in 53 individual adults over 19 years of age,
320 19 of whom had sinus arrest (none with normal heart), 29 with slow ventricular rates during atrial fibrillation and
321 5 with AV block. There are certainly no correlates from this report that should be drawn for young patients, with
322 or without CHD.
323 The lower heart rate criteria advocated for pacing are also suspect. With the introduction of increasingly longer
324 duration ambulatory cardiac rhythm monitoring systems, two weeks or more of heart rate data are now routinely

325 obtainable. Therefore the paradigms of what constitutes concerning or actionable bradycardia may be redefined
326 in the coming years. It is unknown to what extent newly revealed frequencies of sinus pauses and slower heart
327 rate averages and lowest rates may mean for management [27]. Important aspects concerning the long term
328 detrimental effects of bradycardia, larger stroke volumes and diastolic volumes and their effect on developing
329 heart failure over decades need to be investigated and open up new management schemes for therapy of
330 bradycardia.

331

332

333 **5- PROGNOSIS**

334 For much of the bradycardia population, prognosis is related to (a) cumulative risks of the need for pacing
335 system revisions over many years, (b) physiologic effects of various pacing modes on cardiac size and function,
336 (c) resolution of an underlying disease, such as myocarditis, and (d) status of CHD severity [23,46,76,].

337

338 Pacemaker system complications, replacements and revisions tend to be one to two time considerations in the
339 average adult age patient. Pediatric patients and those with CHD can look forward to multiple decades facing
340 these issues. Risks of pacemaker implantation are relatively low, but accrue over many years. There are few
341 reports of short-term complications to be expected for pacemaker implantation in the young, but a surprising
342 lack of long-term investigations.

343

344

345 **6- FUTURE EFFORTS**

346 It is clear that the guidelines for intervention for bradycardia are based on very loosely associated findings for
347 most scenarios. There is a paucity of meaningful research to draw upon to understand the long-term effects of
348 bradycardia on ventricular size and function that could alter our perception of proper timing and modes for
349 pacing therapies. There are also vague notions of what constitute significant symptoms and what risk
350 bradycardia bears for those symptoms and for increasing the likelihood of extrasystoles, which then serve as
351 triggers for tachyarrhythmia.

352

353 Importantly, there have been very few efforts to assess actual reductions of symptoms and other risk prevention
354 by pacemaker intervention in patients with sinus node dysfunction. Prior to the advent of catheter ablative

355 therapies for tachyarrhythmias, there were insightful clinical and basic science investigations of tachyarrhythmia
356 substrates and patient populations. The availability and sophistication of implantable cardiac rhythm
357 management systems has run far ahead of what we understand of the bradyarrhythmia substrates and functional
358 aspects of CHD care they are designed to address. Our field needs to play catch up.

359

360

361 **7- CONCLUSION**

362 Although rare, bradycardia is an important treatable cause of morbidity and mortality in neonates and children.
363 Clinicians must be aware of various etiologies to look at, as well as immediate therapeutic measures to take for
364 accurate evaluation and management of pediatric patients presenting with bradycardia. This review crystallizes
365 these aspects, highlighting the ongoing investigation in all aspects of care related to this complex group of
366 disorders. Future efforts are needed, especially regarding proper risk-assessment and long-term outcomes of
367 pediatric bradycardia. Several genes have been linked to inherited forms of sinus node dysfunction or cardiac
368 conduction disorders, and it is evident that as new insights are gleaned, management strategies continue to
369 evolve. Despite the many different etiologies, each with specific management and distinct outcomes, these
370 patients can do well with a careful, considered approach to the diagnostic evaluation and management plan.

371

372

373 **8- COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS**

374 Funding: none.

375 Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

376 Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any
377 of the authors.

9- REFERENCES

1. Abe K, Machida T, Sumitomo N, Yamamoto H, Ohkubo K, Watanabe I, Makiyama T, Fukae S, Kohno M, Harrell DT, Ishikawa T, Tsuji Y, Nogami A, Watabe T, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Motomura H, Makita N (2014) Sodium channelopathy underlying familial sick sinus syndrome with early onset and predominantly male characteristics. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 7:511-7.
2. Adkisson WO, Benditt DG (2015) Syncope due to autonomic dysfunction: diagnosis and management. *Med Clin North Am* 99:691-710.
3. Akre M, Finkelstein M, Eickson M, Liu M, Vanderbilt L, Billman G (2010) Sensivity of the pediatric early warning score to identify patient deterioration. *Pediatrics* 125:e763-69.
4. Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan D (2010) Cardiotoxicity of anticancer drugs: The need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst.* 102:14-25.
5. Ambrosi A, Sonesson SE, Wharen-Herlenius M (2014) Molecular mechanisms of congenital heart block. *Exp Cell Res* 325:2-9.
6. Api O, Carvalho J (2008) Fetal dysrhythmias. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 22:31-48.
7. Baruteau AE, Probst V, Abriel H (2015) Inherited progressive cardiac conduction disorders. *Curr Opin Cardiol* 30:33-9.
8. Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S, Mabo P, Schott JJ, Dina C, Chatel S, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Martins RP, Delasalle B, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Daubert JC, Le Marec H, Probst V. (2012) Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood non-immune isolated atrioventricular block. *Circulation* 126:1469-77.
9. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. (1997) Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* 15:30-5.
10. Batra AS, Epstein D, Silka MJ (2003) The clinical course of acquired complete heart block in children with acute myocarditis. *Pediatr Cardiol* 24:495-7.
11. Beinder E, Grancay T, Menendez T, Singer H, Hofbeck M (2001) Fetal sinus bradycardia and the Long QT Syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 185:743-747.
12. Benson DW, Spach MS, Edwards SB, Sterba R, Serwer GA, Armstrong BE, Anderson PAW (1982) Heart block in children. Evaluation of subsidiary pacemaker recovery times and ECG tape recordings. *Pediatr Cardiol* 2:39-45.
13. Boris J (2010) The role of the cardiologist in the evaluation of dysautonomia. *Cardiol Young.* 20:135-139.
14. Brucato A, Jonzon A, Friedman D, Allan LD, Vignati G, Gasparini M, Stein JI, Montella S, Michaelsson M, Buyon J. et al (2003) Proposal for a new definition of congenital complete atrioventricular block. *Lupus* 12:427-35.
15. Brucato A, Cimaz R, Stramba-Badiale M (2002) Neonatal Lupus. *Clin Rev Allergy Immunol.* 23:279-299.
16. Brucato A, Previtali E, Ramoni V, Ghidoni S (2010) Arrhythmias presenting in neonatal Lupus. *Scand J Immunol.* 72:198-204.
17. Cebeci A, Guven A, Yildiz M (2013) Profile of Hypothyroidism in Down's Syndrome. *J Clin Red Pediatr*

Endocrinol. 5:116-120.

18. Costedoat-Chalumeau N, Georgin-Lavialle S, Amoura Z, Piette JC (2005) Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibody-mediated congenital heart block. *Lupus* 14:660-4.
19. Cunha B (2000) The diagnostic significance of relative bradycardia in infectious disease. *Clin Microbiol Infect.* 6:633-634.
20. DiVasta AD, Walls CE, Feldman HA, Quach AE, Woods ER, Gordon CM, Alexander ME. (2010) Malnutrition and hemodynamic status in adolescents hospitalized for anorexia nervosa. *Arch Pediatr Adolesc Med* 164:706-13.
21. Ector H, Rolies L, De Geest H (1983) Dynamic electrocardiography and ventricular pauses of 3 seconds and more: etiology and therapeutic implications. *Pacing Clin Electrophysiol.* 6:548-51.
22. Egdell P, Finlay L, Pedley DK (2008) The PAWS score: validation of an early warning scoring system for the initial assessment of children in the emergency department. *Emerg Med J* 25:745-9.
23. Eliasson H, Sonesson SE, Salomonsson S, Skog A (2015) Outcome in young patients with isolated complete atrioventricular block and permanent pacemaker treatment: A nationwide study of 127 patients. *Heart Rhythm* epub. doi: 10.1016/j.hrthm.2015.06.028.
24. Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, Estes NA 3rd, Freedman RA, Gettes LS, Gillinov AM, Gregoratos G, Hammill SC, Hayes DL, Hlatky MA, Newby LK, Page RL, Schoenfeld MH, Silka MJ, Stevenson LW, Sweeney MO, Tracy CM, Epstein AE, Darbar D, DiMarco JP, Dunbar SB, Estes NA 3rd, Ferguson TB Jr, Hammill SC, Karasik PE, Link MS, Marine JE, Schoenfeld MH, Shanker AJ, Silka MJ, Stevenson LW, Stevenson WG, Varosy PD (2013) 2012 ACCF/AHA/HRS focused update incorporated into the ACCF/AHA/HRS 2008 guidelines for device-based therapy of cardiac rhythm abnormalities: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol.* 61:e6-75.
25. Fleming S, Thompson M, Stevens R, Heneghan C, Plüddemann A, Maconochie I, Tarassenko L, Mant D (2011) Normal ranges of heart rate and respiratory rate in children from birth to 18 years of age: a systematic review of observational studies. *Lancet* 377:1011-8.
26. Fragakis N, Iliadis I, Sidopoulos E, Lambrou A, Tsaritsaniotis E, Katsaris G (2007) The value of adenosine test in the diagnosis of sick sinus syndrome: susceptibility of sinus and atrioventricular node to adenosine in patients with sick sinus syndrome and unexplained syncope. *Europace* 9:559-562.
27. Frangini PA, Cecchin F, Jordao L, Martuscello M, Alexander ME, Triedman JK, Walsh EP, Berul CI. (2008) How revealing are insertable loop recorders in pediatrics? *Pacing Clin Electrophysiol.* 31:338-43.
28. Friedberg MK, Dubin AM, Van Hare GF, McDaniel G, Niksch A, Rosenthal DN (2009) Acute effects of single-site pacing from the left and right ventricle on ventricular function and ventricular-ventricular interactions in children with normal hearts. *Congenit Heart Dis* 4:356-61.
29. Goodacre S, McLeod K (2002) ABC of clinical electrocardiography: paediatric electrocardiography. *BMJ* 324:1382-5.
30. Graff B, Graff G, Kozluk E, Tokarczyk M, Piątkowska A, Budrejko S, Kozłowski D, Dąbrowska-Kugaćka A, Lewicka E, Świętecka G, Raczak G. (2011) Electrophysiological features in patients with sinus node dysfunction and vasovagal syncope. *Arch Med Sci.* 7:963-970.
31. Guerra VC, de Menezes Martins L, Oliveira RM, da Silva KR, Binotto MA, Tsutsui JM, Kallil R, Costa R,

- Mathias W Jr. (2015) Prevalence of Left Ventricular Dyssynchrony in Patients with Congenital Atrioventricular Block and Long-Term Pacing: A Three-Dimensional Echocardiographic Study. *Echocardiography* 32:1400-6.
32. Guilleminault C, Coons S (1984) Apnea and bradycardia during feeding in infants weighing greater than 2000 gm. *J Pediatr.* 104:932-5.
33. Hatcher CJ, Basson CT (2009) Specification of the cardiac conduction system by transcription factors. *Circ Res.* 105:620-30.
34. Hessling G, Brockmeier K, Ulmer H (2002) Transesophageal electrocardiography and atrial pacing in children. *J Electrocardiol.* 35:143-149.
35. Holt M, Oram S (1960) Familial heart disease with skeletal malformations. *Br Heart J.* 22:236-42.
36. Iwase S, Nishimura N, Mano T (2014) Role of sympathetic nerve activity in the process of fainting. *Front Physiol* 5:343.
37. Jaeggi ET, Hamilton RM, Silverman ED, Zamora SA, Hornberger LK (2002) Outcome of children with fetal, neonatal or childhood diagnosis of isolated congenital atrioventricular block. *J Am Coll Cardiol* 39:130-7.
38. Janoušek J, van Geldorp IE, Krupičková S, Rosenthal E, Nugent K, Tomaske M, Früh A, Elders J, Hiippala A, Kerst G, Gebauer RA, Kubuš P, Frias P, Gabbarini F, Clur SA, Nagel B, Ganame J, Papagiannis J, Marek J, Tisma-Dupanovic S, Tsao S, Nürnberg JH, Wren C, Friedberg M, de Guillebon M, Volaufova J, Prinzen FW, Delhaas T (2013) Permanent cardiac pacing in children: choosing the optimal pacing site: a multicenter study. *Circulation* 127:613-23.
39. Joung B, Chen P (2015) Function and dysfunction of human sinoatrial node. *Korean Circ J.* 45:184-191.
40. Kato K, Makiyama T, Wu J, Ding WG, Kimura H, Naiki N, Ohno S, Itoh H, Nakanishi T, Matsuura H, Horie M (2014) Cardiac channelopathies associated with infantile fatal ventricular arrhythmias: from the cradle to the bench. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 25:66-73.
41. Kenigsberg K, Griswold PG, Buckley BJ, Gootman N, Gootman PM (1983) Cardiac effects of esophageal stimulation: possible relationship between gastroesophageal reflux (GER) and sudden infant death syndrome (SIDS). *J Pediatr Surg.* 18:542-5.
42. Kleinman ME, de Caen AR, Chameides L, Atkins DL, Berg RA, Berg MD, Bhanji F, Biarent D, Bingham R, Coovadia AH, Hazinski MF, Hickey RW, Nadkarni VM, Reis AG, Rodriguez-Nunez A, Tibballs J, Zaritsky AL, Zideman D; (2010) Pediatric Basic and Advanced Life Support Chapter Collaborators. Part 10: Pediatric basic and advanced life support: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation.* 122:S466-515.
43. Kollai M, Bonyhay I, Jokkel G, Szonyi L (1994) Cardiac vagal hyperactivity in adolescent anorexia nervosa. *Eur Heart J* 15:1114-18.
44. Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I, Schulze-Bahr E, Brink P, Pongs O. (2009) Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest.* 119:2737-44.
45. Kugler J (1994) Sinus node dysfunction. *Prog Pediatr Cardiol.* 3:226-235.
46. Lau KC, Gaynor W, Fuller SM, Smoots KA, Shah MJ (2015) Long-term atrial and ventricular pacemaker lead survival after cardiac operations in pediatric patients with congenital heart disease. *Heart Rhythm* 12:566-73.
47. Liberman L, Silver ES, Chai P, Anderson BR (2015) Incidence and characteristics of heart block after

- congenital heart surgery in pediatric patients: a multicenter study. Heart Rhythm Society Scientific Sessions; Abstract AB40-02.
48. Liu H, El Zein L, Kruse M, Guinamard R, Beckmann A, Bozio A, Kurtbay G, Mégarbané A, Ohmert I, Blaysat G, Villain E, Pongs O, Bouvagnet P. (2010) Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 3:374-85.
 49. 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 PJ, George AL Jr, Roden DM. (2008) The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest.* 118:2219-29.
 50. Mangrum J, DiMarco J (2000) The evaluation and management of bradycardia. *New Eng J Med.* 342:703-709.
 51. Martin RJ, Wilson CG (2012) Apnea of prematurity. *Compr Physiol* 2:2923-31.
 52. McLeod K (2001) Dysautonomia and neurocardiogenic syncope. *Curr Opin Cardiol.* 16:92-96.
 53. Michaëlsson M, Engle MA (1972) Congenital complete heart block: an international study of the natural history. *Cardiovasc Clin* 4:85-101.
 54. Miller M, Shannon K, Wetzel G (2000) Neonatal bradycardia. *Progress Pediatr Cardiol.* 11:19-24.
 55. Moak JP, Barron KS, Hougen TJ, Wiles HB, Balaji S, Sreeram N, Cohen MH, Nordenberg A, Van Hare GF, Friedman RA, Perez M, Cecchin F, Schneider DS, Nehgme RA, Buyon JP. (2001) Congenital heart block: development of late-onset cardiomyopathy, an previously underappreciated sequela. *J Am Coll Cardiol* 37:238-42.
 56. Monaghan A (2005) Detecting and managing deterioration in children. *Paediatr Nurs* 17:32-5.
 57. Motonaga KS, Punn R, Axelrod DM, Ceresnak SR, Hanisch D, Kazmucha JA, Dubin AM. (2015) Diminished exercise capacity and chronotropic incompetence in pediatric patients with congenital complete heart block and chronic right ventricular pacing. *Heart Rhythm* 12:560-5.
 58. Narula O, Samet P, Javier R (1972) Significance of the sinus-node recovery time. *Circulation.* 45:140-158.
 59. Newbury-Ecob RA, Leanage R, Raeburn JA, Young ID (1996) Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study. *J Med Genet.* 33:300-7.
 60. Ohuchi H, Watanabe K, Kishiki K, Wakisaka Y, Echigo S (2007) Heart rate dynamics during and after exercise in postoperative congenital heart disease patients: Their relation to cardiac autonomic nervous activity and intrinsic sinus node dysfunction. *Am Heart J.* 154:165-171.
 61. Parshuram CS, Hutchinson J, Middaugh K (2009) Development and initial validation of the bedside paediatric early warning system score. *Crit Care* 13:R135.
 62. Postma AV, Denjoy I, Kamblock J, Alders M, Lupoglazoff JM, Vaksman G, Dubosq-Bidot L, Sebillon P, Mannens MM, Guicheney P, Wilde AA (2005) Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet.* 42:863-70.
 63. Remme CA (2013) Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects. *J Physiol.* 591:4099-116.
 64. Rhodes J, Tikkanen A, Jenkins K (2010) Exercise testing and training in children with congenital heart disease. *Circulation.* 122:1957-1967.
 65. Rijnbeek PR, Witsenburg M, Schrama E, Hess J, Kors JA (2001) New normal limits for the paediatric

- electrocardiogram. *Eur Heart J* 22:702-11.
66. Roberts C, Ladenson P (2004) Hypothyroidism. *Lancet*. 363:793-803.
67. Roden D, Darbar D, Kannankeril P (2007) Antiarrhythmic drugs. *Cardiovasc Med*. 2085-2101.
68. Shamim E, Miller F (2000) Familial autoimmunity and the idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 2:201-211.
69. Simmons MA, Rollinson N, Fishberger S, Qin L, Fahey J, Elder RW (2015) Modern Incidence of Complete Heart Block in Patients with L-looped Ventricles: Does Univentricular Status Matter? *Congenit Heart Dis*. Epub ahead of print.
70. Stallmeyer B, Zumhagen S, Denjoy I, Duthoit G, Hébert JL, Ferrer X, Maugendre S, Schmitz W, Kirchhefer U, Schulze-Bahr E, Guicheney P, Schulze-Bahr E. (2012) Mutational spectrum in the Ca-activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Hum Mutat*. 33:109-17.
71. Steinbeck G, Luderitz B (1975) Comparative study of sinoatrial conduction time and sinus node recovery time. *Br Heart J*. 37:956-962.
72. Stephenson JB (1978) Reflex anoxic seizures ('white breath-holding'): nonepileptic vagal attacks. *Arch Dis Child*. 53:193-200.
73. Swiryn S, McDonough T, Hueter DC (1984) Sinus node function and dysfunction. *Med Clin North Am*. 68:935-54.
74. Vargas-Uricoechea H, Sierra-Torres C (2014) Thyroid hormones and the heart. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 18:15-26.
75. Vavetsi S, Nikolaou N, Tsarouhas K, Lympelopoulos G, Kouzanidis I, Kafantaris I, Antonakopoulos A, Tsitsimpikou C, Kandylas J (2008) Consecutive administration of atropine and isoproterenol for the evaluation of asymptomatic sinus bradycardia. *Europace* 10:1176-1181.
76. Villain E, Coatsdoat-Chalumeau N, Marijon E, Boudjemline Y, Piette JC, Bonnet D (2006) Presentation and prognosis of complete atrioventricular block in childhood, according to maternal antibody status. *J Am Coll Cardiol* 48:1682-7.
77. Warnes CA (2006) Transposition of the great arteries. *Circulation* 114:2699-709.
78. Webb P (2004) Selective activators of thyroid hormone receptors. *Expert Opin Investig Drugs*. 13:489-500.
79. Wilhelm BJ, Thöne M, El-Scheich T, Livert D, Angelico R, Osswald B (2015) Complications and Risk Assessment of 25 Years in Pediatric Pacing. *Ann Thorac Surg* 100:147-53.
80. Wolf C, Berul C (2006) Inherited conduction system abnormalities- One group of diseases, many genes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 17:446-455.
81. Wolf C, Berul C (2008) Molecular mechanisms of inherited arrhythmias. *Curr Genomics*. 9:160-168.
82. Xiao GQ, Hu K, Boutjdir M (2001) Direct inhibition of expressed cardiac-l and t-type calcium channels by igg from mothers whose children have congenital heart block. *Circulation* 103:1599-604.
83. Yabek SM, Jarmakani JM (1978) Sinus node dysfunction in children, adolescent and young adults. *Pediatrics* 61:593-8.

Table 1: Normal heart rate according to age

| Age | Heart rate in bpm median (1-99th percentile) |
|----------------|--|
| Newborn (term) | 127 (90-164) |
| 0-3 months | 143 (107-181) |
| 3-6 months | 140 (104-175) |
| 6-9 months | 134 (98-168) |
| 9-12 months | 128 (93-161) |
| 12-18 months | 123 (88-156) |
| 18-24 months | 116 (82-149) |
| 2-3 years | 110 (76-142) |
| 3-4 years | 104 (70-136) |
| 4-6 years | 98 (65-131) |
| 6-8 years | 91 (59-123) |
| 8-12 years | 84 (52-115) |
| 12-15 years | 78 (47-108) |
| 15-18 years | 73 (43-104) |

Adapted from Fleming *et al*, 2011.

Table 2: Etiologies of Bradycardia

| Type of bradycardia | Possible etiologies | Causes |
|--|------------------------|---|
| Sinus /Junctional Bradycardia | Increased vagal tone | Well-trained athlete Breath holding spells Coughing Esophageal or nasopharyngeal stimulation Increased intracranial pressure Medications . Morphine, phenylephrine, edrophonium, physostigmine, neostigmine, methoxamine Neurocardiac syncope, Bezold-Jarisch reflex Sleep Anorexia nervosa |
| | Sinus node dysfunction | Inherited sinus node dysfunction CHD, atrial septal defect Congenital heart surgery |
| | Miscellaneous | Hypothermia Electrolyte abnormalities . hypo/hyper kalemia . hypo/hyper calcemia . hypomagnesemia . hypoglycemia Hypothyroidism Apnea-bradycardia of prematurity |
| Complete AV block | Congenital | Maternal connective tissue disease . Lupus erythematosus . Sjögren syndrome Inherited AV block Long QT syndrome CHD, L-transposition of great arteries Muscular dystrophy Metabolic and mitochondrial disease . Kearns-Sayre syndrome . Carnitine deficiency . Glycogen storage disease Idiopathic |
| | Acquired | Congenital heart surgery Acute or chronic infection . Myocarditis . Endocarditis . Lyme disease, Chagas disease . Diphtheria, rubella, mumps, trichinosis . Rocky Mountain spotted fever . Human immunodeficiency virus Acute rheumatic disease Coronary artery disease Eosinophilic cardiomyopathy |

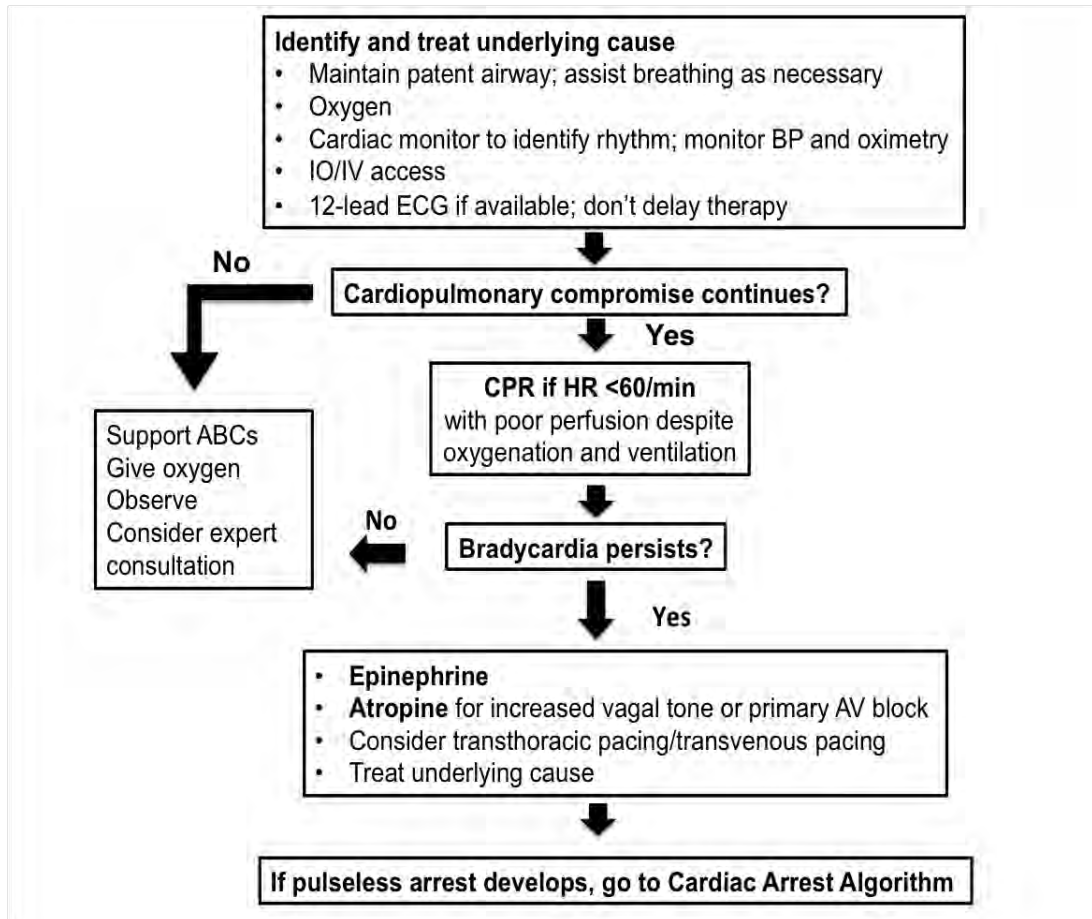
CHD: congenital heart disease

Table 3: History of “red flags” requiring urgent referral to pediatric cardiology

History of “red flags”

- . History of heart murmur or congenital heart disease
 - . Syncope, especially if unusual triggers such as loud noises, exercise, fright or extreme emotional stress
 - . Other associated symptoms such as chest pain, palpitations or dyspnea
 - . Family history of sudden cardiac death, long QT syndrome, sensorineural hearing loss, familial heart disease, pacemaker implantation
 - . Medications that can result in bradycardia
 - . Absence of usual premonitory symptoms or precipitating factors associated with neutrally mediated lypothymia or syncope
-

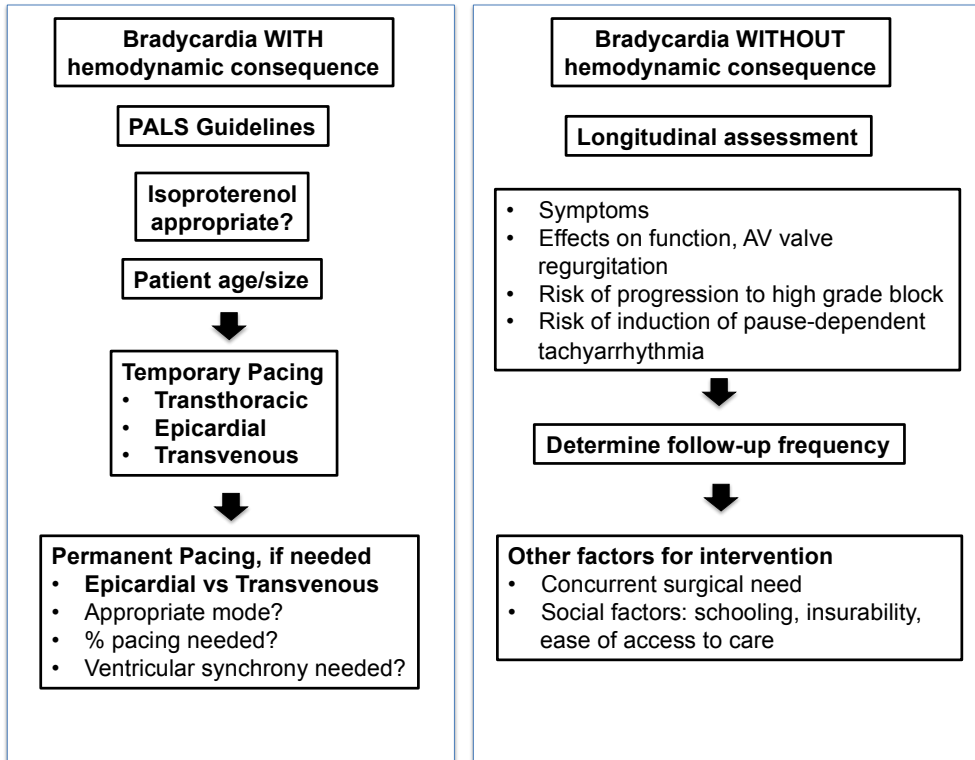
Figure 1: Pediatric bradycardia with a pulse and poor perfusion algorithm (PALS).



Cardiopulmonary compromise defined by hypotension and/or acutely altered mental status and/or signs of shock. PALS means: Pediatric Advanced Life Support.

Adapted from Kleinman *et al*, Circulation 2010;122:S876-S908.

Figure 2: Algorithm for management of bradycardia according to hemodynamic consequences



IV- LE BLOC ATRIO-VENTRICULAIRE EN PÉDIATRIE

IV.1- Problématique et objectifs

Résultant d'étiologies très diverses, le BAV congénital et de l'enfance répond à une physiopathologie hétérogène et complexe et connaît des profils évolutifs distincts en fonction de l'étiologie sous-jacente. Certaines formes sont héréditaires, et à ce jour de nombreuses mutations ont été décrites dans différents gènes. Par ailleurs, si les indications de stimulation cardiaque permanente sont bien codifiées par les recommandations des sociétés savantes, les techniques de stimulation évoluent, et les voies d'abord ne sont pas toujours uniformes ou consensuelles, en particulier en pédiatrie et dans les cardiopathies congénitales. Elles doivent prendre en compte les contraintes anatomiques en cas de malformation cardiaque, le potentiel de croissance du jeune enfant et les conséquences sur le long-terme pour un patient qui sera stimulé toute sa vie.

Afin d'optimiser la prise en charge de ces malades et prévenir la survenue d'une mort subite, les pédiatres et cardiologues doivent avoir connaissance des dernières avancées diagnostiques et thérapeutiques dans ce domaine. L'objectif de ce travail est donc de faire une mise au point complète et actualisée sur les mécanismes physiopathologiques, l'histoire naturelle et la prise en charge du BAV diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance.

IV.2- Résumé du travail

Ce travail est présenté dans l'article "**Congenital and childhood atrioventricular blocks: pathophysiology and contemporary management**" situé à la fin de cette section. Il a été soumis à la revue *Pediatrics* le 10 juillet 2015 (numéro de manuscrit: 2015-2448, actuellement en cours de révision).

Les troubles de la conduction atrio-ventriculaire sont une pathologie rare chez le nourrisson et l'enfant, la prévalence estimée du bloc atrioventriculaire congénital étant de 1 pour 15.000 à 20.000 naissances [Michaelsson *et al*, 1997]. Le bloc atrioventriculaire est défini comme congénital s'il est diagnostiqué *in utero*, à la naissance ou au cours du premier mois de vie extra-utérine [Brucato *et al*, 2003; Bordachar *et al*, 2013]. Le processus physiopathologique est alors immunologique, médié par les auto-anticorps maternels anti-Ro/SSA et/ou anti-La/SSB qui traversent la barrière placentaire. Le BAV de l'enfance est quant-à-lui diagnostiqué entre le premier mois de vie et la dix-huitième année. Résultant d'étiologie variées, il peut survenir sur un coeur d'architecture normale, ou s'associer à une malformation cardiaque congénitale.

Certaines formes de troubles de conduction dégénératifs sur coeur sain se présentent comme des maladies électriques primitives dues à des mutations dans les gènes *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN10A*,

TRPM4, *KCNK17* et dans les gènes codant pour les connexines [Schott *et al*, 1999; Makita *et al*, 2012; Baruteau *et al*, 2015]. Certaines formes de troubles conductifs dûs à une mutation du gène *SCN5A* s'intègrent dans le cadre de syndromes chevauchants [Kanter *et al*, 2012]. Par ailleurs il a été montré que lorsque le BAV est considéré comme étant idiopathique, bien que d'apparence sporadique, le dépistage parental électrocardiographique apporte des arguments forts pour une héritabilité du trouble conductif, justifiant un dépistage familial systématique [Baruteau *et al*, 2012b].

Les indications de stimulation cardiaque permanente de l'European Society of Cardiology et de l'American Heart Association sont rappelées [Brignole *et al*, 2013; Epstein *et al*, 2013] avant d'aborder les considérations techniques, les controverses quant à la voie d'abord endovasculaire ou epicardique, le mode de stimulation et les principales perspectives actuellement au stade pré-clinique. Un diagnostic précoce et une prise en charge adaptée permettent de prévenir la mort subite chez ces patients. Cette revue dresse un tableau complet et actualisé sur le bloc atrioventriculaire congénital et de l'enfance.

**Congenital and Childhood Atrioventricular Blocks:
Pathophysiology and Contemporary Management**

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Pediatrics</i> |
| Manuscript ID: | Draft |
| Article Type: | State of the Art Review |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Baruteau, Alban-Elouen; Morgan Stanley Children's Hospital at New York Presbyterian, Columbia University Medical Center, Pediatric Cardiology; L'Institut du Thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR 6291, Nantes University, Pediatric Cardiology Pass, Robert; Montefiore Children's Hospital, Albert Einstein College of Medicine, Pediatric Electrophysiology Thambo, Jean-Benoit; IHU LIRYC, CHU Bordeaux, Bordeaux-II University, Pediatric Cardiology Spotnitz, Henry; New York Presbyterian Hospital, Columbia University Medical Center, Surgery Le Pennec, Solene; CHU Rennes, LTSI, INSERM IMR1099, Rennes-1 University, Pediatric Cardiology Behaghel, Albin; CHU Rennes, LTSI, INSERM IMR1099, Rennes-1 University, Pediatric Cardiology Perdreau, Elodie; IHU LIRYC, CHU Bordeaux, Bordeaux-II University, Pediatric Cardiology Combes, Nicolas; Clinique Pasteur, Pediatric Electrophysiology Lieberman, Leonardo; Morgan Stanley Children's Hospital at New York Presbyterian, Columbia University Medical Center, Pediatric Electrophysiology McLeod, Christopher; Mayo Clinic, Mayo Clinic College of Medicine, Cardiovascular Diseases |
| Keyword/Topic: | Cardiovascular Disorders < Cardiology, Cardiac Surgery < Cardiology |



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Congenital and Childhood Atrioventricular Blocks: Pathophysiology and Contemporary Management

Alban-Elouen Baruteau^{a,b,c}, MD, Robert H. Pass^d, MD, Jean-Benoit Thambo^c, MD, PhD, Henry M. Spotnitz, MD^e, Solène Le Pennec^f, MD, Albin Behaghel^f, MD, Elodie Perdreau^c, MD, Nicolas Combes^g, MD, Leonardo Liberman^a, MD, Christopher J. McLeod^h, MD, PhD.

Affiliations: ^aMorgan Stanley Children's Hospital, Division of Pediatric Cardiology, New York Presbyterian Hospital / Columbia University Medical Center, New York, NY, USA; and ^bL'Institut du Thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR6291, Nantes University, Nantes, France; and ^cIHU LIRYC, CHU Bordeaux, Department of Pediatric Cardiology, Bordeaux-II University, Bordeaux, France; and ^dMontefiore Children's Hospital, Division of Pediatric Electrophysiology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA; and ^eNew York Presbyterian Hospital, Department of Surgery, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA; and ^fCHU Rennes, Department of Cardiology, LTSI, INSERM 1099, Rennes-1 University, Rennes, France; and ^gClinique Pasteur, Department of Cardiology, Toulouse, France; and ^hMayo Clinic, Division of Cardiovascular Diseases, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA.

Address correspondence to: Alban-Elouen Baruteau, Division of Pediatric Cardiology, Morgan Stanley Children's Hospital, New York Presbyterian / Columbia University Medical Center, 3959 Broadway, New York, NY 10032, USA, aeb2242@cumc.columbia.edu, 929-278-3452.

Short title: Congenital and Childhood Atrioventricular Blocks

Abbreviations: ACC: American College of Cardiology; AHA: American Heart Association; AV: atrioventricular; ccTGA: congenitally corrected transposition of the great arteries; CHB: congenital heart block; CHD: congenital heart disease; CRT: cardiac resynchronization therapy; DCM: dilated cardiomyopathy; ESC: European Society of Cardiology; HRS: Heart Rhythm Society; PCCD: progressive cardiac conduction disease; SVC: superior vena cava.

Keywords: heart block; pacemaker; pathophysiology; outcomes; congenital heart disease.

Funding source: Dr. Baruteau has obtained a research grant from the French Federation of Cardiology and from the Lefoulon-Delalande Foundation - l'Institut de France.

Financial disclosure: None of the authors has any financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Word count: 3983.

Contributors' statements:

Alban-Elouen Baruteau: Dr. Baruteau conceptualized and designed the review article, drafted several parts of its initial version, and approved the final manuscript as submitted.

Robert H. Pass: Dr. Pass drafted the paragraph on postoperative heart blocks and the one on native heart blocks associated with congenital heart disease. He approved the final manuscript as submitted.

Jean-Benoit Thambo: Dr. Thambo drafted the paragraph on immune-mediated AV block. He approved the final manuscript as submitted.

Solene Le Pennec: Dr. Le Pennec drafted the paragraph on treatment options during pregnancy and critically revised the initial version of the paper. She approved the final manuscript as submitted.

Albin Behaghel: Dr. Behaghel drafted the part describing permanent pacemaker implantation. He approved the final manuscript as submitted.

Elodie Perdreau: Dr. Perdreau drafted the part on native heart blocks associated with congenital heart disease. She approved the final manuscript as submitted.

Christopher McLeod: Dr. McLeod drafted the management section. He critically reviewed the whole paper and approved the final manuscript as submitted.

Henry Spotnitz, Leonardo Liberman, Nicolas Combes: Drs. Spotnitz, Liberman and Combes critically reviewed the article and added substantial contents to this paper. They approved the final manuscript as submitted.

All authors approved the final manuscript as submitted and agreed to be accountable for all aspects of the work.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract (211 words)

Cardiac conduction disorders are rare syndromes in neonates and children. Atrioventricular block is classified as congenital if diagnosed *in utero*, at birth, or within the first month of life. The pathophysiological process is believed to be due to immune-mediated injury of the conduction system, which occurs as a result of transplacental passage of maternal anti-SSA/Ro-SSB/La antibodies. Childhood atrioventricular block is therefore diagnosed between the first month and the 18th year of life. As a result of several different etiologies, it may occur in an entirely structurally normal heart or in association with concomitant congenital heart disease. Genetic variants in multiple genes have been described to date in the pathogenesis of inherited progressive cardiac conduction disorders. The indications for permanent pacing in children or adults with CHD are similar to those in acquired heart disease, yet there are important differences in the approach based primarily on anatomy and somatic growth. Techniques of cardiac pacing have also evolved to allow safe permanent cardiac pacing in almost all patients, including those with structural heart abnormalities. Early diagnosis and appropriate management are critical in many cases in order to prevent sudden death, and this review critically assesses our current understanding of the pathogenetic mechanisms, clinical course and optimal management of congenital and childhood AV block.

Review Copy

BACKGROUND

Cardiac conduction disorders are rare syndromes in neonates and children (1,2). As a result of several different etiologies, it may occur in an entirely structurally normal heart or in association with concomitant congenital heart disease (CHD). In contrast to acquired atrioventricular (AV) conduction block, congenital heart block (CHB) – identified *in utero* in normal hearts – holds a significantly different prognosis with an increased risk of late-onset cardiomyopathy. Fundamentally, the pathogenesis is also disparate, driven by different maternal clinical features and an increased risk of recurrence in future pregnancies. For these reasons, AV block is classified as congenital if diagnosed *in utero*, at birth, or within the first month of life. Therefore, childhood AV block is diagnosed between the first month and the 18th year of life.(1) The estimated prevalence of congenital heart block is 1 per 15.000–20.000 live births.(2)

ATRIOVENTRICULAR CONDUCTION DISORDERS IN STRUCTURALLY NORMAL HEARTS

1- IMMUNE-MEDIATED AV BLOCK

Although they still have their shadows, pathophysiology, therapeutic approach and long-term prognosis of immune-mediated AV block have been extensively studied, as it is one of the leading causes of congenital heart blocks.

1.1. Pathophysiology. Congenital AV block can be passively acquired via an autoimmune process affecting the developing heart due to the transplacental passage of maternal anti-Ro/SSA and/or anti-La/SSB autoantibodies. Entering the fetal circulation, they can directly bind L-type calcium channels on fetal cardiomyocytes and significantly, but reversibly, inhibit

1
2
3 the related currents. However, in some cases, for unclear reasons, the prolonged exposure to
4 anti-Ro/SSA antibodies may induce calcium-channel internalization, in turn triggering a
5 complex and only in part mechanistically known perturbation of the cytoplasmic calcium
6 metabolism which ultimately leads to apoptosis and cell death, and then to local
7 inflammation. If the process is not stopped in this phase, the inflammatory damage proceeds,
8 thus eventually resulting in fibrosis and calcification of the cardiac conduction system. This
9 mechanistic sequence, also known as “calcium channel hypothesis”, is currently recognized as
10 the more attractive theory possible explaining the pathogenesis of the disease.(3,4) Maternal
11 autoantibodies can be detected in over 95% of fetuses or newborns presenting with AV block,
12 namely congenital AV block.(5) In contrast, maternal autoantibodies have been detected in
13 only a minority of children, in whom AV block was diagnosed beyond the neonatal period, a
14 different, distinct clinical entity.(1,6,7) However, some isolated AV blocks diagnosed beyond
15 the neonatal period are also immune-mediated, even with late detection of maternal anti-
16 Ro/SSA autoantibodies.(8) This condition, emerging in childhood or even in the adult age,
17 represents a late progressive congenital form of immune AV block with the late development
18 of a subclinical anti-Ro/SSA induced congenital damage of the conduction system, related to
19 a not fully understood autoantibody-independent worsening with age.(9) Between 2-5% of
20 fetuses and infants whose mothers are autoantibody-positive develop AV block, and the risk
21 to subsequent pregnancies is substantial (ranging between 12 and 25%) in mothers who have
22 had a child with congenital AV block.(10) In up to a third of infants with congenital AV
23 block, a characterized autoimmune disease, such as lupus, is present in the mother.(10)
24 However, in the large majority of the cases, AV block occurs in fetuses of healthy, silently
25 anti-Ro/SSA antibodies-carrying mothers. The diagnosis of mothers’ seropositivity is thus
26 usually made only after congenital AV block detection. In a recent prospective study of 186
27 antibody-exposed fetuses and infants, it has been demonstrated that mothers of children with
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 cardiac involvement were less likely to have had a connective tissue disease than mothers of
4
5 children without cardiac involvement.(11)
6

7 **1.2. Diagnosis of fetal AV block.** Fetal echocardiography is the gold standard for the
8
9 diagnosis of congenital AV block. All M-mode and Doppler echocardiographic techniques
10
11 rely on the relationship between atrial and ventricular mechanical events.(12) Although
12
13 clinical applications of both fetal electrocardiography and fetal magnetocardiography are
14
15 more recent, these two noninvasive tools are promising, being able to more precisely diagnose
16
17 fetal arrhythmias and conduction disorders.(13,14) Complete fetal AV block develops during
18
19 gestational weeks 16 to 24, although a later onset of the phenomenon up to gestational week
20
21 34 has been described.(15,16)
22
23
24

25 **1.3. Clinical course.** CHB derived from an autoimmune process is associated with a high
26
27 neonatal mortality rate.(10,17) The estimated overall mortality without pacing is estimated to
28
29 be around 8-16% in infants and half as much in children and adults.(17,18) Interestingly,
30
31 cardiac dilatation and impaired ventricular function can develop as long-term sequelae in
32
33 those who forego pacing and those who are permanently paced. Without pacing support, it
34
35 appears that the slow heart rates and associated higher stroke volumes probably drive this
36
37 process,(18) but with pacing, the current hypothesis centers on a pacing-induced
38
39 cardiomyopathy. Globally, the prevalence of dilated cardiomyopathy (DCM) in CHB ranges
40
41 from 5-30%.(19-21) Various pathophysiological processes, including transient myocarditis or
42
43 immune-mediated myocardial injury, have been proposed to explain the development of
44
45 ventricular dilatation and dysfunction. Late-onset dilated cardiomyopathy in patients with
46
47 complete heart block may be a sequela of *in utero* autoimmune myocarditis, or due to its
48
49 postnatal reactivation.(7) Right and left ventricular endocardial fibroelastosis and fibrosis
50
51 have been observed at autopsy. These observations were not limited to the conduction system
52
53 and involved the working ventricular myocardium. The detrimental effects of maternal
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 antibodies directed against fetal cardiac tissue provided evidence in favor of the
4 immunopathologic role played by the maternal autoantibodies in congenital AV block. In
5 view of the myocardial dystrophic changes and adverse remodeling caused by ventricular
6 desynchronization, right ventricular pacing has been suggested as an important cause of
7 DCM.(19-21) In some patients, the discontinuation of right ventricular pacing or upgrade to
8 cardiac resynchronization therapy alone normalized systolic function, which would not be
9 expected to occur if ongoing myocarditis or other autoimmune factors were the only cause of
10 DCM.(22-24)
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 21 22 23 **2- INHERITED AV BLOCK**

24
25 Inherited progressive cardiac conduction disease (PCCD) is diagnosed in patients less than 50
26 years of age with an unexplained progressive conduction abnormality but with an otherwise
27 structurally normal heart, especially if there is a family history of PCCD. This excludes the
28 skeletal myopathies and muscular dystrophies, given the recognized impact of such
29 progressive disorders on the cardiac muscle.(25) Since the publication of Morquio's first
30 report of familial segregation of heart blocks in 1901, major advances have been made in our
31 understanding of the clinical, genetic and molecular characteristics of inherited PCCD.
32 Familial clustering of PCCD of unknown cause, including congenital AV block, has been
33 reported. Published pedigrees have shown an autosomal dominant inheritance with
34 incomplete penetrance and variable expressivity.(26,27) Inherited PCCD in structurally
35 normal hearts presents as a primary electrical disease and has been linked to genetic variants
36 in the ion channel genes *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN10A*, *TRPM4*, *KCNK17* as well as in genes
37 coding for cardiac connexin proteins.(28-30) Moreover, *SCN5A* mutation carriers tend to
38 exhibit "cardiac sodium channelopathy overlap syndrome", with overlapping clinical
39 manifestations of the distinct *SCN5A*-related syndromes and an altered cardiac conduction in
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 many cases.(31) It is now clear that complex pathophysiological processes involving many
4 genes and gene networks may lead to the occurrence of atrioventricular and intraventricular
5 block. It is likely that only a small fraction of these genetic defects have been identified, and it
6 is likely that genetic tests could help in the future to better determine the risk of progression of
7 a conduction defect and hence determine the best timing for pacemaker implantation.
8
9
10
11
12
13
14
15

16 **3- APPARENTLY “IDIOPATHIC” AV BLOCK**

17
18 Rarely, AV block of unknown origin appears during childhood, in the absence of maternal
19 antibodies, structural heart disease, or other overt causes. Scientific literature is scarce
20 regarding the etiology and the clinical course of these patients with apparently idiopathic heart
21 block. In the first large-scale study, looking for heritability of pediatric idiopathic heart block
22 in a French nationwide cohort, Baruteau et al. observed a high degree of inheritance and a
23 strong genetic background in the pathogenesis of congenital and childhood non-immune
24 isolated AV block.(32,33) Thus, familial screening should be considered and may provide
25 strong arguments for heritability, even in patients where the disorder appears to be sporadic
26 and idiopathic.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **ATRIOVENTRICULAR CONDUCTION DISORDERS IN ASSOCIATION WITH**

44 **CONGENITAL HEART DISEASE**

45 **1- NATIVE**

46
47 Recent genetic findings suggest that approximately 10% of sporadic CHD may have *de novo*
48 mutations that significantly contribute to the disease process.(34) Mutations in genes
49 encoding for transcription factors critical for cardiac chamber formation, endocardial cushion
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 remodeling and conduction system development, like *NKX2.5* and *Tbx5*, may lead to PCCD
4
5 associated with CHD.(35) Numerous mutations in *NKX2.5* have been reported with various
6
7 CHD phenotypes, such as secundum atrial septal defect, tetralogy of Fallot, truncus arteriosus,
8
9 double-outlet right ventricle, L-transposition of great arteries, interrupted aortic arch,
10
11 ventricular noncompaction and hypoplastic left heart, with or without conduction
12
13 disorders.(36,37) *Tbx5* mutations are responsible for Holt-Oram syndrome, an autosomal
14
15 dominant inherited disease characterized by radial ray upper limb abnormalities, cardiac
16
17 septation defects and various degrees of cardiac conduction disorders which may occur even
18
19 in the absence of overt structural heart disease.(38)
20
21

22
23
24 Kearns-Sayre syndrome is a mitochondrial disorder characterized by onset before the age of
25
26 20, progressive external ophthalmoplegia and pigmentary retinopathy, accompanied by either
27
28 cardiac conduction defects, elevated cerebrospinal fluid protein or cerebellar ataxia. Fifty
29
30 percent of affected patients develop cardiac complications, the most common of them being
31
32 conduction disease which may progress to complete AV block or bradycardia-related
33
34 polymorphic ventricular tachycardia. (39)
35
36

37
38
39 Heart block affects one third of fetuses with heterotaxy syndrome and left atrial isomerism,
40
41 being a primary risk factor for perinatal mortality.(40) The most common CHD associated
42
43 with conduction disorders is L-transposition of the great arteries.(41) Abnormal development
44
45 of the central fibrous body with lack of union between AV node and AV bundle or formation
46
47 of the conduction tissue from the anterior endocardium were suggested to be the possible
48
49 causes of block seen in L-transposition.(42) The lifelong risk for complete block in these
50
51 patients is roughly 1% annually and roughly 50% to develop heart block spontaneously by
52
53 age 50.(41)
54
55
56
57
58
59
60

2- POST-OPERATIVE

Following CHD surgery, any degree of AV block may be seen.(Figures 1 and 2) A retrospective multicenter study recently evaluated incidence of postoperative complete heart block in children undergoing congenital heart surgery.(43) Among 103,616 surgeries from 45 US tertiary care hospitals, the incidence of complete heart block requiring pacemaker placement was low (1.2%), mainly associated with mitral valve repair or replacement (3.7%), aortic valve repair or replacement (2.7%), atrioventricular canal surgery (1.9%) and ventricular septal defect (VSD) surgery (1.8%). However these patients incurred longer hospital stay and had higher mortality even after accounting for heart surgery complexity.

In roughly one third of the cases of postoperative complete heart block, AV conduction does not recover and those patients should undergo pacemaker implantation. Permanent pacemaker implantation should be considered in all patients who have postoperative high-grade AV block following CHD surgery that exceeds 7-10 days, even in the setting of a narrow QRS escape rate.(44,45) During this period, temporary pacing wires may be necessary to maintain adequate chronotropy. Postoperative heart block has also been rarely reported in patients who had been previously discharged from the hospital with normal AV conduction after open-heart surgery. Close and continued follow-up of post-operative CHD surgical cases, particularly VSD, is necessary due to the risk of possible progression of block over time.(46)

ATRIOVENTRICULAR CONDUCTION DISORDERS IN ASSOCIATION WITH ACQUIRED HEART DISEASE

AV block in the young can also be derived from a wide variety of causes such as surgical or catheterization-induced trauma, coronary artery disease, acute or chronic infectious processes, myocarditis, hypersensitivity cardiomyopathy, metabolic abnormalities, hypothyroidism,

1
2
3 infiltrative processes or through a pathological neurocardiogenic mechanism.(47) Even if
4
5 temporary pacing might be required in unstable patients with Lyme carditis, complete heart
6
7 block is usually reversible with appropriate antibiotics.(48) Chagas disease is an endemic
8
9 disease in most Latin American countries, and around one third of affected patients develop
10
11 cardiac conduction disorders requiring pacemaker implantation.(49) Incidence of
12
13 catheterization-induced heart block was recently evaluated at 2.2%, with a high rate of
14
15 recovery following a similar course to that of postsurgical heart block.(50) Some
16
17 interventional procedures, such as device closure of perimembranous VSD and catheter
18
19 ablation of AV nodal reentrant tachycardia or parahissian accessory pathways, carry a risk of
20
21 permanent heart block.(51-53)
22
23
24
25

26 27 **MANAGEMENT**

28 29 **1- TREATMENT OPTIONS DURING PREGNANCY**

30
31 Left untreated, congenital AV block is associated with a fetal and neonatal mortality ranging
32
33 between 14-34%.(54) Fetal hydrops and ventricular escape rates <55bpm have been identified
34
35 as risk factors for mortality.(54,55) Transplacental treatment options are not consensual.
36
37 Dexamethasone use may significantly lower fetal mortality,(55) but its administration remains
38
39 controversial because of its potential side effects for both mother and fetus, especially
40
41 potential fetal neurological development impairment.(56) Maternal administration of
42
43 terbutaline has also been reported, used alone or in addition to dexamethasone.(57) Although
44
45 largely controversial, prenatal treatment may also include intravenous immunoglobulins and
46
47 plasmapheresis, used alone or together in combination with steroids.(58,59)
48
49
50

51
52 Using the currently available techniques, *in utero* percutaneous pacing appears to be at high
53
54 risk, with fetal deaths occurring within a few hours of the procedure in a high proportion of
55
56 cases.(60) Further studies would be required to improve our understanding of the natural
57
58
59
60

1
2
3 history of congenital AV block in order to identify more accurately the fetuses at highest risk.
4
5 Development in the techniques and technologies available to deliver *in utero* pacing would
6
7 also be required before this treatment can be adopted into routine clinical practice.
8
9

10 11 **2- POST-NATAL MEDICAL THERAPY**

12
13 Pharmacological therapy has a distinct role in the acute management of severe bradycardia
14
15 (whether sinus- or AV- nodal related), and should typically be carried out alongside parallel
16
17 efforts to arrange for transcutaneous pacing and temporary cardiac pacing.(61) Intravenous
18
19 isoproterenol, atropine, epinephrine and dopamine are all recommended.(61) Beyond the
20
21 acute management in this context, no medication is proven to improve chronic sinus- and AV-
22
23 nodal function. It is crucial, however, to recognize the potential for medications to
24
25 compromise cardiac conduction, especially considering the atypical antihypertensive and
26
27 antipsychotic agents, in addition to the AV-nodal blocking agents they may contain.
28
29 Monitoring of children who do not require neonatal pacing is based on 24-hour Holter ECG
30
31 and transthoracic echocardiography that should be performed frequently.
32
33
34
35
36
37

38 39 **3- PERMANENT PACEMAKER IMPLANTATION**

40
41 The indications for permanent pacing in children or adults with CHD are similar to those
42
43 recommended in acquired heart disease, yet there are important differences in the approach
44
45 based primarily on anatomy and somatic growth.
46

47 **3.1. Indications.** In essence, every symptomatic, non-reversible AV node disease requires
48
49 permanent pacemaker implantation.(44,45) Pacing must also be considered in asymptomatic
50
51 high degree AV blocks with specific risk conditions. Recent indications for cardiac pacing in
52
53 children and CHD patients are summarized in Table 1.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **3.2. Endocardial versus epicardial device.** Although pacing indications are clearly defined,
4
5 whether an endocardial versus an epicardial system is preferred remains to be
6
7 clarified.(45,61,62) The large population of adult paced patients allows for surgical practices
8
9 to be studied more effectively and lead to evidence based transitions in patient care.
10
11 Meanwhile, the smaller volume of paced pediatric patients does not provide enough
12
13 information, and clinical decisions based on faith, opinion, experience, and some retrospective
14
15 data. Within those limitations, there is a general consensus that the smallest infants are best
16
17 served with epicardial pacing systems, with a cut-off weight around 15-20 kg.(45,63)
18
19 Epicardial leads are more likely to fracture, are prone to exit block, and implantation requires
20
21 a major operation that's accompanied by the inherent risks and need for perioperative
22
23 support.(64)(Figure 3) However, many groups standardly use epicardial pacing in infants and
24
25 young children and argue that endocardial systems may carry a significant risk of venous
26
27 thrombosis in infants, which can result in loss of venous access in the future, leading to a
28
29 more complicated lead revision later in the patient's life.(66-68) Up to a 19% transvenous
30
31 lead-related failure rate has been reported by others who choose the endocardial approach.(69)
32
33 Extraction of abandoned transvenous leads in the pediatric population is also problematic, and
34
35 optimal lead management still remains to be defined.(70,71) On the other hand, there is a
36
37 global trend towards using endocardial leads in younger patients and some institutions
38
39 actively implant transvenous leads in children weighing less than 15 kg.(72-75) It has been
40
41 shown that an 80-mm right atrial lead loop will allow 6 to 12 years (mean, 8 years) of growth
42
43 in infants and children without the need for reoperation to adjust lead length.(76)(Figure 4,
44
45 panels A, B and C) Long-term follow-up demonstrates that the longevity of an endocardial
46
47 system exceeds that of its epicardial counterpart (63,64), also an important consideration in
48
49 patients who will be exposed to the cumulative burden of repeated lead and device
50
51 reimplantation. Despite growing experience, endocardial implantation is not universally
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 accepted. Most publications reporting results of transvenous pacing in infants and young
4
5 children are from small and/or older studies (73,76-79), so that long-term follow-up data from
6
7 large patient populations should still be clarified.
8

9
10 **3.3. Route of pacing.** Gaining access to the chamber requiring pacing is another central
11
12 hurdle, frequently challenging in this patient group, and thereby commonly dictating the route
13
14 of pacing but also highlighting why a detailed surgical history is vital. Modern-day pacemaker
15
16 implantation is therefore suitably complemented by adjunctive CT or MR angiography,
17
18 indicating whether an endocardial system is possible, and also providing a map for coronary
19
20 sinus lead placement. For complex CHD patients with prior operative intervention and whose
21
22 surgical reports are not available, venography at the time of the procedure is
23
24 recommended.(44,45) Absolute contra-indications to conventional transvenous, endocardial
25
26 lead placement include occlusion of the SVC (bidirectional cavopulmonary
27
28 anastomosis/Glenn), extra-cardiac Fontan procedures, baffle thrombosis and severe baffle
29
30 stenosis. Attempts to access the subpulmonic ventricle by crossing a mechanical
31
32 atrioventricular valve should also absolutely be avoided.(80) In this situation, coronary sinus
33
34 lead placement can potentially be used for ventricular pacing.
35
36
37

38
39 In patients in whom a conventional transvenous approach via the SVC is not possible, femoral
40
41 and transhepatic lead implantation can also be considered. Femoral techniques have been
42
43 reported predominantly in children, suggesting this is a viable alternative with issues related
44
45 primarily to the stability of the atrial lead and discomfort from the abdominally placed
46
47 generator.(81) This approach does entail a higher incidence of lead failure given the
48
49 additional mechanical stress associated with hip flexion. Transhepatic implants have also only
50
51 been reported in children and acutely present the additional risks of intraabdominal or
52
53 intracapsular hemorrhage, and long-term outcomes remain uncertain.(82)
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Placing leads in patients with prior atrial switch operations (Mustard/Senning) must be
4
5 handled with utmost care, given the frequency of baffle leaks in this group.(83) Pre-emptive
6
7 covered stent implantation or even open repair should be considered given the risk of
8
9 thromboembolism across these veno-systemic shunts. A transcatheter approach is utilized for
10
11 leak closure but can also be applied for dilatation of a narrowed baffle that would otherwise
12
13 be occluded by transvenous lead implantation.(84,85)
14
15

16 **3.4. Thromboembolism.** Any patient with an intracardiac shunt is at higher risk for thrombus
17
18 formation on transvenous pacing leads and subsequent systemic thromboembolic
19
20 complications.(86,87) Pre-emptive transesophageal echocardiography with bubble injections
21
22 are therefore critical and if any shunt is seen, the approach should be modified. If the shunt
23
24 can be closed, either via an open approach or using a percutaneous approach, then this should
25
26 be undertaken before endocardial leads are placed or alternatively an epicardial device should
27
28 be implanted. It remains unclear how to exactly manage patients with a small shunt at an atrial
29
30 level across a patent foramen ovale and further studies would be needed to develop
31
32 recommendations.(86) It is also vital to recognize that the patients with a classic Fontan
33
34 operation frequently have very large atria, and slow flow through their neo-chamber. Thus, it
35
36 is not uncommon for large thrombi with a potential for pulmonary thromboembolism to
37
38 develop on transvenous leads. And although this does not present an absolute contra-
39
40 indication,(88,89) it does need to be carefully considered and weighed against the risks of
41
42 epicardial lead placement. Long-term oral anticoagulation does also need to be accordingly
43
44 considered in this group.
45
46
47
48

49 **3.5. Lead position.** The pacing site of the ventricular leads is a critical issue, as it has a major
50
51 impact on left ventricular mechanical synchrony, efficiency, and pump function in children
52
53 who require lifelong pacing. The right ventricular apex has been the most used pacing site,
54
55 because it is easily accessible transvenously and provides a stable lead position with a low
56
57
58
59
60

1
2
3 dislodgment rate. However, long-term right ventricular apical pacing induces an iatrogenic
4
5 left bundle branch block and can lead to pacing-induced cardiomyopathy with left ventricular
6
7 dilation and both systolic and diastolic left ventricular dysfunction, for both endocardial and
8
9 epicardial leads.(20,22,90-92) There is early encouraging data that suggest improved overall
10
11 hemodynamics and ventricular function by cardiac resynchronization therapy with single-site
12
13 left ventricular pacing via the coronary sinus in this group.(93) Until further supportive
14
15 evidence is accrued, it is important for the implanter and clinician to consider this approach in
16
17 any patient whose ejection fraction is suboptimal.
18

19
20 However detrimental effects of the right ventricular apical pacing led to the reassessment of
21
22 traditional approaches and to the research of alternative pacing sites, in order to get to more
23
24 physiological pattern of ventricular activation. Although being theoretically the best
25
26 technique, direct His-Bundle pacing and paraHisian cardiac pacing remain complex and
27
28 associated with higher pacing thresholds are required, causing accelerated battery
29
30 depletion.(94) Right ventricular septal pacing is a good alternative, technically easy and
31
32 maintaining a lower pacing treshold.(95) By preserving septal to lateral left ventricular
33
34 synchrony and systolic function, left ventricular apical and midlateral wall pacing may be the
35
36 preferred pacing site for epicardial leads in the young.(93,96)
37
38

39
40 **3.6. Mode of pacing.** A five-letter international code describes pacemaker function, three
41
42 letters being in common usage: the first letter is the chamber paced (A: atrium; V: ventricle;
43
44 D: dual, namely both A and V; O: none), the second letter is the chamber sensed and the third
45
46 letter describes the algorithm used to integrate pacing and sensing functions. Most of children
47
48 and teenagers will benefit from a dual-chamber pacing (DDD), allowing AV synchrony that is
49
50 important to maintain ventricular filling and stroke volume.(62,64) In infants with complete
51
52 AV block and normal sinus node function, a single-chamber ventricular pacing (VVI or
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 VDD) should be selected, because it requires only a unique lead (uni or bipolar) thus reducing
4
5 the risk of venous occlusion.(62,64)
6

7 In patients with conduction system disease undergoing pacemaker implantation, coexistent
8
9 reentrant atrial tachycardias are common. Therefore, the implantation of devices with atrial
10
11 antitachycardia pacing capability is reasonable.(97) This approach is more common as an
12
13 adjunct to maze procedures, and in conjunction with antiarrhythmic therapy.(98)
14
15

16
17 **3.7. Perspectives.** To overcome the potential short- and long-term complications related to
18
19 transvenous leads and subcutaneous pulse generators, new technologies enabling leadless
20
21 cardiac stimulation have been developed and proved to be applicable and safe in experimental
22
23 models and in some small human studies.(99-101) These ultrasound or induction
24
25 technologies, based on leadless pacemakers could be used to provide cardiac stimulation from
26
27 the endocardium at selected sites. The absence of a transvenous lead and subcutaneous pulse
28
29 generator could represent a paradigm shift in cardiac pacing. Future studies will need to
30
31 address the safety/efficacy of alternate-site RV and LV pacing, and the long-term outcomes of
32
33 these new approaches. Although the continued development and success of electronic pacing
34
35 are impressive, gene therapy for biological pacing are also a promising research field. This
36
37 approach might offer an alternative treatment for pacemaker-related infections in the future,
38
39 with right ventricular intramyocardial injection of an adenoviral construct whose duration of
40
41 effect is temporary, until such time as the infection is adequately treated and a new permanent
42
43 pacemaker can be inserted.(102,103)
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 **CONCLUSION**

57
58
59
60

1
2
3 Although rare, congenital and childhood AV block is important treatable cause of morbidity
4 and mortality in the young. This review crystallizes our contemporary understanding and
5 management strategies, highlighting the ongoing investigation in all aspects of care related to
6 this complex group of disorders. Much work is needed, especially with regards to the
7 antenatal detection and treatment of congenital AV block, and on a genetic level, and it is
8 evident that as new insights are gleaned, management strategies continue to evolve. Despite
9 the many different etiologies, each with specific management and distinct outcomes, these
10 patients can do well with a careful, considered approach to the diagnostic evaluation and
11 management plan.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Review Copy

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgments: We are grateful to Alix Baruteau for her linguistic revision of this review article.

Review Copy

REFERENCES

1. Brucato A, Jonzon A, Friedman D et al. Proposal for a new definition of congenital complete atrioventricular block. *Lupus* 2003;12:427-35.
2. Michaelsson M, Riesenfeld T, Jonzon A. Natural history of congenital complete atrioventricular block. *Pacing Clin Electrophysiol* 1997;20:2098–2101.
3. Taylor PV, Scott JS, Gerlis LM, Esscher E, Scott O. Maternal antibodies against fetal cardiac antigens in congenital complete heart block. *N Engl J Med* 1986;315:667-72.
4. Ambrosi A, Wahren-Herlenius M. Congenital heart block: evidence for a pathogenic role of maternal autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2012;14:208.
5. Costedoat-Chalumeau N, Georgin-Lavialle S, Amoura Z, Piette JC. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibody-mediated congenital heart block. *Lupus* 2005;14:660-4.
6. Hunscher O, Batista N, Rivero S et al. Clinical and serological identification of 2 forms of complete heart block in children. *J Rheumatol* 1995;22:1352-5.7
7. Villain E, Coastedoat-Chalumeau, N, Marijon, E, Boudjemline Y, Piette JC, Bonnet D. Presentation and prognosis of complete atrioventricular block in childhood, according to maternal antibody status. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1682-1687.
8. Bergman G, Skog A, Tingström J et al. Late development of complete atrioventricular block may be immune mediated and congenital in origin. *Acta Paediatr* 2014;103:275-81.
9. Lazzarini PE, Capecchi PL, Laghi-Pasini F. Isolated atrioventricular block of unknown origin in adults and anti-Ro/SSA antibodies: clinical evidence, putative mechanisms, and therapeutic implications. *Heart Rhythm* 2015;12:449-54.
10. Buyon JP, Hiebert R, Copel J et al. Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1658-66.
11. Jaeggi E1, Laskin C, Hamilton R, Kingdom J, Silverman E. The importance of the level of maternal anti-Ro/SSA antibodies as a prognostic marker of the development of cardiac neonatal lupus erythematosus a prospective study of 186 antibody-exposed fetuses and infants. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:2778-84.
12. Fouron JC, Proulx F, Miro J, Gosselin J. Doppler and M-mode ultrasonography to time fetal atrial and ventricular contractions. *Obstet Gynecol* 2000;96:732–6.
13. Donofrio MT, Moon-Grady AJ, Hornberger LK, et al. American Heart Association Adults With Congenital Heart Disease Joint Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young and Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Council on Cardiovascular and Stroke Nursing. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:2183-242.
14. Zhao H, Cuneo BF, Strasburger JF, Huhta JC, Gotteiner NL, Wakai RT. Electrophysiological characteristics of fetal atrioventricular block. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:77-84.
15. Andelfinger G, Fouron JC, Sonesson SE, Proulx F. Reference values for time intervals between atrial and ventricular contractions of the fetal heart measured by two Doppler techniques. *Am J Cardiol* 2001;88:1433–6.
16. Rein AJ, Mevorach D, Perles Z et al. Early diagnosis and treatment of atrioventricular block in the fetus exposed to maternal anti-SSA/Ro-SSB/La antibodies: a prospective, observational, fetal kinetocardiogram-based study. *Circulation* 2009;119:1867-72.
17. Jaeggi ET, Hamilton RM, Silverman ED, Zamora SA, Hornberger LK. Outcome of children with fetal, neonatal or childhood diagnosis of isolated congenital atrio-ventricular block. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:130-7.

- 1
2
3 18. Michaëlsson M, Jonzon A, Riesenfeld T. Isolated congenital complete atrioventricular
4 block in adult life. A prospective study. *Circulation* 1995;92:442-9
- 5 19. Udink ten Cate FE, Breur JM, Cohen MI et al. Dilated cardiomyopathy in isolated
6 congenital complete atrioventricular block: early and long-term risk in children. *J Am Coll*
7 *Cardiol* 2001;37:1129-1134.
- 8 20. Thambo JB, Bordachar P, Garrigue S et al. Detrimental ventricular remodelling in patients
9 with congenital complete heart block and chronic right ventricular apical pacing. *Circulation*
10 2004;110:3766-3772.
- 11 21. Moak JP, Barron KS, Hougen TJ et al. Congenital heart block: development of late-onset
12 cardiomyopathy, a previously underappreciated sequela. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:238-42
- 13 22. Moak JP, Hasbani K, Ramwell C et al. Dilated cardiomyopathy following right ventricular
14 pacing for AV block in young patients: resolution after upgrading to biventricular pacing
15 systems. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006;17:1068-1071.
- 16 23. Bordachar P, Zachary W, Ploux S, Labrousse L, Haissaguerre M, Thambo JB.
17 Pathophysiology, clinical course, and management of congenital complete atrioventricular
18 block. *Heart Rhythm*. 2013;10:760-6.
- 19 24. Janousek J, Tomek V, Chaloupecky V, Gebauer RA. Dilated cardiomyopathy associated
20 with dual-chamber pacing in infants: improvement through either left ventricular cardiac
21 resynchronization or programming the pacemaker off allowing intrinsic normal conduction. *J*
22 *Cardiovasc Electrophysiol*. 2004;15:470-4.
- 23 25. Priori SG, Wilde AA, Horie M et al. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on
24 the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes.
25 *Heart Rhythm* 2013;10:1932-1963.
- 26 26. Lynch HT, Mohiuddin S, Sketch MH, Krush AJ, Carter S, Runco V. Hereditary
27 progressive atrioventricular conduction defect. A new syndrome? *JAMA* 1973;225:1465-70.
- 28 27. Gazes PC, Culler RM, Taber E, Kelly TE. Congenital familial cardiac conduction defects.
29 *Circulation* 1965;32:32-4.
- 30 28. Baruteau AE, Probst V, Abriel H. Inherited progressive cardiac conduction disorders. *Curr*
31 *Opin Cardiol* 2015;30:33-39.
- 32 29. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F et al. Cardiac conduction defects associate with
33 mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999;23:20-21.
- 34 30. Makita N, Seki A, Sumitomo N et al. A connexin40 mutation associated with a malignant
35 variant of progressive familial heart block type I. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;5:163-
36 72.
- 37 31. Kanter RJ, Pfeiffer R, Hu D, et al. Brugada-like syndrome in infancy presenting with
38 rapid ventricular tachycardia and intraventricular conduction delay. *Circulation* 2012; 125:14-
39 22.
- 40 32. Baruteau AE, Fouchard S, Behaghel A et al. Characteristics and long-term outcome of
41 nonimmune isolated atrioventricular block diagnosed *in utero* or early childhood: a
42 multicentre study. *Eur Heart J* 2012; 33:622-629.
- 43 33. Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S et al. Parental electrocardiographic screening
44 identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood non-immune isolated
45 atrioventricular block. *Circulation* 2012; 126:1469-1477.
- 46 34. Zaidi S1, Choi M, Wakimoto H et al. De novo mutations in histone-modifying genes in
47 congenital heart disease. *Nature* 2013;498:220-3.
- 48 35. McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr*
49 *Top Dev Biol* 2012; 100:253-277.
- 50 36. Schott JJ, Benson DW, Basson CT et al. Congenital heart disease caused by mutations in
51 the transcription factor NKX2-5. *Science* 1998; 281:108-111.
- 52 37. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J et al. NKX2.5 mutations in patients with congenital
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1650–1655.
- 4 38. Baban A, Pitto L, Pulignani S et al. Holt-Oram syndrome with intermediate
5 atrioventricular canal defect, and aortic coarctation: functional characterization of a de novo
6 TBX5 mutation. *Am J Med Genet A* 2014;164A:1419-24.
- 7 39. Kabunga P, Lau AK, Phan K et al. Systematic review of cardiac electrical disease in
8 Kearns-Sayre syndrome and mitochondrial cytopathy. *Int J Cardiol* 2015;181:303-310.
- 9 40. Taketazu M1, Loughheed J, Yoo SJ, Lim JS, Hornberger LK. Spectrum of cardiovascular
10 disease, accuracy of diagnosis, and outcome in fetal heterotaxy syndrome. *Am J Cardiol*
11 2006;97:720-4.
- 12 41. Warnes C. Transposition of the great arteries. *Circulation* 114: 2699-2709, 2006.
- 13 42. Anderson RH, Becker AE, Arnold R, Wilkinson JL. The conducting tissues in
14 congenitally corrected transposition. *Circulation* 1974;50: 911-923.
- 15 43. Liberman L, Silver ES, Chai P, Anderson BR. Incidence and characteristics of heart block
16 after congenital heart surgery in pediatric patients: a multicenter study. *Heart Rhythm Society*
17 *Scientific Sessions* 2015; Abstract AB40-02.
- 18 44. Brignole M, Auricchio A, Baron-Esquivias G et al. 2013 ESC guidelines on cardiac
19 pacing and cardiac resynchronization therapy: The task force on cardiac pacing and
20 resynchronization therapy of the European Society of Cardiology (ESC). Developed in
21 collaboration with the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Eur Heart J*
22 2013;34:2281-2329.
- 23 45. Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA et al. 2012 ACCF/AHA/HRS focused update
24 incorporated into the ACCF/AHA/HRS 2008 guidelines for device-based therapy of cardiac
25 rhythm abnormalities: a report of the American College of Cardiology Foundation/American
26 Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am*
27 *Coll Cardiol.* 2013;61:e6-75.
- 28 46. Liberman L, Pass RH, Hordof AJ, Spotnitz HM. Late onset of heart block after open heart
29 surgery for congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 2008;29:56-9.
- 30 47. Barra SN, Providência R, Paiva L, Nascimento J, Marques AL. A review on advanced
31 atrioventricular block in young or middle-aged adults. *Pacing Clin Electrophysiol*
32 2012;35:1395-405.
- 33 48. Forrester JD, Mead P. Third-degree heart block associated with Lyme carditis: review of
34 published cases. *Clin Infect Dis* 2014;59:996-1000.
- 35 49. Arce M, Van Grieken J, Femenía F, Arrieta M, McIntyre WF, Baranchuk A. Permanent
36 pacing in patients with Chagas' disease. *Pacing Clin Electrophysiol* 2012;35:1494-7.
- 37 50. Mah DY, Porrás D, Bergersen L, Marshall AC, Walsh EP, Triedman JK. Incidence of and
38 risk factors for catheterization-induced complete heart block in the pediatric cardiac
39 catheterization laboratory. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2014;7:127-33.
- 40 51. Zartner P, Christians C, Stelter JC, Hraška V, Schneider MB. Transvascular closure of
41 single and multiple muscular ventricular septal defects in neonates and infants < 20 kg.
42 *Catheter Cardiovasc Interv* 2014;83:564-70.
- 43 52. Krause U, Backhoff D, Klehs S, Kriebel T, Paul T, Schneider HE. Catheter ablation of
44 pediatric AV nodal reentrant tachycardia: results in small children. *Clin Res Cardiol.* 2015,
45 Epub ahead of print. PMID: 25982591.
- 46 53. Yildirim I, Karagöz T, Ertuğrul İ, Karagöz AH, Özer S. Efficacy and safety of
47 cryoablation of parahissian accessory pathways in children: a single institution study. *Pacing*
48 *Clin Electrophysiol.* 2013;36:1495-502.
- 49 54. Schmidt KG, Ulmer HE, Silverman NH, Kleinman CS, Copel JA. Perinatal outcome of
50 fetal complete atrioventricular block: a multicenter experience. *J Am Coll Cardiol*
51 1991;17:1360–6.
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 55. Jaeggi ET, Fouron JC, Silverman ED, Ryan G, Smallhorn J, Hornberger LK.
4 Transplacental fetal treatment improves the outcome of prenatally diagnosed complete
5 atrioventricular block without structural heart disease. *Circulation* 2004;110:1542–8.
6 56. Modi N, Lewis H, Al-Naqeeb N, Ajayi-Obe M, Dore CJ, Rutherford M. The effects of
7 repeated antenatal glucocorticoid therapy on the developing brain. *Pediatr Res* 2001;50:581–
8 5.
9 57. Cuneo BF, Lee M, Roberson D, Niksch A, Ovadia M, Parilla BV, Benson DW. A
10 management strategy for fetal immune-mediated atrioventricular block. *J Matern Fetal*
11 *Neonatal Med.* 2010;23:1400-5.
12 58. Friedman DM, Llanos C, Izmirly PM et al. Evaluation of fetuses in a study of intravenous
13 immunoglobulin as preventive therapy for congenital heart block: Results of a multicenter,
14 prospective, open-label clinical trial. *Arthritis Rheum* 2010;62:1138-46.
15 59. Ruffatti A, Milanese O, Chiandetti L et al. A combination therapy to treat second-degree
16 anti-Ro/La-related congenital heart block: a strategy to avoid stable third-degree heart block?
17 *Lupus* 2012;21:666-71.
18 60. Assad RS, Zielinsky P, Kalil R et al. New lead for *in utero* pacing for fetal congenital
19 heart block. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126:300-2.
20 61. Kleinman ME, de Caen AR, Chameides L et al. Pediatric Basic and Advanced Life
21 Support Chapter Collaborators. Pediatric basic and advanced life support: 2010 International
22 Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science
23 with Treatment Recommendations. *Pediatrics.* 2010;126:e1261-318.
24 62. Villain E. Indications for pacing in patients with congenital heart disease. *Pacing Clin*
25 *Electrophysiol.* 2008;31:S17-20.
26 63. Wilhelm BJ, Thöne M, El-Scheich T, Livert D, Angelico R, Osswald B. Complications
27 and Risk Assessment of 25 Years in Pediatric Pacing. *Ann Thorac Surg.* 2015 May 14. pii:
28 S0003-4975(15)00286-6. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.12.098. [Epub ahead of print]
29 64. Takeuchi D, Tomizawa Y. Pacing device therapy in infants and children: a review. *J Artif*
30 *Organs.* 2013;16:23-33.
31 65. Silveti MS, Drago F, Di Carlo D, Placidi S, Brancaccio G, Carotti A. Cardiac pacing in
32 paediatric patients with congenital heart defects: transvenous or epicardial? *Europace.*
33 2013;15:1280-6.
34 66. Cohen MI, Bush DM, Vetter VL et al. Permanent epicardial pacing in pediatric patients:
35 Seventeen years of experience and 1200 outpatient visits. *Circulation* 2001;103:2585-2590.
36 67. Kubus P, Materna O, Gebauer RA, Matejka T, Gebauer R, Tláškal T, Janousek J.
37 Permanent epicardial pacing in children: long-term results and factors modifying outcome.
38 *Europace.* 2012;14:509-14.
39 68. Fortescue EB, Berul CI, Cecchin F, Walsh EP, Triedman JK, Alexander ME. Patient,
40 procedural, and hardware factors associated with pacemaker lead failures in pediatrics and
41 congenital heart disease. *Heart Rhythm* 2004;1:150-159.
42 69. Silveti MS, Drago F, Marcora S, Ravà L. Outcome of single-chamber, ventricular
43 pacemakers with transvenous leads implanted in children. *Europace.* 2007 Oct;9(10):894-9.
44 70. Cecchin F, Atallah J, Walsh EP, Triedman JK, Alexander ME, Berul CI. Lead extraction
45 in pediatric and congenital heart disease patients. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2010;3:437-
46 71. McCanta AC, Schaffer MS, Collins KK et al. Pediatric and Adult Congenital Endocardial
47 Lead Extraction or Abandonment Decision (PACELEAD) survey of lead management. *PACE*
48 2011;34:1621-27.
49 72. Spotnitz HM. Transvenous pacing in infants and children with congenital heart disease.
50 *Ann Thorac Surg* 1990;49:495-6.
51 73. Kammeraad J, Rosenthal E, Bostock J, Rogers J, Sreeram N. Endocardial pacemaker
52 implantation in infants <10 kg weight. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2004;27:1466-74.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 74. Stojanov PL, Savic DV, Zivkovic MB, Calovic ZR. Permanent endovenous pediatric
4 pacing: absence of lead failure--20 years follow-up study. *Pacing Clin Electrophysiol.*
5 2008;31:1100-7.
6 75. McLeod KA. Cardiac pacing in infants and children. *Heart.* 2010;96:1502-8.
7 76. Gheissari A, Hordof AJ, Spotnitz HM. Transvenous pacemakers in children: relation of
8 lead length to anticipated growth. *Ann Thorac Surg* 1991;52:118-21.
9 77. Robledo-Nolasco R, Ortiz-Avalos M, Rodriguez-Diez G et al. Transvenous pacing in
10 children weighing less than 10 kilograms. *PACE* 2009;32:S177-81.
11 78. Lotfy W, Hegazy R, Abdelaziz O et al. Permanent cardiac pacing in pediatric patients.
12 *Pediatr Cardiol* 2013;34:273-280.
13 79. Janousek J, Kubus P. What's new in cardiac pacing in children? *Curr Opin Cardiol*
14 2014;29:76-82.
15 80. Fadel BM, Di Salvo G. Metal through metal: pacing lead across a mechanical tricuspid
16 valve. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2013 Feb 27. [Epub ahead of print] PMID: 23448964.
17 81. Mathur G, Stables RH, Heaven D, Ingram A, Sutton R. Permanent pacemaker
18 implantation via the femoral vein: An alternative in cases with contraindications to the
19 pectoral approach. *Europace* 2001;3:56-59.
20 82. Emmel M, Sreeram N, Pillekamp F, Boehm W, Brockmeier K. Transhepatic approach for
21 catheter interventions in infants and children with congenital heart disease. *Clin Res Cardiol*
22 2006;95:329-333
23 83. Klein AJ, Kim MS, Salcedo E, Fagan T, Kay J. The missing leak: A case report of a
24 baffle-leak closure using real-time 3d transoesophageal guidance. *Eur J Echocardiogr*
25 2009;10:464-467.
26 84. Dragulescu A, Sidibe N, Aubert F, Fraise A. Successful use of covered stent to treat
27 superior systemic baffle obstruction and leak after atrial switch procedure. *Pediatr Cardiol*
28 2008;29:954-956.
29 85. Bentham J, English K, Hares D, Gibbs J, Thomson J. Effect of transcatheter closure of
30 baffle leaks following senning or mustard atrial redirection surgery on oxygen saturations and
31 polycythaemia. *Am J Cardiol* 2012;110:1046-1050.
32 86. DeSimone CV, Friedman PA, Noheria A et al. Stroke or transient ischemic attack in
33 patients with transvenous pacemaker or defibrillator and echocardiographically detected
34 patent foramen ovale. *Circulation* 2013;128:1433-1441
35 87. Khairy P, Landzberg MJ, Gatzoulis MA et al. Transvenous pacing leads and systemic
36 thromboemboli in patients with intracardiac shunts: A multicenter study. *Circulation*
37 2006;113:2391-2397.
38 88. Takahashi K, Cecchin F, Fortescue E et al. Permanent atrial pacing lead implant route
39 after fontan operation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2009;32:779-785.
40 89. Mosquera VX, Marini M, Portela F, Cao I. Late complication of classic fontan operation:
41 Giant right atrial thrombus and massive pulmonary thromboembolism. *J Card Surg*
42 2008;23:776-778.
43 90. Sweeney MO, Hellkamp AS, Ellenbogen KA et al. Adverse effect of ventricular pacing
44 on heart failure and atrial fibrillation among patients with normal baseline qrs duration in a
45 clinical trial of pacemaker therapy for sinus node dysfunction. *Circulation* 2003;107:2932-
46 2937.
47 91. Wilkoff BL, Cook JR, Epstein AE et al. Dual-chamber pacing or ventricular backup
48 pacing in patients with an implantable defibrillator: The dual chamber and vvi implantable
49 defibrillator (david) trial. *JAMA* 2002;288:3115-3123.
50 92. Kim JJ, Friedman RA, Eidem BW et al. Ventricular function and long-term pacing in
51 children with congenital complete atrioventricular block. *J Cardiovasc Electrophysiol*
52 2007;18:373-377.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

93. Janousek J, van Geldorp IE, Krupickova S et al. Permanent cardiac pacing in children: Choosing the optimal pacing site: A multicenter study. *Circulation* 2013;127:613-623.
94. Tung S, Lemaitre J. His bundle pacing: in pursuit of the "sweet spot". *Pacing Clin Electrophysiol.* 2015;38:537-9.
95. Deshmukh P, Casavant DA, Romanyshyn M, Anderson K. Permanent, direct His-bundle pacing: a novel approach to cardiac pacing in patients with normal His-Purkinje activation. *Circulation.* 2000;101:869-77.
96. Silveti MS, Di Carlo D, Ammirati A et al. Left ventricular pacing in neonates and infants with isolated congenital complete or advanced atrioventricular block: short- and medium-term outcome. *Europace.* 2015;17:603-10.
97. Stephenson EA, Casavant D, Tuzi J et al. Efficacy of atrial antitachycardia pacing using the medtronic at 500 pacemaker in patients with congenital heart disease. *Am J Cardiol* 2003;92:871-876.
98. Tsao S, Deal BJ, Backer CL, Ward K, Franklin WH, Mavroudis C. Device management of arrhythmias after fontan conversion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:937-940.
99. Lee KL, Lau CP, Tse HF et al. First human demonstration of cardiac stimulation with transcutaneous ultrasound energy delivery: implications for wireless pacing with implantable devices. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:877-83.
100. Reddy VY, Knops RE, Sperzel J et al. Permanent leadless cardiac pacing: results of the LEADLESS trial. *Circulation* 2014;129:1466-71.
101. Sperzel J, Burri H, Gras D, Tjong FV, Knops RE, Hindricks G, Steinwender C, Defaye P. State of the art of leadless pacing. *Europace.* 2015 May 29. pii: euv096. [Epub ahead of print] PMID: 26024918
102. Hu Y-F, Dawkins JF, Cho HC, Marban E, Cingolani E. Biological pacemaker created by minimally invasive somatic repro- gramming in pigs with complete heart block. *Sci Transl Med* 2014;6:245-94.
103. Rosen MR. Gene therapy and biological pacing. *N Engl J Med* 2014;371:1158-9.

Table 1: Pacing indications in children and patients with congenital heart disease.

| | ESC Guidelines | ACCF/AHA/HRS Guidelines |
|--|--------------------|----------------------------|
| Congenital AV block | | |
| Symptomatic advanced second- or third-degree AV block | Class I, level C | Class I, level C |
| Asymptomatic high degree AV block with ventricular dysfunction | Class I, level C | Class I, level B |
| Asymptomatic high degree AV block with prolonged QTc interval | Class I, level C | - |
| Asymptomatic high degree AV block with complex ventricular ectopy | Class I, level C | Class I, level B |
| Asymptomatic high degree AV block with wide QRS escape rhythm | Class I, level C | Class I, level B |
| Asymptomatic high degree AV block with abrupt ventricular pauses > three-fold the basic cycle length | Class I, level C | Class IIa, level B |
| Asymptomatic third-degree AV block in the infant with a ventricular rate <55 bpm or with CHD and a ventricular rate <70 bpm. | - | Class I, level C |
| Third-degree AV block beyond the first year of life with an average heart rate <50 bpm | - | Class IIa, level B |
| Asymptomatic high degree AV block with a ventricular rate <50 bpm | Class I, level C | - |
| Third-degree AV block beyond the first year of life with symptoms due to chronotropic incompetence | - | Class IIIa, level B |
| High degree AV block in asymptomatic children/adolescents in absence of the above risk conditions | Class IIb, level C | Class IIb, level B |
| Asymptomatic type I second-degree AV block | - | Class III, level C |
| Postoperative AV block | | |
| Postoperative advanced second- or third-degree AV block that persists > 7 days after cardiac surgery (10 days in ESC guidelines) | Class I, level B | Class I, level B |
| Transient postoperative third-degree AV block that reverts to sinus rhythm with residual bifascicular block | Class IIa, level C | Class IIb, level C |
| Unexplained syncope in the patient with prior CHD surgery complicated by transient complete heart block with residual fascicular block | - | Class IIa, level B |
| Transient postoperative AV block with return of normal AV conduction in the otherwise asymptomatic patient | - | Class III, level B |
| Asymptomatic postoperative bifascicular block with/without first-degree AV block in the absence of prior transient complete AV block | - | Class III, level C |

AV: atrio-ventricular; CHD: congenital heart disease.

ESC guidelines: reference 44; ACCF/AHA/HRS guidelines: reference 45.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURES AND LEGEND

Figure 1: Complete atrioventricular block: unpaced electrocardiogram.

Postoperative 12-lead electrocardiogram demonstrating complete heart block with slow ventricular escape rate, after tricuspid valve replacement.

Figure 2: Complete atrioventricular block: paced electrocardiogram.

Twelve-lead electrocardiogram from patient demonstrating atrial sensed ventricular paced rhythm.

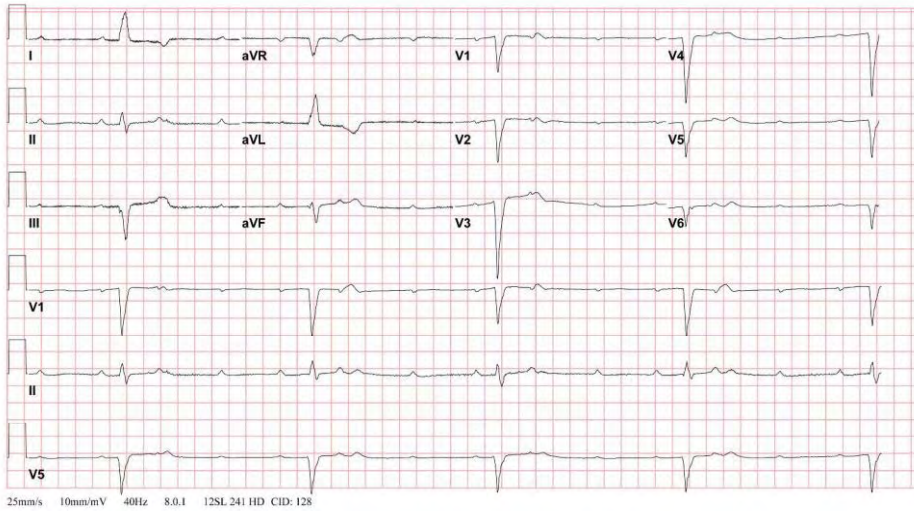
Figure 3: Permanent pacemaker with epicardial leads (VVI pacing).

Figure 4: Permanent pacemaker with transvenous leads.

Growth and change in a loop of an endocardial lead. A 4 year-old boy with childhood isolated nonimmune atrioventricular block underwent pacemaker implantation using a transvenous lead. Radiographs at 4 years of age (A, VVI pacing), 6 years later (B, DDD pacing) and 9 years later (C, DDD pacing). Note the change in the loop of the lead as the child grows.

Review Copy

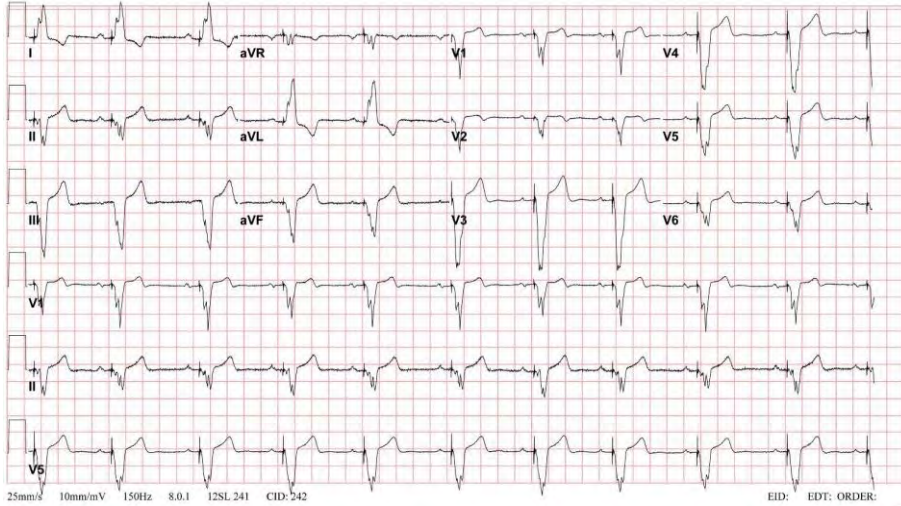
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Complete atrioventricular block: unpaced electrocardiogram.
Postoperative 12-lead electrocardiogram demonstrating complete heart block with slow ventricular escape rate, after tricuspid valve replacement.

274x154mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

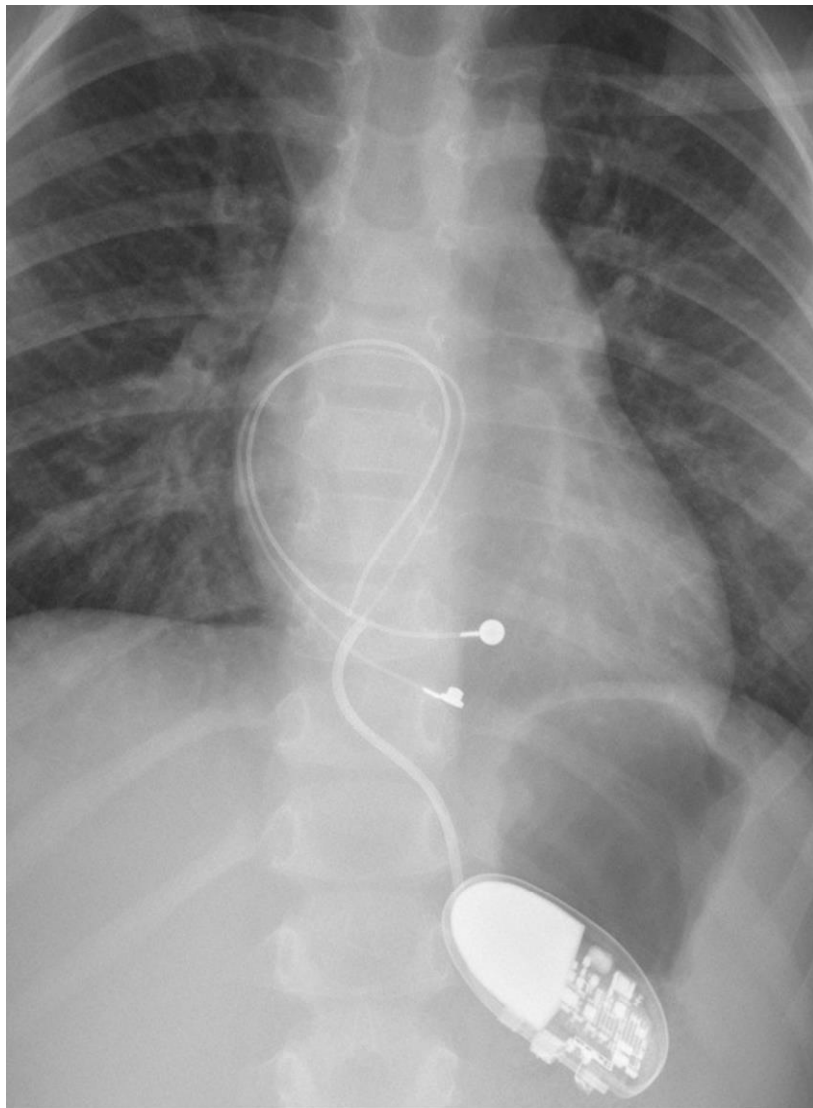


Complete atrioventricular block: paced electrocardiogram.
Twelve-lead electrocardiogram from patient demonstrating atrial sensed ventricular paced rhythm.

268x155mm (300 x 300 DPI)

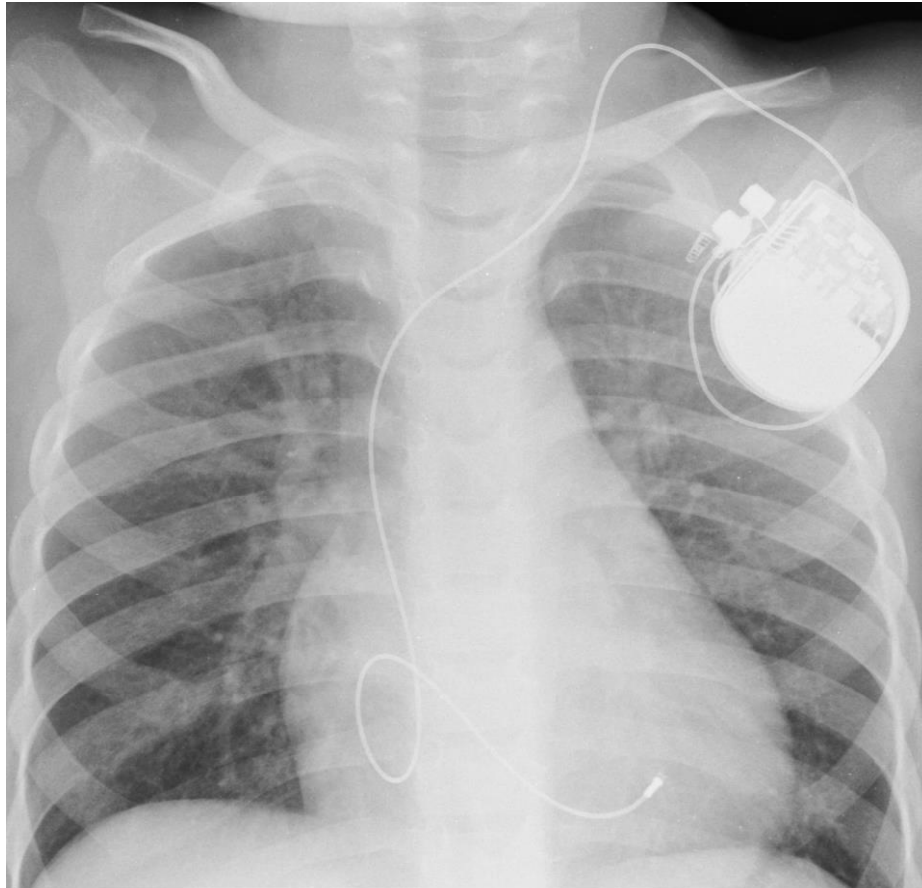
W Copy

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Permanent pacemaker with epicardial leads (VVI pacing).
175x238mm (96 x 96 DPI)

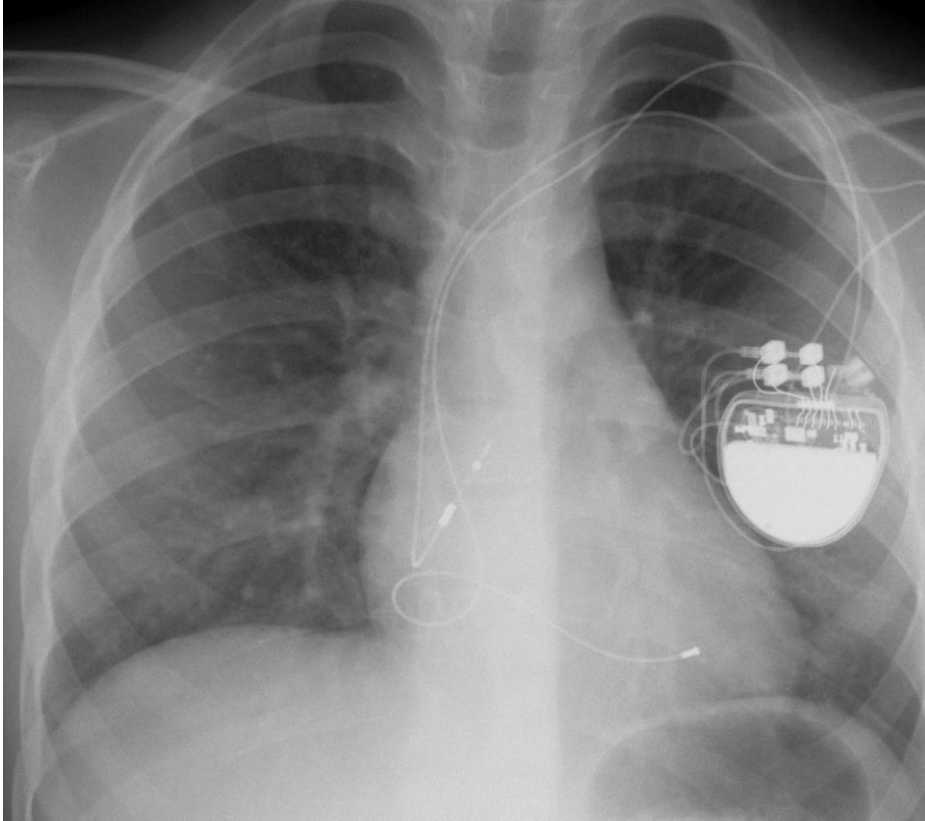
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Permanent pacemaker with transvenous leads.
Growth and change in a loop of an endocardial lead. A 4 year-old boy with childhood isolated nonimmune atrioventricular block underwent pacemaker implantation using a transvenous lead. Radiographs at 4 years of age (A, VVI pacing), 6 years later (B, DDD pacing) and 9 years later (C, DDD pacing). Note the change in the loop of the lead as the child grows.

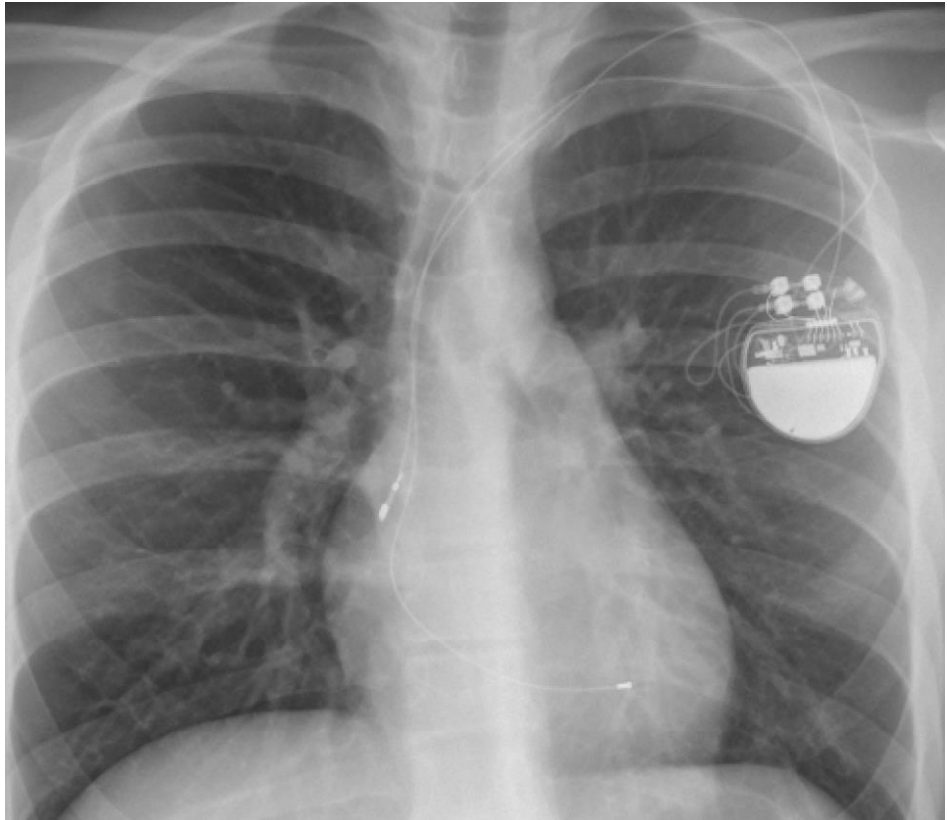
432x415mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Permanent pacemaker with transvenous leads.
352x311mm (96 x 96 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Permanent pacemaker with transvenous leads.
508x442mm (96 x 96 DPI)

V- LES TROUBLES DE CONDUCTION HÉRÉDITAIRES

V.1- Problématique et objectifs

Les troubles progressifs héréditaires de la conduction cardiaque (OMIM 113900) sont définis comme des anomalies de la conduction cardiaque survenant avant l'âge de 50 ans, d'aggravation progressive, sans étiologie documentée et en particulier sans anomalie de l'architecture cardiaque ni maladie neuromusculaire associée [Priori *et al*, 2013]. Ils peuvent survenir dans un cadre familial, l'étude du pedigree familial montrant alors un mode de transmission autosomique dominant. L'expressivité du phénotype est variable et la pénétrance semble augmenter avec l'âge [Giudicessi *et al*, Transl Res 2013]. Bien qu'il n'existe pas aujourd'hui de stratification du risque évolutif basée sur le génotype, un diagnostic génétique doit être proposé en cas de trouble de conduction inexplicables chez un sujet jeune, en particulier s'il existe une histoire familiale de troubles de conduction, d'implantation d'un stimulateur cardiaque et/ou de mort subite [Ackerman *et al*, 2011]. Le diagnostic pré-symptomatique par le dépistage génétique ciblé sur la mutation familiale en cas de diagnostic préalable du cas index devrait également faire partie de la stratégie de prise en charge, permettant un suivi prospectif adapté d'apparentés au premier degré mutés asymptomatiques.

Des travaux récents ont permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue des troubles de conduction familiaux et d'élargir le phénotype clinique de ces formes héréditaires. Le but de ce travail était de présenter les avancées majeures récentes dans notre compréhension des caractéristiques cliniques, génétiques et moléculaires des troubles de conduction héréditaires du sujet jeune.

V.2- Résumé du travail

Ce travail est présenté dans l'article "**Inherited progressive cardiac conduction disorders**" (*Current Opinion in Cardiology* 2015;30:33-9) présenté à la fin de cette section. Il s'agit d'un article invité par l'Editeur en chef de la revue *Current Opinion in Cardiology*.

Après un bref rappel des composantes structurales et fonctionnelles du système de conduction cardiaque, sont présentées dans ce travail les avancées récentes concernant les bases moléculaires des troubles de conduction héréditaires, lorsque ceux-ci surviennent sur coeur sain ou lorsqu'ils sont associés à une malformation cardiaque congénitale. Volontairement ne sont pas abordés ici les troubles conductifs héréditaires associés à une cardiomyopathie dilatée par mutation du gène *LMNA*, ni ceux associés à une cardiomyopathie hypertrophique en lien avec une mutation du gène *PRKAG2*, ceux associés à une maladie neuromusculaire et ceux associés à une maladie héréditaire du métabolisme.

Lorsqu'ils surviennent sur coeur sain, les troubles de conduction héréditaires se présentent comme une maladie électrique primitive. A ce jour ont été décrites des mutations au sein des gènes *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN10A*, *TRPM4*, *KCNK17* ou du gène *GJA5* codant pour la connexine 40 [Remme *et al*, 2008; Bezzina *et al*, 2013; Makita *et al*, 2012; Liu *et al*, 2010]. Les troubles de la conduction dus à une mutation du gène *SCN5A* peuvent également s'intégrer dans le cadre d'un syndrome dit chevauchant, associant aux troubles conductifs des caractéristiques des différentes arythmies liées au gène *SCN5A*, telles que le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long type 3 ou la dysfonction sinusale [Kovach *et al*, 2014; Kanter *et al*, 2012].

Une mutation au sein de gènes impliqués à la fois dans le développement des voies de conduction et dans la morphogénèse cardiaque, tels que *NKX2.5* et *TBX5*, a pour conséquence la survenue de troubles de la conduction cardiaque associés à une cardiopathie congénitale [McCulley *et al*, 2012] telle qu'une communication inter-atriale ostium secundum ou une tétralogie de Fallot, mais aussi un tronc artériel commun, un ventricule droit à double issue, une L-transposition des gros vaisseaux, une interruption de l'arche aortique ou un syndrome d'hypoplasie du coeur gauche [Schott *et al*, 1998; McElhinney *et al*, 2003; Basson *et al*, 1997; Baban *et al*, 2014; Bogarapu *et al*, 2014].

En résumé, de nombreuses mutations dans différents gènes sont responsables de troubles de conduction héréditaires. Puisque de nombreux gènes sont impliqués dans les composantes structurales et fonctionnelles du système de conduction cardiaque, il est probable que seule une petite fraction des mutations génétiques responsables de troubles de conduction ait été identifiée à ce jour. Une meilleure connaissance des bases moléculaires des troubles de conduction héréditaires permettra dans l'avenir une approche diagnostique intégrant le diagnostic génétique et une prévention ou un suivi adapté des apparentés du cas index, basés sur un diagnostic génétique au stade pre-symptomatique.



Inherited progressive cardiac conduction disorders

Alban-Elouen Baruteau^{a,b}, Vincent Probst^a, and Hugues Abriel^c

Purpose of review

Progressive cardiac conduction disorder (PCCD) is an inherited cardiac disease that may present as a primary electrical disease or be associated with structural heart disease. In this brief review, we present recent clinical, genetic, and molecular findings relating to PCCD.

Recent findings

Inherited PCCD in structurally normal hearts has been found to be linked to genetic variants in the ion channel genes *SCN5A*, *SCN1B*, *SCN10A*, *TRPM4*, and *KCNK17*, as well as in genes coding for cardiac connexin proteins. In addition, several *SCN5A* mutations lead to 'cardiac sodium channelopathy overlap syndrome'. Other genes coding for cardiac transcription factors, such as *NKX2.5* and *TBX5*, are involved in the development of the cardiac conduction system and in the morphogenesis of the heart. Mutations in these two genes have been shown to cause cardiac conduction disorders associated with various congenital heart defects.

Summary

PCCD is a hereditary syndrome, and genetic variants in multiple genes have been described to date. Genetic screening and identification of the causal mutation are crucial for risk stratification and family counselling.

Keywords

arrhythmias, atrio-ventricular block, electrophysiology, genetics, ion channels/membrane transport

INTRODUCTION

Major advances have recently been made in our understanding of the development and pathophysiology of progressive cardiac conduction disorders (PCCDs) [1,2]. Descriptions of the various genetic backgrounds behind the rare forms of familial PCCDs have also been reported, highlighting genotype–phenotype correlations and providing crucial insights into the molecular determinants of cardiac conduction [3]. This brief review aims to describe recent major advances in our understanding of the clinical, genetic and molecular characteristics of inherited PCCD.

THE CARDIAC CONDUCTION SYSTEM: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL COMPONENTS

The sino-atrial node, the atrio-ventricular node and the His-Purkinje system constitute the cardiac conduction system, which coordinates the initiation and propagation of the electrical impulse in the heart and the synchronous contraction of both ventricles [3,4]. Recent studies have shown that the cardiac conduction system has a unique embryological origin that is distinct from that of

the working myocardium [5]. This system involves more structures than originally thought, since it englobes the atrio-ventricular rings, a third retro-aortic node and the pulmonary and aortic sleeves [1,6].

Recent findings have increased our understanding of the role of cardiac ion channels underlying the generation and propagation of the electrical impulse through the cardiac conduction system. The upstroke and repolarization of the sino-atrial

^aL'Institut du Thorax, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche (UMR) 1087, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 6291, French Reference Center for Inherited Arrhythmias, Nantes University, Nantes, ^bMarie Lannelongue Hospital, Department of Pediatric and Congenital Cardiac Surgery, M3C – French Reference Center for Complex Congenital Heart Diseases, Le Plessis Robinson/Paris Sud University, Le Kremlin Bicêtre, Paris, France and ^cDepartment of Clinical Research, Swiss National Centre of Competence in Research (NCCR) TransCure, University of Bern, Bern, Switzerland

Correspondence to Dr Hugues Abriel, MD, PhD, University of Bern, Department of Clinical Research Murtenstrasse, 35, 3010 Bern, Switzerland. Tel: +41 31 6320928; fax: +41 31 6320946; e-mail: Hugues.Abriel@dkf.unibe.ch

Curr Opin Cardiol 2015, 30:33–39

DOI:10.1097/HCO.0000000000000134

KEY POINTS

- Genetic factors play an important role in patients with progressive cardiac conduction disorders.
- Recent studies have demonstrated that parents of paediatric patients with cardiac conduction alterations are also prone to conduction defects, demonstrating the high heritability of this trait.
- Mutations in genes encoding cardiac ion channels, ion channel-interacting proteins, cardiac transcription factors and cytoskeletal elements can cause cardiac conduction alterations.
- These recent findings illustrate the importance of genetic screening and genetic counselling in patients and families with cardiac conduction disorders.

node are the result of depolarizing voltage-gated calcium currents and repolarizing delayed rectifier potassium currents, respectively [7,8]. Cardiac automaticity is a result of diastolic depolarization, a spontaneous slow depolarization towards the threshold that generates a new action potential [9]. Voltage-gated sodium channels and gap junctions composed of connexin proteins are responsible for the fast propagation of the action potential through the atria, the His bundle, the Purkinje fibre network and the ventricular myocytes [10].

PROGRESSIVE CARDIAC CONDUCTION DISORDER IS AN INHERITED DISORDER

Clinical and molecular studies have led to the characterization of PCCD as an inherited disease.

First reports: familial pedigree of progressive cardiac conduction disorder

In 1901, Morquio was the first to notice a familial segregation of cardiac conduction disorders. A genetic background had long been suggested, with reports of familial clusters of isolated heart block segregation in two or more generations [11]. In 1965, Gazes *et al.* [12] reported segregation of Adams–Stokes seizures and second-degree heart block in four generations of the same family, suggesting a dominant inheritance. In the past decade, the field of molecular genetics has rapidly expanded and provided crucial data on the genetic basis of PCCD [13,14].

Genetic epidemiological approach to progressive cardiac conduction disorder

On the basis of the hypothesis that, in an area where the population is geographically stable, the offspring of an ancestor affected by a genetic disease

remain in this same area during several generations and a major difference in the disease repartition could appear, a genetic epidemiological approach was recently applied by Gourraud *et al.* [15] to show familial aggregation for PCCD. Using French social security numbers, the authors determined the city of birth of more than 6600 patients implanted with a pacemaker in the western part of France. Upon mapping the frequency of pacemaker implantations for PCCD, they observed a large heterogeneity in disease frequency, from 0.21 to 2.28%, in specific parishes. This study led to the identification of five large families with PCCD, strongly supporting a genetic background for PCCD.

Congenital and childhood non-immune isolated atrio-ventricular block is a genetic disease

Congenital atrio-ventricular block is a rare disorder with an estimated prevalence of 1 per 20000 live births. Maternal autoimmune disease accounts for 90–99% of all cases diagnosed before 6 months of age, where the trans-placental passage of maternal anti-Ro/SSA and/or anti-La/SSB auto-antibodies causes irreversible fibrosis of the fetal conduction system, as well as the inhibition of cardiac L-type calcium channels [16]. In the remaining cases in which no obvious cause of atrio-ventricular block can be identified, the heart block is considered to be idiopathic.

In the first large-scale study, looking at the heritability of paediatric idiopathic heart block in a French nationwide cohort, Baruteau *et al.* [17,18] observed a high degree of inheritance and a strong genetic contribution in the pathogenesis of congenital and childhood non-immune isolated atrio-ventricular block. Nearly 70% of the patients with an incomplete heart block progressed to a permanent complete one, suggesting a postnatal degenerative process of the conduction tissue [17,18]. The authors hypothesized that this process may be genetically determined. To test this hypothesis, parents of the patients were invited to undergo a screening 12-lead ECG. ECG screening in asymptomatic parents of children affected by idiopathic atrio-ventricular block revealed a high prevalence of cardiac conduction alterations characterized by a long P wave and prolonged PR and QRS intervals, indicative of intra-atrial, atrio-ventricular and intra-ventricular conduction abnormalities. Moreover, well-characterized conduction disturbances (mainly first-degree atrio-ventricular block, right bundle branch block and left axis deviation) were more frequent in parents of the patients of the cohort than in matched healthy control individuals. The

estimated heritability for isolated conduction disturbances was 91% and two SCN5A mutations were identified in the affected children, confirming that congenital and childhood non-immune isolated atrio-ventricular block is a highly heritable trait [18,19].

CLINICAL/MOLECULAR DESCRIPTION OF INHERITED PROGRESSIVE CARDIAC CONDUCTION DISORDER IN STRUCTURALLY NORMAL HEARTS

Progressive cardiac conduction disorder may present as a primary electrical disease.

SCN5A

Cardiac sodium channel dysfunction caused by mutations in the SCN5A gene leads to a broad spectrum of hereditary arrhythmias with variable phenotypic expression [20]. The phenotypic spectrum ranges from lethal arrhythmias to asymptomatic carriers, and includes Brugada syndrome, cardiac conduction disease and atrio-ventricular block, congenital sick sinus syndrome, atrial standstill, familial atrial fibrillation, dilated cardiomyopathy, congenital long-QT syndrome type 3 (LQT3) and sudden infant death syndrome [21]. The gene SCN5A codes for the main cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 [20], which is expressed in the conduction system and in the regions surrounding the sino-atrial and the atrio-ventricular nodes [7]. Thus far, at least 16 distinct mutations in SCN5A have been found to cause conduction alterations and block in patients and their families [22]. The vast majority of these mutations, when functionally characterized [23], reduced the sodium current, thereby leading to a loss of function consistent with the slowed cardiac conduction observed in patients.

SCN5A overlap syndrome

SCN5A mutation carriers tend to exhibit overlapping clinical manifestations of the distinct SCN5A-related syndromes, which is defined as ‘SCN5A overlap syndrome’ [24]. In many cases, cardiac conduction is altered in these patients. Recently, Kanter *et al.* [25] reported ventricular arrhythmias and intra-ventricular conduction delays in young children due to loss-of-function sodium and/or calcium channelopathies. Other recently reported SCN5A mutation-related overlap syndromes included LQT3 and dilated cardiomyopathy [26], LQT3 and early-onset lone atrial fibrillation [27], LQT3 and Brugada syndrome [28], and Brugada

syndrome, conduction disease and atrial flutter [29].

SCN1B

The cardiac sodium channel protein Nav1.5, which constitutes the pore-forming subunit, has been shown to be part of distinct multi-protein complexes in different membrane compartments of the cardiac cells [30]. Among the proteins interacting directly with Nav1.5, at least four beta-subunits were shown to modulate the expression and function of the sodium channel [31]. Watanabe *et al.* [14] recently found three pathogenic mutations in the gene SCN1B, which codes for the beta1 subunit of the voltage-gated sodium channel, in families with conduction alterations and, in certain cases, Brugada syndrome. All three mutations were shown to decrease the Nav1.5-mediated current in cellular expression system compared with controls.

SCN10A

In several large, genome-wide association studies, loci within the SCN10A gene, coding for the voltage-gated sodium channel Nav1.8, were found to be associated with atrio-ventricular conduction [32] and Brugada syndrome [33]. Although the expression of Nav1.8 in cardiac cells is still under debate [34,35], a recent study [36] provided evidence that a cardiac enhancer in SCN10A interacts with and regulates the promoter of SCN5A, thus providing an explanation for how SCN10A genetic variants may affect conduction. The details of these complex regulatory mechanisms are still not well understood, and may also be complicated by the observation that many variants of SCN10A were found to be present in patients with Brugada syndrome [37].

Connexins

Cardiac gap junctions are composed of proteins called connexins (Cxs), which form low-resistance channels that allow electrical coupling and intercellular electrical communication [10]. Four connexin isoforms are expressed in the human heart with regional distribution: Cx40, which forms large-conductance gap junction channels; Cx43, which forms medium-conductance gap junction channels; Cx45, which forms small-conductance gap junction channels; and Cx31.9, which forms ultra-small-conductance gap junction channels [38]. Alterations in the expression of cardiac connexins may cause abnormal activation to spread through the myocardium and lead to conduction disorders. In a recent study, Makita *et al.* [39] first demonstrated

a causal relationship between nucleotide substitutions in gene coding for connexin-40 protein and progressive familial heart block. From a screening of 156 probands with progressive familial heart block, they identified a mutation in the gene encoding Cx40 (Q58L) in one family. Heterologous expression of Cx40-Q58L in connexin-deficient cells resulted in a marked reduction in junctional conductance and the diffuse localization of Cx40 proteins in the vicinity of the plasma membrane, without the formation of gap junctions. This study, which was the first to demonstrate a germ-line mutation in a connexin gene associated with inherited conduction disorders, emphasizes the importance of Cx40 in the normal propagation of the electrical impulse in the specialized cardiac conduction system.

TRPM4

Recently, the transient receptor potential (TRP) channel TRPM4 has been implicated in different cardiac disorders [40]. Kruse *et al.* [41] described the first TRPM4 mutation, p. E7K, in an Afrikaner family with a familial conduction disorder. The affected individuals were heterozygous carriers of the mutation, which was transmitted in a dominant fashion. In cellular expression systems, mutant TRPM4 channels produce a larger current than their wild-type counterparts, possibly due to an insensitivity to deSUMOylation, thus impairing endocytosis and stabilizing the mutant channels at the cell surface [41]. More recently, three more mutations in TRPM4 were reported in French and Lebanese families with PCCD [42]. Functional experiments expressing these three mutant variants of TRPM4 suggested a similar gain-of-function phenomenon related to altered deSUMOylation. In another recent study [43], an additional six TRPM4 mutations in patients with right bundle branch block and atrio-ventricular block were identified, but electrophysiological or biochemical studies have yet to be carried out in order to elucidate the potential mechanisms involved. Altogether, these recent studies strongly suggest that the cardiac channel TRPM4 plays a key role in the pathogenesis of genetically determined conduction disorders. It may be that gain-of-function mutant TRPM4 channels lead to cell membrane depolarization in the conduction system, thus reducing the number of available sodium channels and resulting in the observed conduction abnormalities.

KCNK17

In a recent study [44[■]] reporting on a PCCD patient with idiopathic ventricular fibrillation, whole exome sequencing identified a missense mutation,

G88R, in the gene KCNK17, which codes for the potassium channel TASK-4. This mutation led to a gain of function of the TASK-4-mediated current and may, similarly to the gain-of-function mechanisms proposed for TRPM4 [40], reduce the availability of the sodium current by depolarizing the membrane of conduction system cells. Importantly, this study also demonstrated the expression of the TASK-4 channel in human Purkinje cells [44[■]].

CLINICAL AND MOLECULAR DESCRIPTION OF INHERITED PROGRESSIVE CARDIAC CONDUCTION DISORDER ASSOCIATED WITH CONGENITAL HEART DISEASES

Several genes encoding cardiac transcription factors are essential for the development of the conduction system as well as in cardiac septation and morphogenesis. Recent genetic findings suggest that approximately 10% of sporadic congenital heart diseases may have de-novo mutations that significantly contribute to the disease process [45,46[■],47]. A molecular pathway including TBX5, NKX2.5 and Id2 genes coordinates the specification of ventricular myocytes into the ventricular conduction system lineage [48]. Moreover, several transcription factors modify gene expression of ion channel proteins that contribute to the electrophysiological properties of the conduction system and govern the contraction of the surrounding myocardium [49]. Mutations in genes encoding for core transcription factors critical for cardiac chamber formation, endocardial cushion remodelling and conduction system development, like NKX2.5 and Tbx5, may lead to progressive cardiac conduction disorders associated with congenital heart diseases [50].

NKX2.5

The first study identifying mutations in the gene coding for the cardiac-specific homeobox transcription factor NKX2.5 was in four families with secundum atrial septal defects (ASDs) and atrio-ventricular conduction disorders [51]. Since then, numerous mutations in this transcription factor have been reported with various congenital heart defect phenotypes, such as secundum ASD, tetralogy of Fallot, truncus arteriosus, double-outlet right ventricle, L-transposition of great arteries, interrupted aortic arch and hypoplastic left heart syndrome, with or without conduction disorders [52]. More recently, Wenckebach periodicity, ventricular non-compaction and sudden death have been added to the spectrum of clinical manifestations associated with NKX2.5 mutations [53,54], and experimental studies have confirmed that NKX2.5

regulates the proliferation of atrial working and conduction myocardium in coordination with Notch pathway [55[■]].

Tbx5

In 1997, Basson *et al.* [56] screened two families with Holt–Oram syndrome and identified mutations in the gene encoding the T-box transcription factor Tbx5. Holt–Oram syndrome is characterized by radial ray upper limb abnormalities and cardiac septation defects with an autosomal dominant transmission pattern. The septal defects consist of secundum ASD, muscular ventricular septal defects or atrioventricular septal defects and may also be associated with aortic coarctation [57]. Affected patients also present various degrees of conduction disorders, such as sinus bradycardia and atrio-ventricular block, even in the absence of overt structural heart disease [58]. Another member of the T-box family transcription factor, TBX3, is found in close proximity to TBX5 on chromosome 12q24. Mutations in TBX3 cause ulnar-mammary syndrome, and an exceptional case of contiguous deletions of both TBX5 and TBX3 has been recently reported in a patient with features of both Holt–Oram syndrome and ulnar-mammary syndrome, consisting of bilateral symmetric limb malformations, congenital heart defects and rapidly progressive cardiac conduction disease [59[■]].

DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC MANAGEMENT OF PATIENTS WITH INHERITED PROGRESSIVE CARDIAC CONDUCTION DISORDER

Inherited progressive cardiac conduction disease is mainly diagnosed in the presence of unexplained progressive conduction abnormalities in individuals younger than 50 years with structurally normal hearts, in the absence of skeletal myopathies, especially if there is a family history of PCCD. The diagnosis of PCCD in an index patient is based on clinical data (history, family history, 12-lead ECG), and a two-dimensional (2D) echocardiography or cardiac MRI when needed to exclude an underlying congenital heart disease and/or cardiomyopathy. Early-onset PCCD in structurally normal heart should prompt consideration of PCCD genetic testing, particularly if there is a family history of PCCD, pacemaker implant or sudden death [60]. Unfortunately, thus far, there is no genotype-based risk stratification that is available. Clinicians should keep a low threshold for investigating symptoms or ECG findings to determine the need for electrophysiological studies or pacemaker implantation. Management of PCCD patients includes

restriction of medications with conduction-slowing properties, as well as active treatment of fever in *SCN5A* mutation carriers. The Heart Rhythm Society/European Heart Rhythm Association/Asia-Pacific Heart Rhythm Society expert consensus statement considers that permanent pacemaker implantation is recommended in PCCD patients with either intermittent or permanent third-degree or high-grade atrio-ventricular block, or symptomatic Mobitz I or II second-degree atrio-ventricular block (class I recommendation). Pacemaker implantation can be useful in PCCD patients with bifascicular block with or without first-degree atrio-ventricular block (class IIa recommendation) [61]. Targeted genetic screening of first-degree relatives of a mutation-positive PCCD patient is also part of the management, to allow prospective follow-up of asymptomatic mutation carriers.

CONCLUSION

A large number of genes have been linked to cardiac conduction disorders. It is now clear that cardiac conduction defects are not only associated with aging, but that many complex pathophysiological processes may lead to the occurrence of atrio-ventricular and intra-ventricular block. Many genes and gene networks are involved in the electrophysiological activity of the heart, and it is likely that only a small fraction of these genetic defects have been currently identified. In the future, it could be possible to determine most of the causative genetic alterations and in turn determine the actual proportion of conduction disorders due to genetic defects. Once this first step is achieved, genetic analysis would be part of the routine clinical assessment of patients affected by PCCD. Since the appearance of these conduction alterations is a slow process over time, genetic tests could help to better determine the risk of progression of a cardiac conduction defect and hence determine the best timing for pacemaker implantation. In the longer term, it may be possible, through early identification of patients at risk of developing cardiac conduction defects, notably by familial screening, to develop preventive strategies, using drugs able to slow the development of these potentially fatal disorders.

Acknowledgements

The authors thank Biotelligences LLC (Lausanne, Switzerland) for their suggestions on the text of this manuscript.

Financial support and sponsorship

None.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Dobrzynski H, Anderson RH, Atkinson A, *et al.* Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. *Pharmacol Ther* 2013; 139:260–288.
2. Gilbert-Barnes E. Conduction defects/cardiomyopathies. *Adv Pediatr* 2014; 61:127–148.
3. Munshi NV. Gene regulatory networks in cardiac conduction system development. *Circ Res* 2012; 110:1525–1537.
4. Anderson RH, Yanni J, Boyett MR, *et al.* The anatomy of the cardiac conduction system. *Clin Anat* 2009; 22:99–113.
5. Gourdie RG, Harris BS, Bond J, *et al.* Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69:46–57.
6. Yanni J, Boyett MR, Anderson RH, *et al.* The extent of the specialized atrioventricular ring tissues. *Heart Rhythm* 2009; 6:672–680.
7. Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, *et al.* The anatomy and physiology of the sinoatrial node: a contemporary review. *Pacing Clin Electrophysiol* 2010; 33:1392–1406.
8. Nikolaidou T, Aslanidi OV, Zhang H, *et al.* Structure-function relationship in the sinus and atrioventricular nodes. *Pediatr Cardiol* 2012; 33:890–899.
9. Barbuti A, Baruscotti M, DiFrancesco D. The pacemaker current: from basics to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2007; 18:342–347.
10. Kleber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev* 2004; 84:431–488.
11. Lynch HT, Mohiuddin S, Sketch MH, *et al.* Hereditary progressive atrioventricular conduction defect. A new syndrome? *JAMA* 1973; 225:1465–1470.
12. Gazes PC, Culler RM, Taber E, *et al.* Congenital familial cardiac conduction defects. *Circulation* 1965; 32:32–34.
13. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, *et al.* Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999; 23:20–21.
14. Watanabe H, Koopmann TT, Le SS, *et al.* Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 2008; 118:2260–2268.
15. Gourraud JB, Kyndt F, Fouchard S, *et al.* Identification of a strong genetic background for progressive cardiac conduction defect by epidemiological approach. *Heart* 2012; 98:1305–1310.
16. Ambrosi A, Sonesson SE, Wahren-Herlenius M. Molecular mechanisms of congenital heart block. *Exp Cell Res* 2014; 325:2–9.
17. Baruteau AE, Fouchard S, Behaghel A, *et al.* Characteristics and long-term outcome of nonimmune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicentre study. *Eur Heart J* 2012; 33:622–629.
18. Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S, *et al.* Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood non-immune isolated atrio-ventricular block. *Circulation* 2012; 126:1469–1477.
19. Cannon BC, Ackerman MJ. Surprise, surprise: idiopathic, isolated complete atrioventricular block may be heritable. *Circulation* 2012; 126:1434–1435.
20. Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 and interacting proteins: physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48:2–11.
21. Remme CA. Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects. *J Physiol* 2013; 591:4099–4116.
22. Kovach JR, Benson DW. Conduction disorders and Nav1.5. *Cardiol Clin* 2014; 6:723–731.
23. Zimmer T, Surber R. SCN5A channelopathies: an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2008; 98:120–136.
24. Remme CA, Wilde AAM, Bezzina CR. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18:78–87.
25. Kanter RJ, Pfeiffer R, Hu D, *et al.* Brugada-like syndrome in infancy presenting with rapid ventricular tachycardia and intraventricular conduction delay. *Circulation* 2012; 125:14–22.
26. Kwon HW, Lee SY, Kwon BS, *et al.* Long QT syndrome and dilated cardiomyopathy with SCN5A p.R1193Q polymorphism: cardioverter-defibrillator implantation at 27 months. *Pacing Clin Electrophysiol* 2012; 35:e243–e246.
27. Olesen MS, Yuan L, Liang B, *et al.* High prevalence of long QT syndrome-associated SCN5A variants in patients with early-onset lone atrial fibrillation. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; 5:450–459.
28. Nakaya H. SCN5A mutations associated with overlap phenotype of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome. *Circ J* 2014; 78:1061–1062.
29. Hothi SS, Ara F, Timperley JP. Y1449C SCN5A mutation associated with overlap disorder comprising conduction disease, Brugada syndrome, and atrial flutter. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014. [Epub ahead of print] An interesting study reporting familial segregation of a SCN5A mutation in a single family with a spectrum of cardiac phenotypes including conduction disease, Brugada syndrome and atrial arrhythmias.
30. Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833:886–894.
31. Brackenburg WJ, Isom LL. Na⁺ channel β subunits: overachievers of the ion channel family. *Front Pharmacol* 2011; 2:53.
32. Pfeufer A, van NC, Marciante KD, *et al.* Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet* 2010; 42:153–159.
33. Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y, *et al.* Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat Genet* 2013; 45:1044–1049.
34. A genome-wide association study of 312 individuals with Brugada syndrome and 1115 controls demonstrating that common genetic variants can have a strong impact on the predisposition to rare diseases.
35. Verkerk AO, Remme CA, Schumacher CA, *et al.* Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ Res* 2012; 111:333–343.
36. Yang T, Atack TC, Stroud DM, *et al.* Blocking SCN10A channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ Res* 2012; 111:322–332.
37. van den Boogaard M, Smemo S, Burnicka-Turek O, *et al.* A common genetic variant within SCN10A modulates cardiac SCN5A expression. *J Clin Invest* 2014; 124:1844–1852.
38. Hu D, Barajas-Martinez H, Pfeiffer R, *et al.* Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64:66–79.
39. From a cohort of 150 probands and family members and more than 200 healthy controls, this study identifies SCN10A as a major susceptibility gene for BrS, thus greatly enhancing our ability to genotype and risk stratify probands and family members.
40. Temple IP, Inada S, Dobrzynski H, *et al.* Connexins and the atrioventricular node. *Heart Rhythm* 2013; 10:297–304.
41. Makita N, Seki A, Sumitomo N, *et al.* A connexin40 mutation associated with a malignant variant of progressive familial heart block type I. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012; 5:163–172.
42. Abriel H, Syam N, Sottas V, *et al.* TRPM4 channels in the cardiovascular system: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Biochem Pharmacol* 2012; 84:873–881.
43. Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, *et al.* Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest* 2009; 119:2737–2744.
44. Liu H, El ZL, Kruse M, *et al.* Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3:374–385.
45. Stallmeyer B, Zumhagen S, Denjoy I, *et al.* Mutational spectrum in the Ca(2+) activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Hum Mutat* 2011; 33:109–117.
46. Friedrich C, Rinne S, Zumhagen S, *et al.* Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO Mol Med* 2014; 6:937–951.
47. Whole-exome sequencing identified mutation in the KCNK17 gene encoding the K2P potassium channel TASK-4 to be associated with cardiac conduction disorder.
48. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008; 451:943–948.
49. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, *et al.* De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature* 2013; 498:220–223.
50. This important study compares the incidence of de-novo mutations in 362 severe congenital heart disease cases and 264 controls by analysing exome sequencing of parent-offspring trios. Authors find a marked excess of de-novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease.
51. Bruneau BG, Srivastava D. Congenital heart disease: entering a new era of human genetics. *Circ Res* 2014; 114:598–599.
52. Moskowitz IP, Kim JB, Moore ML, *et al.* A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development. *Cell* 2007; 129:1365–1376.
53. Sizarov A, Devalla HD, Anderson RH, *et al.* Molecular analysis of patterning of conduction tissues in the developing human heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011; 4:532–542.
54. McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol* 2012; 100:253–277.
55. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, *et al.* Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 1998; 281:108–111.
56. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, *et al.* NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1650–1655.

53. Ouyang P, Saarel E, Bai Y, *et al.* A de novo mutation in NKX2.5 associated with atrial septal defects, ventricular noncompaction, syncope and sudden death. *Clin Chim Acta* 2011; 412:170–175.
54. Guntheroth W, Chun L, Patton KK, *et al.* Wenckebach periodicity at rest that normalizes with tachycardia in a family with a NKX2.5 mutation. *Am J Cardiol* 2012; 110:1646–1650.
55. Nakashima Y, Yanez DA, Touma M, *et al.* Nkx2-5 suppresses the proliferation of atrial myocytes and conduction system. *Circ Res* 2014; 114:1103–1113. This study suggests that Nkx2-5 regulates the proliferation of atrial working and conduction myocardium in coordination with Notch pathway.
56. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, *et al.* Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* 1997; 15:30–35.
57. Baban A, Pitto L, Pulignani S, *et al.* Holt-Oram syndrome with intermediate atrioventricular canal defect, and aortic coarctation: functional characterization of a de novo TBX5 mutation. *Am J Med Genet A* 2014; 164A:1419–1424.
58. McDermott DA, Fong JC, Basson CT. Holt-Oram syndrome. In Pagon RA, Heal AMA, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle, WA: University of Washington; 1993. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1111/>.
59. Bogarapu S, Bleyl SB, Calhoun A, *et al.* Phenotype of a patient with contiguous deletion of TBX5 and TBX3: expanding the disease spectrum. *Am J Med Genet A* 2014; 164A:1304–1309.
- Authors report on a patient with features of both Holt–Oram syndrome and ulnar-mammary syndrome consisting of bilateral symmetric limb malformations, congenital cardiac defects, and rapidly progressive cardiac conduction disease.
60. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, *et al.* HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies. *Europace* 2011; 13:1077–1109.
61. Priori SG, Wilde AA, Horie M, *et al.* HRS/EHRA/APHR expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHR in May 2013 and by ACCF/AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm* 2013; 10:1932–1963.

**CHAPITRE 3: ETUDE DES BASES GÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES DU BLOC
 ATRIO-VENTRICULAIRE DIAGNOSTIQUÉ *IN UTERO* ET AU COURS DE
 L'ENFANCE, SANS ANOMALIE DE L'ARCHITECTURE CARDIAQUE**

I- INTRODUCTION

Le BAV est une pathologie pédiatrique rare et dans la vaste majorité des cas sporadique. La très grande majorité des formes rencontrées présentent une association causale avec une maladie dysimmunitaire maternelle ou avec une malformation cardiaque congénitale. La prévalence du BAV isolé, c'est-à-dire survenant sur un cœur d'architecture normale, est estimée à 1 pour 15.000 à 20.000 naissances vivantes, une maladie dysimmunitaire maternelle rendant compte de 90 à 99% de tous les cas diagnostiqués avant l'âge de 6 mois [Michaelsson *et al*, 1997; Brucato *et al*, 2003]. En cas de séronégativité maternelle pour les auto-anticorps anti-Ro/SSA et/ou anti-La/SSB et d'absence de cardiopathie congénitale, le bilan étiologique s'attache également à rechercher un certain nombre d'autres causes moins fréquentes de troubles de conduction secondaires, telle qu'une origine infectieuse, métabolique, traumatique ou pharmacologique. Certaines formes de troubles de conduction pédiatriques isolés s'intègrent exceptionnellement dans un cadre familial et ont pu être associées à des mutations génétiques [Schott *et al*, 1999; Wanatabe *et al*, 2008].

Dans un nombre de cas restreint, aucune cause n'est documentée au terme d'un bilan étiologique exhaustif et le BAV, isolé, sporadique et non-immun, est alors considéré comme "idiopathique". La publication de formes familiales de troubles conductifs incluant de rares observations pédiatriques et la mise en évidence de gènes responsables de troubles de conduction héréditaires, nous a incité à formuler l'hypothèse que ces troubles de conduction inexplicables du fœtus, du nourrisson et de l'enfant, bien que d'allure idiopathique et sporadique, soient en réalité d'origine génétique.

Les travaux de ce chapitre 3 sont présentés dans l'ordre des deux phases de notre démarche:

1- une première phase de recherche clinique visant à caractériser le BAV isolé et non-immun du nourrisson et de l'enfant et à rechercher des arguments cliniques pour conforter l'hypothèse d'une origine génétique. Cette phase a permis la constitution d'une vaste cohorte multicentrique de propositus présentant le phénotype d'intérêt, afin de connaître le mode de présentation et le profil évolutif de cette forme mal documentée de troubles de conduction; elle a également consisté en l'étude des antécédents familiaux et la réalisation d'un dépistage électrocardiographique des parents (asymptomatiques) des cas index, à la recherche d'anomalies infracliniques de la conduction cardiaque.

2- une seconde phase de recherche fondamentale visant à documenter les bases génétiques et moléculaires de cette forme de BAV du nourrisson et de l'enfant. Cette phase a été marquée par la constitution d'une banque d'ADN sur le phénotype d'intérêt, concernant les propositus et leurs apparentés au premier degré, une première approche gène candidat (séquençage direct de 14 gènes) et secondairement la recherche de variants rares par l'analyse de trios familiaux issus de cette cohorte.

Les projets de recherche de ce second chapitre ont été initiés lors de mon master-2 à l'institut du thorax dans l'équipe de Jean-Jacques Schott (équipe 3: Génétique des maladies cardiovasculaires héréditaires) puis poursuivis dans le cadre de ma thèse de médecine et enfin dans le cadre de cette thèse d'université.

II- Etude #1: CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES DU BLOC ATRIO-VENTRICULAIRE ISOLÉ ET NON-IMMUN EN PÉDIATRIE

II.1- Problématique

Les caractéristiques des BAV d'étiologie secondaire, en particulier du BAV foetal et/ou immunologique, des BAV malformatifs, des BAV infectieux et des BAV métaboliques ont été largement étudiées par de nombreuses équipes et des mises à jour récentes spécifiques sont disponibles dans la littérature médicale [Bordachar *et al*, 2013; Miyoshi *et al*, 2015; Forrester *et al*, 2014; Kabunga *et al*, 2015]. En revanche, compte-tenu de sa très faible prévalence, l'histoire naturelle du BAV "idiopathique" de l'enfant n'est quant-à-elle pas connue, bien qu'il ait été suggéré que ces patients connaissent un profil évolutif distinct de celui des BAV immunologiques [Villain *et al*, 2006; Eliasson *et al*, 2015].

II.2- Objectif

L'objectif de notre travail était de décrire les caractéristiques cliniques et le devenir à long-terme de cette forme rare et mal documentée de troubles de la conduction cardiaque chez l'enfant.

II.3- Méthodologie

Définitions. Le BAV était défini comme congénital s'il était diagnostiqué *in utero*, à la naissance ou au cours du premier mois de vie extra-utérine [Brucato *et al*, 2003]. *A contrario*, le BAV de l'enfance était diagnostiqué entre le premier mois de vie et la dix-huitième année.

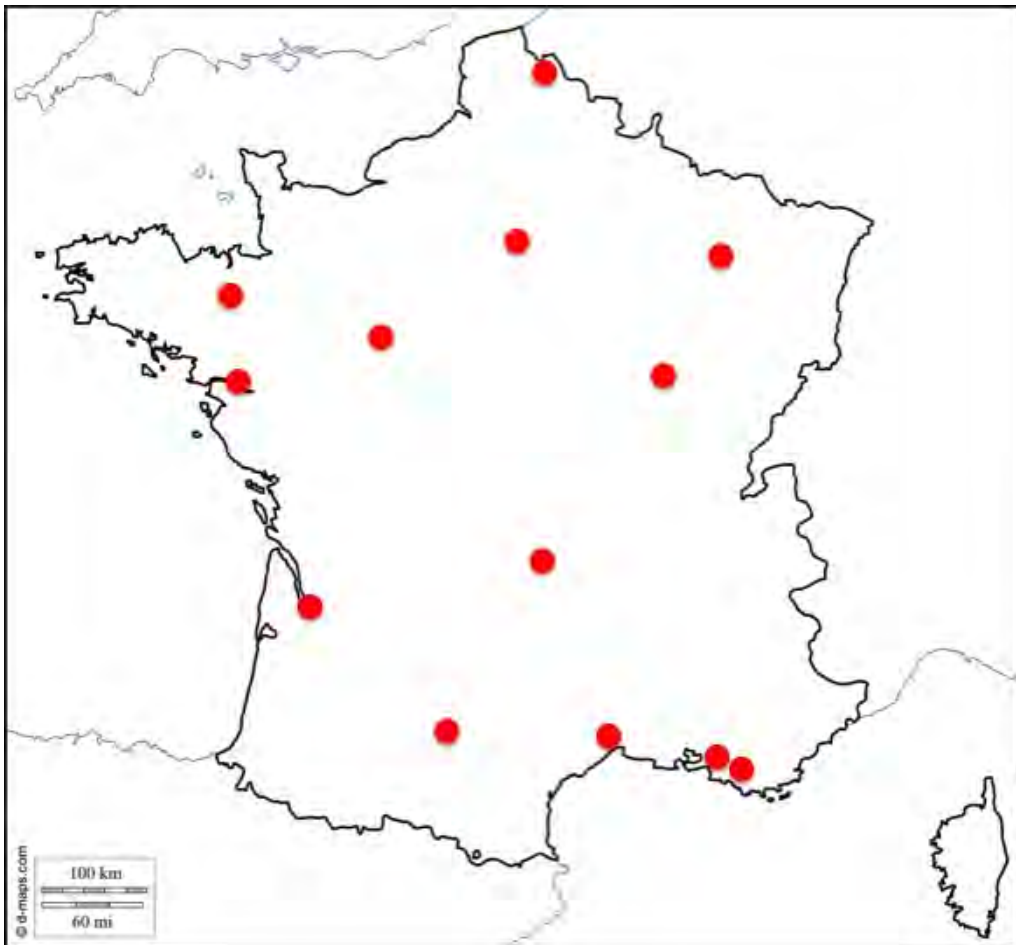
Caractéristiques de l'étude. Nous avons mis en place une étude multicentrique nationale, rétrospective sur 29 ans (1980 à 2009), visant à constituer une grande cohorte d'enfants porteurs d'un BAV considéré comme « idiopathique », et de colliger ainsi une vaste base de données cliniques et électrocardiographiques sur le phénotype d'intérêt. Treize centres français de cardiologie pédiatrique ont participé à ce travail (Figure 3-1). Cette étude a été agréée par le bureau de la Filiale de cardiologie pédiatrique et congénitale de la Société Française de Cardiologie. Les caractéristiques de l'étude #1 sont résumées dans le Tableau 3-1.

Identification des patients. L'identification des patients a été réalisée dans chaque centre par le co-investigateur local, à partir des bases de données personnelles des médecins et/ou du PMSI hospitalier (programme de médicalisation des systèmes d'information) colligeant, en première approche, tous les dossiers répondant aux codes suivants:

- . I44 - bloc de branche gauche et auriculo-ventriculaire;
- . I440 - bloc auriculo-ventriculaire du premier degré;
- . I441 - bloc auriculo-ventriculaire du second degré;
- . I442 - bloc auriculo-ventriculaire complet;
- . I443 - blocs auriculo-ventriculaires, autres et sans précision;
- . I444 - bloc fasciculaire antérieur gauche;
- . I445 - bloc fasciculaire postérieur gauche;
- . I446 - blocs fasciculaires, autres et sans précisions;
- . I447 - bloc de branche gauche, sans précision;
- . 1421 - pose d'un stimulateur cardiaque permanent avec insuffisance cardiaque;
- . 1422 - pose d'un stimulateur cardiaque permanent sans insuffisance cardiaque;
- . 1428 - remplacement ou ablation chirurgicale d'électrodes ou de boîtier de stimulation cardiaque permanente.

Recueil des données. Le cahier d'observation a été rédigé avec une attention particulière concernant les données relatives à l'histoire familiale (antécédents familiaux de mort subite, de mort subite inexpliquée du nourrisson, de syncope, d'implantation d'un stimulateur cardiaque), au terrain (sérologie maternelle lupique, échocardiographie transthoracique), au mode de présentation du trouble conducteur (âge au diagnostic, symptômes, ECG au diagnostic), à la stimulation cardiaque le cas échéant (âge à l'implantation du premier stimulateur cardiaque, ECG à l'implantation, indication de stimulation cardiaque permanente, type et mode de stimulation) et au suivi (durée du suivi, événements cardiovasculaires majeurs, complications liées au stimulateur cardiaque, ECG lors de la dernière visite chez les patients non stimulés).

Figure 3-1: Carte des treize centres français participants



Treize centres de cardiologie pédiatrique français ont participé à cette étude: l'hôpital Necker-Enfants Malades à Paris, le CHU de Nantes, le CHU de Montpellier, le CHU de Dijon, le CHU de Bordeaux, le CHU de Marseille, le CHU de Nancy, l'Espace Viton à Marseille, le CHU de Tours, le CHU de Lille, le CHU de Rennes, le CHU de Clermont-Ferrand et al CHU de Toulouse.

Tableau 3-1: Caractéristiques de l'étude #1

| | |
|----------------------------------|---|
| Etude #1 | Identification des caractéristiques cliniques du bloc atrioventriculaire isolé non-immun, diagnostiqué <i>in utero</i> et au cours de l'enfance |
| Institution coordinatrice | L'institut du thorax, INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291 Université de Nantes, Nantes, France |
| Investigateur principal | Dr. Alban-Elouen Baruteau |
| Comité scientifique | Dr. Elisabeth Villain, Pr. Vincent Probst |
| Attachée de recherche | Swanny Fouchard |
| Statisticien | Béatrice Guyomarc'h |
| Schéma de l'étude | Etude rétrospective multicentrique nationale |
| Comité d'Ethique | CPPRB n°2 Région Pays de la Loire, 2008 |
| Agrément | Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale, SFC |
| Financement | Bourse de recherche Philippe Coumel 2009, SFC Leducq Foundation – Transatlantic Network of Excellence, grant n°05 CVD 01 Fondation pour la Recherche Médicale, "Aging and Cardiac Conduction: Genetics and Pathophysiology of Progressive Conduction Defects" |
| Co-Investigateurs | Dr. Elisabeth Villain, APHP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris Pr. Véronique Gournay, CHU de Nantes Dr. Sophie Guillaumont, CHU de Montpellier Dr. Caroline Bonnet, CHU de Dijon Pr. Jean-Benoit Thambo, CHU de Bordeaux Pr. Alain Fraisse, CHU de Marseille Dr. François Marcon, CHU de Nancy Dr. Francis Rouault, Espace Viton, Marseille Pr. Alain Chantepie, CHU de Tours Pr. François Godart, CHU de Lille Dr. Jean-Marc Schleich, CHU de Rennes Pr. Jean-René Lusson, CHU de Clermont-Ferrand Dr. Yves Dulac, CHU de Toulouse |
| Nb de sujets inclus | 141 propositus |
| Critères d'inclusion | 1- BAV de tout grade (du BAV du premier degré au BAV complet) et 2- BAV considéré comme "idiopathique", sans cause documentée et 3- BAV diagnostiqué <i>in utero</i> , à la naissance ou avant l'âge de 15 ans et 4- accord du patient ou de son responsable legal |
| Critères d'exclusion | 1- Sérologie lupique maternelle positive; ou 2- refus du patient |
| Publication | Baruteau AE et al, <i>European Heart Journal</i> 2012;33:622-29. |

SFC: Société Française de Cardiologie

Contrôle de la sérologie lupique maternelle. Les enfants porteurs d'un BAV "idiopathique" de tout grade, diagnostiqué avant l'âge de 15 ans, entre 1980 et 2009 dans treize centres de cardiologie pédiatrique français ont été inclus dans ce travail. Bien que l'un des critères d'inclusion soit la séronégativité lupique maternelle, nous avons systématiquement vérifié le statut immun des mères de tous les enfants éligibles à nos critères d'inclusion, afin d'être sûr de ne pas inclure par excès un BAV immunologique méconnu. En effet, il a été montré que 9% des mères qui sont séronégatives au moment du diagnostic d'un BAV foetal deviennent secondairement séropositives, et que par ailleurs, une fois détectés dans le serum maternel, les auto-anticorps anti-Ro/SSA et/ou anti-La/SSB demeurent toujours détectables au cours du temps [Lopes *et al*, 2008; Derksen *et al*, 1992; Tseng *et al*, 1996].

Le contrôle de la sérologie lupique maternelle a été assuré par Swanny Fouchard. Après avoir informé les mères des patients par un contact téléphonique, un kit de prélèvement leur était envoyé par voie postale, comprenant:

- a/ une feuille d'information expliquant par écrit la justification et les modalités de l'étude;
- b/ un consentement éclairé de participation à l'étude (2 exemplaires);
- c/ une ordonnance pour faire réaliser une sérologie lupique maternelle (recherche de facteur anti-nucléaire; en cas de positivité, recherche complémentaire d'auto-anticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB)
- d/ une enveloppe pré-timbrée pour le renvoi à l'institut du thorax de Nantes du consentement signé et du résultat de la sérologie lupique maternelle. Le patient n'était inclus qu'à la réception de ce résultat.

Analyses ECG. Nous avons recueillis les ECG 12-dérivations de 141 propositus, enregistrés au moment du diagnostic, au moment de la primo-implantation du stimulateur cardiaque le cas échéant ou lors de la dernière consultation de suivi chez les patients non stimulés. Les ECG ont été systématiquement réinterprétés par deux médecins investigateurs (le Dr. Albin Behaghel et moi) "en aveugle" concernant le diagnostic du trouble conducteur du patient. Les mesures des différents paramètres ECG ont été comparées aux valeurs normales pour l'âge [Fleming *et al*, 2011; Rijnbeek *et al*, 2001]. Le diagnostic des troubles de conduction atrioventriculaire et/ou intraventriculaire et l'analyse de l'intervalle QT ont été réalisés selon les définitions usuelles et les critères recommandés par l'American Heart Association et l'Heart Rhythm Society [Surawicz *et al*, 2009; Rautaharju *et al*, 2009; Elizari *et al*, 2007; Mangrum *et al*, 2000]. Les mesures de la fréquence cardiaque, de l'intervalle PR (non réalisée en cas de BAV complet), de la durée du complexe QRS et de l'intervalle QT ont été réalisées en utilisant le logiciel de mesure DatInf® (Datinf GmbH, Tübingen, Germany). L'intervalle QT a été corrigé pour la fréquence cardiaque en utilisant la formule de Bazett [Bazett *et al*, 1920]. Chacun des deux médecins a analysé tous les tracés ECG, et les mesures des différents intervalles ont ensuite été moyennées.

II.4- Principaux résultats

L'ensemble des résultats est détaillé dans l'article « **Characteristics and long-term outcomes of non-immune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicenter study** » (*European Heart Journal* 2012;33:622-9) présenté à la fin de cette section.

Les principaux résultats sont résumés ici. Cette étude d'inclusion multicentrique a permis de constituer une cohorte de 177 propositus non apparentés, répondant aux critères d'inclusion. Trente-six d'entre eux ont été exclus de l'analyse statistique, du fait de données échocardiographiques manquantes au moment du diagnostic du BAV (n=6 patients), de l'impossibilité de vérifier le statut immun maternel (n=13 patients) ou d'une rupture de suivi (n=17 patients), laissant 141 patients (72 filles) dans l'analyse finale.

Mode de présentation. Notre cohorte comprend 26 (18.4%) BAV congénitaux et 115 (81.6%) BAV de l'enfance. Dans la majorité des cas (74.5%), le diagnostic du BAV était posé avant l'âge de 5 ans. Le BAV était symptomatique chez 119 (84.4%) patients, et complet chez 100 (70.9%) patients. Les complexes QRS étaient fins chez 18 des 26 patients (69.2%) avec un BAV congénital, et 106 des 115 (92.2%) avec BAV de l'enfance (Figures 3-2 et 3-3).

Progression vers le BAV complet. Un BAV incomplet était diagnostiqué chez 41 patients (29.1%), représentant 30.7% des BAV congénitaux et 28.7% des BAV de l'enfance. Une progression du BAV incomplet vers un BAV complet permanent était observée chez 29 des 41 patients (70.7%), sur une période de 2.8 ± 3.4 ans (1–155 mois), mais il est probable que tous les patients porteurs d'un BAV incomplet n'aient pas été inclus dans cette étude.

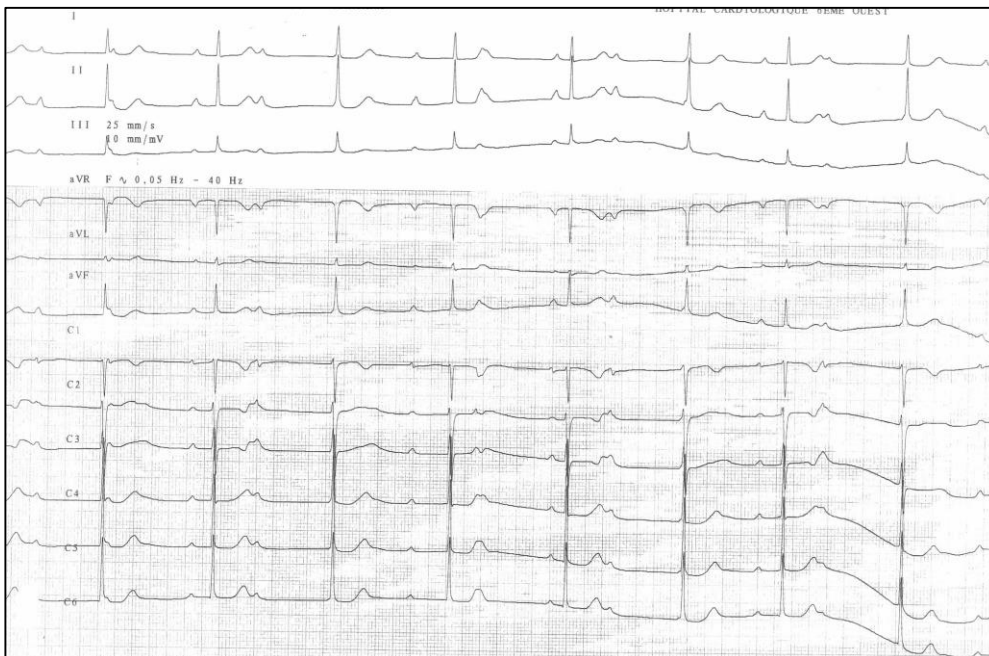
Pronostic à long terme. Un stimulateur cardiaque permanent était implanté chez 112 enfants (79.4%), au cours de la première année de vie chez 18 (16.1%) et avant l'âge de 10 ans chez 90 (80.4%). Le délai moyen entre le diagnostic du BAV et l'implantation du premier stimulateur cardiaque était de 2.6 ± 3.9 ans (0–300 mois). L'indication de stimulation était prophylactique chez 70 enfants (62.5%). Après un suivi moyen de 11.6 ± 6.7 ans (1–32 ans), aucun patient n'est décédé ou n'a développé de cardiomyopathie dilatée. Le suivi à long terme était libre de complication chez 127 enfants (90.1%).

Figure 3-2: Enregistrement Holter ECG chez un nourrisson de 3 mois



Ce tracé met en évidence un BAV complet à complexes QRS fins chez un nourrisson de 3 mois. Il n'y avait pas d'antécédent personnel ou familial cardiovasculaire notable et la sérologie lupique maternelle était négative. La constatation d'une bradycardie isolée au cours d'une consultation systématique a conduit au diagnostic. Il a été implanté immédiatement un stimulateur cardiaque épicaudique double chambre, à titre prophylactique (bradycardie < 50 bpm chez un enfant âgé de moins de un an).

Figure 3-3: Electrocardiogramme 12-dérivations chez un enfant de 5 ans



Ce tracé met en évidence un BAV complet à complexes QRS fins chez un jeune garçon de 5 ans asymptomatique. Le trouble de conduction a été diagnostiqué suite à la constatation d'une bradycardie lors d'une consultation chez le pédiatre pour un autre motif. Il n'y avait pas d'antécédent personnel ou familial cardiovasculaire notable et la sérologie lupique maternelle était négative. A l'âge de 11 ans, il a été implanté un stimulateur cardiaque endocavitare double chambre, à titre prophylactique (pauses RR prolongées supérieures à 3 secondes).

Characteristics and long-term outcome of non-immune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicentre study

Alban-Elouen Baruteau^{1,2,3,4,5,6*}, Swanny Fouchard¹, Albin Behaghel^{2,3,4,7},
Philippe Mabo^{2,3,4,7}, Elisabeth Villain^{6,8}, Jean-Benoit Thambo^{6,9}, François Marçon^{6,10},
Véronique Gournay^{6,11}, Francis Rouault^{6,12}, Alain Chantepie^{6,13},
Sophie Guillaumont^{6,14}, François Godart^{6,15}, Caroline Bonnet^{6,16}, Alain Fraisse^{6,17},
Jean-Marc Schleich^{2,3,4,6,7}, Jean-René Lusson^{6,18}, Yves Dulac^{6,19},
Christophe Leclercq^{2,3,4,7}, Jean-Claude Daubert^{2,3,4,7}, Jean-Jacques Schott¹,
Hervé Le Marec^{1,20}, and Vincent Probst^{1,20}

¹INSERM, U915, Institut du Thorax, Nantes F-44000, France; ²CHU Rennes, Cardiologie, F-35000, France; ³INSERM, CIC-IT 804, Rennes F-35000, France; ⁴INSERM, U642, Rennes F-35000, France; ⁵Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Cardiologie pédiatrique, F-92530, France; ⁶Société Française de Cardiologie, Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale, F-75000, France; ⁷Université de Rennes 1, LTSI, F-35000, France; ⁸AFHP, Hôpital Necker Enfants Malades, Cardiologie Pédiatrique, F-75000, France; ⁹CHU Bordeaux, Cardiologie Pédiatrique, F-33000, France; ¹⁰CHU Nancy, Cardiologie Pédiatrique, F-54000, France; ¹¹CHU Nantes, Cardiologie Pédiatrique, F-44000, France; ¹²Cabinet de Cardiologie Pédiatrique, Marseille F-13000, France; ¹³CHU Tours, Cardiologie Pédiatrique, F-18000, France; ¹⁴CHU Montpellier, Cardiologie Pédiatrique, F-34000, France; ¹⁵CHU Lille, Cardiologie Pédiatrique, F-59000, France; ¹⁶CHU Dijon, Cardiologie Pédiatrique, F-21000, France; ¹⁷CHU Marseille, Cardiologie Pédiatrique, F-13000, France; ¹⁸CHU Clermont-Ferrand, Cardiologie, F-63000, France; ¹⁹CHU Toulouse, Cardiologie Pédiatrique, F-31000, France; and ²⁰CHU Nantes, Cardiologie, Institut du Thorax, F-44000, France

Received 13 April 2011; revised 11 July 2011; accepted 15 August 2011; online publish-ahead-of-print 14 September 2011

| | |
|----------------------------|--|
| Aims | The natural history of congenital or childhood non-immune, isolated atrioventricular (AV) block is poorly defined. |
| Methods and results | We retrospectively studied 141 children with isolated, non-immune AV block diagnosed in utero, or up to 15 years of age, at 13 French medical centres, between 1980 and 2009. Patients with structural heart disease or maternal antibodies were excluded. Atrioventricular block was asymptomatic in 119 (84.4%) and complete in 100 (70.9%) patients. There was progression to complete AV block in 29/41 (70.7%) patients with incomplete AV block over 2.8+ 3.4 years (1–155 months), but all patients with incomplete AV block may not have been included in the study. Narrow QRS complex was present in 18 of 26 patients (69.2%) with congenital, and 106 of 115 (92.2%) with childhood AV block. Pacemakers were implanted in 112 children (79.4%), during the first year of life in 18 (16.1%) and before 10 years of age in 90 (80.4%). The mean interval between diagnosis of AV block and pacemaker implants was 2.6+ 3.9 years (0–300 months). The pacing indication was prophylactic in 70 children (62.5%). During a mean follow-up of 11.6+ 6.7 years (1–32 years), no patient died or developed dilated cardiomyopathy (DCM). The long-term follow-up was uncomplicated in 127 children (90.1%). |
| Conclusion | In this large multicentre study, the long-term outcome of congenital or childhood non-immune, isolated AV block was favourable, regardless of the patient's age at the time of diagnosis. No patient died or developed DCM, and pacemaker-related complications were few. |
| Keywords | Paediatric electrocardiology † Atrioventricular block † Pacemaker † Clinical outcome |

* Corresponding author: Département de Cardiologie et Maladies Vasculaires, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex 09, France. Tel: + 33 29 9282525, Fax: + 33 29 9282510, Email: alban.baruteau@chu-rennes.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2011. For permissions please email: journalspermissions@oup.com

Introduction

Congenital atrioventricular (AV) block is a rare disorder, associated with a risk of sudden death in the absence of cardiac pacing. The estimated prevalence of isolated AV block in structurally normal hearts is 1 per 15 000–20 000 live births.^{1,2} Auto-immune disease in the mother is the cause of 90–99% of all cases diagnosed before 6 months of age, due to the transplacental passage of maternal anti-Ro/SSA and/or anti-La/SSB auto-antibodies that enter the foetal circulation, trigger an inflammatory response and irreversible fibrosis of the cardiac conduction system, and downregulate cardiac L-type Calcium channels.^{3–5}

Very rarely, AV block of unknown origin appears during childhood, in the absence of maternal antibodies, structural heart disease, or other overt causes, such as trauma, metabolic abnormalities, or infection.⁶ While the characteristics of foetal and maternal antibody-associated AV block have been largely clarified, the clinical course of isolated, non-immune AV block diagnosed *in utero*, at birth, or during childhood remains obscure. This retrospective multicentre study examined the natural history and long-term outcomes associated with this form of AV block.

Methods

Definitions

Atrioventricular block was classified as *congenital* if it was diagnosed *in utero*, at birth, or during the first month of life, vs. *childhood AV block*, if diagnosed between the 1st month and the 15th year of life.⁷ Atrioventricular and intraventricular conduction disturbances were classified according to the age at the time of diagnosis using the definitions of recent international practice guidelines.^{8–10} Complete (third degree) AV block was defined as (i) regular RR intervals at a >1000 ms cycle length, (ii) regular PP intervals at a <1000 ms cycle length, and (iii) irregular PR intervals. Incomplete heart block included first degree AV block and type I or type II second degree AV block. QRS duration was classified according to age. QRS was classified as narrow when <80 ms in duration before 8 years, and <90 ms between 8 and 16 years of age. Dilated cardiomyopathy (DCM) was defined as a left ventricular (LV) end-diastolic diameter >97th percentile, associated with a <25% fractional shortening on two-dimensional transthoracic echocardiogram.

Study design

Children treated between 1980 and 2009 for incomplete or complete AV block at 13 French, tertiary hospitals were retrospectively included in this analysis. Patients born before 1980 were excluded from this study because of the major progress in prenatal diagnosis, neonatal management of AV block, and pacing technology, made during the study period. We also excluded the cases of (i) postoperative heart block; (ii) myocarditis, neuromuscular disorders, metabolic diseases, and congenital heart disease that were probable causes of AV block; (iii) heart block associated with pharmacotherapy that the mother or child were following that may have contributed to the conduction abnormalities; and (iv) patients with positive maternal anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies. Since (i) 9% of mothers who are sero-negative at the time of foetal diagnosis later become sero-positive,¹¹ and (ii) once they are detected, the antibodies remain permanently in the maternal serum,^{12,13} the mothers of all patients included in this study systematically underwent at the time of

inclusion, a screening for antibodies to soluble nuclear antigens 48 kDa SSB/La, 52 kDa SSA/Ro, and 60 kDa SSA/Ro, using previously described high-sensitivity, quantitative radioligand assays.¹⁴

The earliest documentation of a patient's conduction abnormality was used as the time of diagnosis of AV block. Children were included if presenting an isolated, non-immune AV block diagnosed *in utero*, or up to 15 years of age. The patients were identified using the diagnostic database of the French hospitals' national coding system. Specific and pertinent clinical data, collected by consulting each patient's medical records, included age at the time of, and symptoms associated with, the diagnosis of the conduction disturbance, type of heart block diagnosed, echocardiographic observations, age and type of heart block at time of first pacemaker implantation when applicable, pacing type and mode of pacing, and clinical status throughout the follow-up.

Standard 12-lead electrocardiograms (ECG) were recorded in all patients at both times of diagnosis and pacemaker implantation, or at last follow-up in non-paced patients. The ECG were analysed by two blinded investigators, and the heart rate, PR (not included in case of complete AV block), QRS, and QT interval durations were measured, using the DatInF[®] Measure dedicated software (Datinf GmbH, Tübingen, Germany). The QT interval was corrected for heart rate, using Bazett's formula.

The study was reviewed and approved by the appropriate institutional ethics committees, and all patients or legal guardians granted their informed consent to be included in the database.

Follow-up

All children underwent ≥ 2 ambulatory follow-up visits per year with a paediatric cardiologist, for surveillance of their clinical status, ECG, and echocardiogram. For the specific purpose of this study, data were collected by two investigators (A.E.B. and V.P.), who, at the end of follow-up (i) reviewed the medical records of all participants in the study, and (ii) contacted all patients or legal guardians by telephone, to ascertain the incidence of fatal and non-fatal disease-related adverse events.

Statistical analysis

Relevant variables were expressed either as counts and percentages or as mean value \pm standard deviation. To assess the variables independence, Chi-square and Fisher's exact tests were performed using the PASW[®] Statistics 18 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A two-sided *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 177 unrelated children fulfilled the study inclusion criteria. We subsequently excluded 36 patients because of (i) missing echocardiographic data at the time of diagnosis ($n = 6$), (ii) unknown maternal immune status ($n = 13$), and (iii) loss of follow-up ($n = 17$), leaving 141 patients (72 females) in the final analysis.

Age at diagnosis

The mean age at the time of diagnosis was 3.6 ± 4.2 years, ranging from *in utero* to 12 years. Congenital AV block was diagnosed in 26 (18.4%), and childhood AV block in 115 (81.6%) patients (Figure 1). Among patients with congenital AV block, 12 were diagnosed *in utero*, at a mean gestational age of 36.8 ± 2.1 weeks (20–39), and 14 were diagnosed at birth or in the neonatal period. Childhood AV block was diagnosed during the first year of life in 22

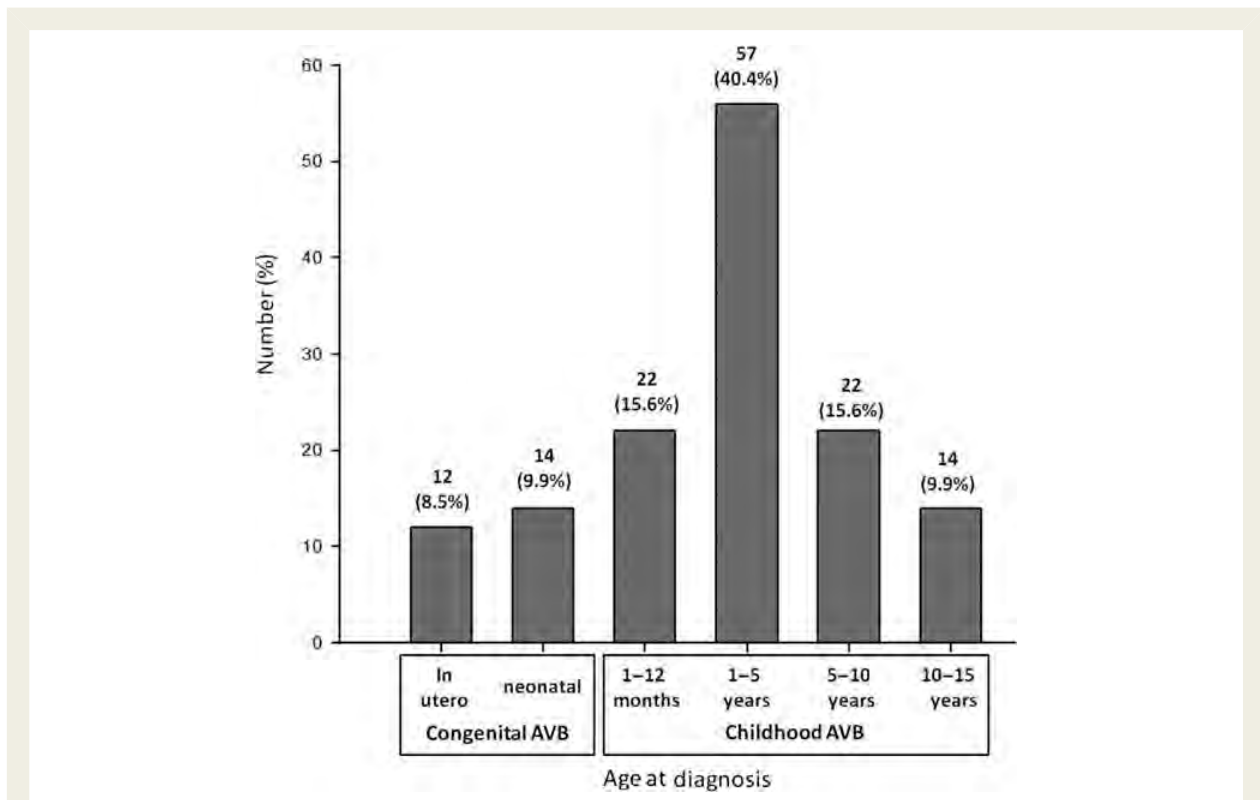


Figure 1 Age at time of diagnosis of heart block. In 105 patients (74.5%) the diagnosis was made before 5 years of age. AVB, atrioventricular block.

(15.6%), between 1 and 5 years of age in 57 (40.4%), between 5 and 10 years of age in 22 (15.6%), and between 10 and 15 years of age in 14 (9.9%) children. The diagnosis was made before 5 years of age in 105 cases (74.5%).

Clinical presentation at the time of diagnosis

Atrioventricular block was detected by disease manifestations in only 22 children (15.6%), including syncope in 10 (7%), fatigue in 6 (4.3%), and heart failure in 6 (4.3%), 4 of whom were neonates. Atrioventricular block was asymptomatic in 119 patients (84.4%), and was diagnosed after the detection of bradycardia in 72 (51.0%), heart murmur in 24 (17.0%), or both in 22 (15.7%) patients. In one asymptomatic child who had a family history of AV block, the diagnosis was made by screening.

Conduction disturbances at the time of diagnosis

Complete AV block was present on the ECG of 100 patients (70.9%), including 18 children with congenital (69.2%) and 82 with childhood (71.3%) AV block (Figure 2). In four patients, paroxysmal, complete AV block progressed to permanent, complete AV block within a mean of 38.2 ± 44.9 months (1–102). Incomplete AV block was diagnosed in 41 patients (29.1%), including 8 patients

with congenital (30.7%) and 33 patients with childhood (28.7%) AV block, ranging from first degree AV block in 4 (2.8%), to type I second degree AV block in 10 (7.1%), to type II second degree AV block in 27 patients (19.2%). Incomplete (first or second degree) AV block progressed to permanent, complete AV block within a mean of 2.8 ± 3.4 years (1–155 months) in 29 of 41 (70.7%) patients (Figure 3), but all patients with incomplete AV block may not have been included in the study.

Three of the four children with first degree AV block (mean PR duration: 236.5 ± 40.7 ms, from 210 to 296 ms) also had intraventricular conduction disturbances with two complete right bundle branch block (RBBB) and one complete left bundle branch block (LBBB). The fourth one had narrow QRS complex. The one presenting with complete LBBB was congenital, diagnosed at the fifth day of life, because of bradycardia, and rapidly progressed to complete AV block, leading to neonatal permanent pacemaker implantation. The three others were childhood AV blocks, diagnosed at 2, 7, and 15 years of age. Although one evolved to type I second degree AV block, none of them required cardiac pacing with a mean follow-up of 5.0 ± 1.7 years.

The prevalence of narrow QRS complex was significantly higher ($P = 0.043$) in the presence of complete AV block and escape rhythm (92 children, 92%) than in the presence of incomplete AV block and conducted QRS complex (32 children, 78.0%). The prevalence of narrow QRS complex was also significantly higher

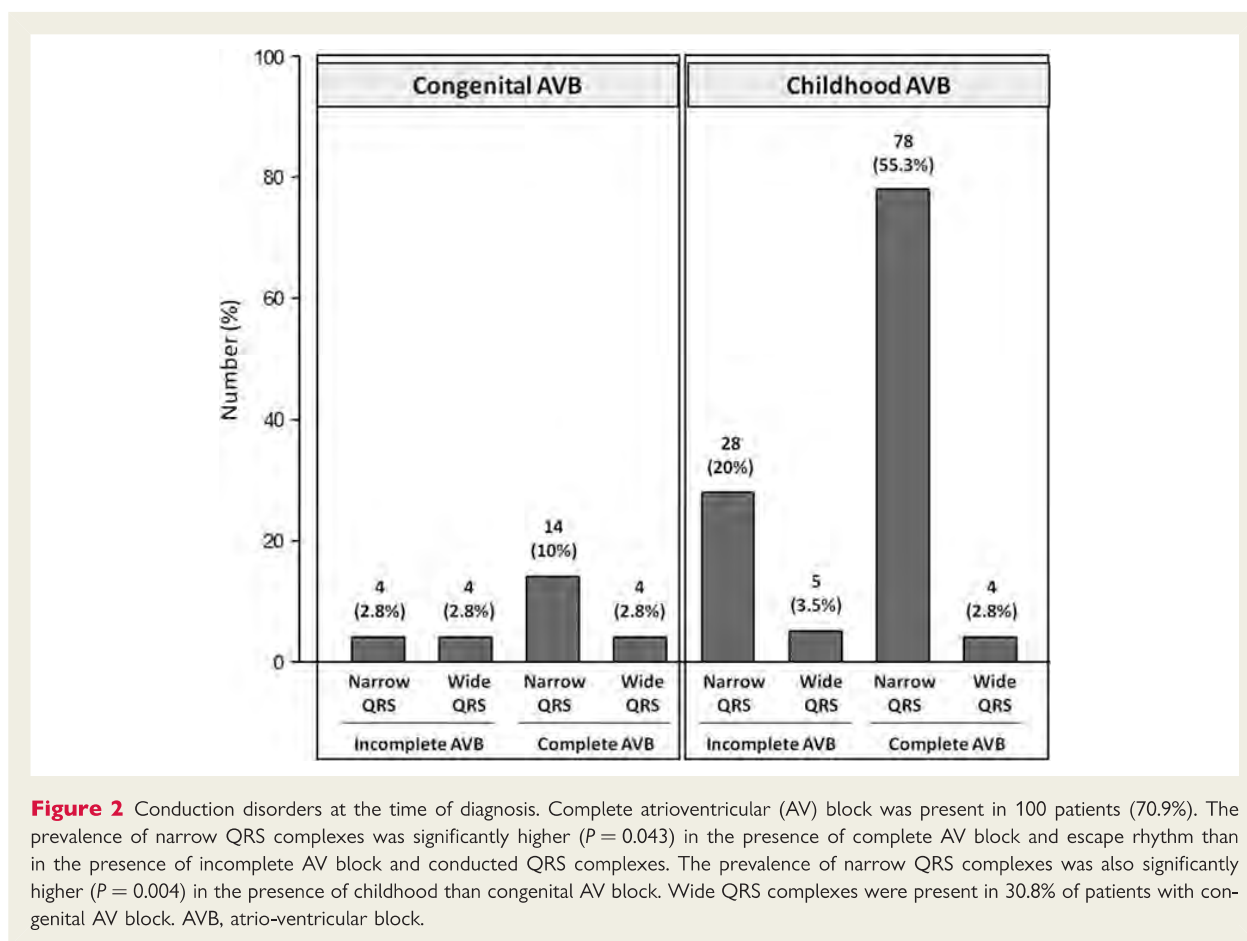


Figure 2 Conduction disorders at the time of diagnosis. Complete atrioventricular (AV) block was present in 100 patients (70.9%). The prevalence of narrow QRS complexes was significantly higher ($P = 0.043$) in the presence of complete AV block and escape rhythm than in the presence of incomplete AV block and conducted QRS complexes. The prevalence of narrow QRS complexes was also significantly higher ($P = 0.004$) in the presence of childhood than congenital AV block. Wide QRS complexes were present in 30.8% of patients with congenital AV block. AVB, atrio-ventricular block.

($P = 0.004$) in the presence of childhood (106 children, 92.2%) than congenital (18 children, 69.2%) AV block. In the 17 patients whose QRS complex was wide, the intraventricular conduction morphology was complete LBBB in 6, left posterior fascicular block in 5 with extreme right axis deviation, complete RBBB in 5, while left alternating with RBBB was observed in 1 infant. At last follow-up of three non-paced children, complete AV block had spontaneously regressed to normal AV conduction in one, and to type I second degree AV block in two patients. No relationship was found between degree of AV block and gender or age at diagnosis, and the evolution of AV block was not related to age at the time of diagnosis or at the time of pacing system implantation. The mean ECG intervals measured at the time of diagnosis and pacemaker implantation are shown in Table 1.

Age at implantation of the first pacemaker

After a mean follow-up of 11.7 ± 0.6 years, 112 patients (79.4%) had received a permanent pacemaker, implanted during the first year of life in 18 (16.1%), and before 10 years of age in 90 (80.4%) children (Figure 4). The mean age at pacemaker implant was 32.0 ± 69.8 months in case of congenital AV block and was 80.3 ± 57.2 in case of childhood AV block. One patient, who

was under surveillance for complete AV block since the 22nd week of gestation and presented with *hydrops fetalis* at 37 weeks, was delivered by caesarean section and underwent permanent cardiac pacing, beginning in the perinatal period. Permanent epicardial pacing beginning at birth or in the neonatal period was required in four additional infants, who presented with heart failure due to profound bradycardia (mean heart rate at birth 63.0 ± 9.9 ms).

The mean time interval between diagnosis of congenital AV block and device implantation was 31.8 ± 69.9 months (0–300 months), and 30 ± 39.2 months (0–155 months) between diagnosis of childhood AV block and onset of permanent pacing (Figure 5). One hundred and nine children were implanted with a delay of more than 6 months between the diagnosis of AV block and the implantation. In these children, the indication of pacemaker implantation was prophylactic in 66 cases (60%).

Types of conduction disturbances at the time of pacemaker implantation

The ECG recorded at the time of pacemaker implantation revealed the presence of complete AV block with narrow QRS complex in 95 of the 112 paced patients (84.8%), including 13 of 26 presenting with congenital (50.0%), and 81 of 115

presenting with childhood (70.4%) AV block. Complete AV block with a wide QRS complex was observed in 8 (30.8%) patients presenting with congenital AV block and 9 (7.8%) presenting with childhood AV block. At the time of pacemaker implantation, type II 2nd degree AV block with narrow QRS complex was recorded in a single patient (0.9%) presenting with childhood AV block.

Indications, type, and mode of cardiac pacing

Permanent pacemakers were implanted for symptomatic bradycardia in 42 children (37.5%). Bradycardia-related manifestations included asthenia in 37 (33.3%), exercise-induced dyspnoea in 21 (19.0%), syncope in 16 (14.3%), and chest pain in 5 (4.8%) patients.

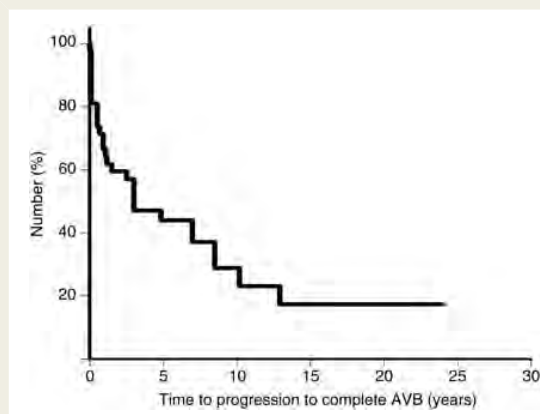


Figure 3 Risk of progression of incomplete atrioventricular (AV) block to complete AV block. Incomplete progressed to complete AV block in nearly 70% of children, over a mean of 2.8 years (range 1 month to 13 years).

In 70 permanently paced children (61.6%), the indications were prophylactic, including a mean daytime heart rate <50 b.p.m. in 49 (43.7%) children >1 year of age, ventricular pauses longer than 3 RR intervals in 39 (34.8%) children, a heart rate <50 b.p.m. in 13 (11.6%) infants, a prolonged corrected QT interval in 4 (3.6%) children, and an escape rhythm with wide QRS complex in 3 (2.7%) children. The pacing indications were not related to age at diagnosis. A significantly greater proportion of males (39 children, 55.7%) than females (31 children, 44.3%) were paced for prophylactic indications ($P = 0.02$).

Among 18 infants who were permanently paced before 1 year of age, epicardial leads were implanted in 15, with a single chamber device in 10 and a dual chamber device in 5. A single infant received a dual chamber device with endocardial leads and two other infants were implanted transvenously with a single chamber device. Among 72 children between the ages of 1 and 10 years, 25 (34.7%) received epicardial and 47 (65.3%) received endocardial leads. Single chamber devices were implanted in 47 (65.3%), and dual chamber pacemaker in 25 (34.7%) children. Among 51 children >10 years of age, 51 (100%) received endocardial leads and 46 (91%) received a dual chamber pacing system.

We divided the study in three period of time. Before 1990, between 1990 and 2000 and after 2000. During the first period 12 children were implanted, the indication for implantation was prophylactic in 10 cases (83%). During the second period 26 children were implanted, the indication for implantation was prophylactic in 15 cases (56%). During the last period 74 children were implanted, the indication for implantation was prophylactic in 45 cases (60%). Even if the indication seems stable over time, the mode of implantation changed as, in the first period, all the children except one were implanted using epicardial leads, in the second period 19 children were implanted using endocardial leads (73%), and finally, in the last period 51 children (69%) were implanted using endocardial leads. On the contrary, during the three period of time, the number of children paced with a

Table 1 Heart rate and electrocardiographic measurements at the times of diagnosis and pacemaker implantation

| | Time of measurement | | | | | |
|--------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | At diagnosis | | | At pacemaker implantation | | |
| | Foetuses (n = 12) | Neonates (n = 14) | Children (n = 115) | Foetuses (n = 10) | Neonates (n = 11) | Children (n = 91) |
| Heart rate, b.p.m. | 57.0 ± 17.0 | 56.0 ± 17.0 | 54.0 ± 14.0 | 45.7 ± 17.0 | 47.6 ± 14.4 | 46.4 ± 14.4 |
| ECG intervals, ms | | | | | | |
| PR | Not applicable ^a | 218.0 ± 59.6 | 270.0 ± 69.0 | Not applicable ^a | Not applicable ^a | 140.0 ± 1.0 |
| Conducted QRS | Not applicable ^a | 160.0 ± 1.0 | 91.0 ± 32.7 | Not applicable ^a | Not applicable ^a | 180.0 ± 1.0 |
| Escape rhythm QRS | 84.0 ± 30.0 | 97.0 ± 31.0 | 69.0 ± 13.0 | 80.0 ± 31.2 | 82.3 ± 34.0 | 82.0 ± 32.7 |
| Corrected QT | 432.0 ± 74.0 | 425.0 ± 75.0 | 424.0 ± 44.0 | 419.0 ± 89.3 | 448.0 ± 79.6 | 425.3 ± 64.4 |

Values are means ± SD.

^aComplete AV block.

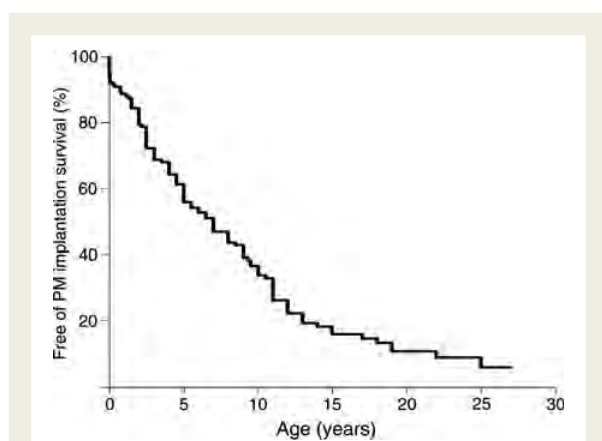


Figure 4 Actuarial survival free from pacemaker implantation during long-term follow-up. After a mean follow-up of 11.7 ± 0.6 years, 79.4% of the patients had received a permanent pacemaker, implanted in the first year of life in 16.1% and before 10 years of age in 80.4% of children.

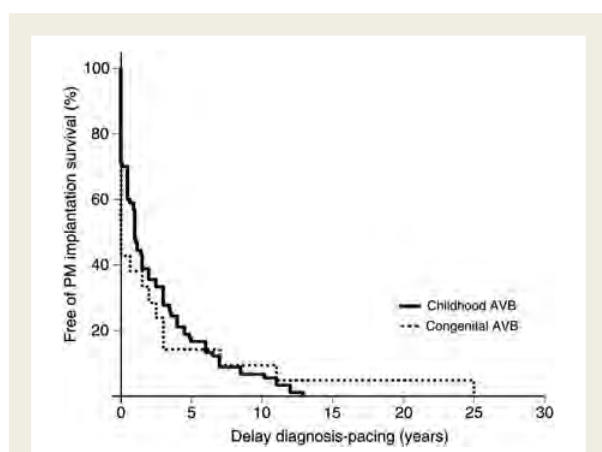


Figure 5 Time interval between diagnosis and pacemaker implantation. The mean time interval between diagnosis and pacemaker implantation was 31.8 ± 69.9 months (0–300 months) in congenital atrioventricular (AV) block, and 30 ± 39.2 months (0–155 months) in childhood AV block. This difference is not statistically significant.

double chamber pace maker was stable (42, 46, and 45% in the first, second, and last period of time).

Clinical outcomes

The follow-up was >5 years in 121 (85.8%), >10 years in 84 (59.6%), and >15 years in 49 (34.8%) children. After a mean follow-up of the entire study population of 11.6 ± 6.7 years (range 1–32), no patient had died or developed DCM, and 127 (90.1%) had remained free from AV block-related complication at the last visit. The 100% long-term survival of the 12

patients presenting with sero-negative, isolated foetal AV block, of whom 2 (16.6%) were not paced at last follow-up, is particularly noteworthy. Dilated cardiomyopathy with severe, symptomatic LV systolic dysfunction developed 1 year after the onset of permanent right ventricular apical pacing in a 9-year-old child who presented with childhood complete AV block. Cardiac magnetic resonance imaging showed suggested viral myocarditis. Spontaneous and complete normalization of the LV dimensions and systolic function within 6 months, and normal ECG and general health at 20 months of follow-up, made pacing-induced cardiomyopathy much less likely. Pacemaker-related complications occurred in 13 children (9.2%), ranged in major ones in 7 (4.9%) with pacemaker lead endocarditis in 2, lead rupture in 3, lead dysfunction in 2, and in minor ones in 6 (4.3%) with diaphragmatic or pectoral stimulation in 4, self-limited pericardial effusion in 1, and device dislodgment in 1 patient.

Discussion

While several studies have examined the outcome of foetal and antibody-associated complete AV block, the natural history of paediatric idiopathic AV block is poorly known. Our study is the largest one of isolated non-immune AV block, congenital in 26 patients, and diagnosed later in childhood in 115 patients. Our main observation was a highly favourable long-term prognosis, whatever the age of the patient at the time of diagnosis.

Long-term outcomes

None of the 141 children died or developed irreversible LV dysfunction due to DCM. Isolated, congenital AV block is associated with a high prevalence of maternal antibodies and high mortality, particularly when occurring during gestation.¹⁵ In 29 foetal AV blocks reported by Jaeggi *et al.*,³ 90% was immune-mediated and associated with a 43% long-term mortality. The prognosis of childhood AV block, immune-mediated in $\sim 5\%$ of cases, is better.^{3,16} In our study, the long-term prognosis of paediatric isolated, non-immune AV block was favourable, with permanent pacing implemented as recommended in published, professional practice guidelines.^{17–20} The long-term outcome was not dependent on age, degree of heart block, or on the presence vs. absence of symptoms at the time of diagnosis. The clinical presentation and long-term prognosis of the 26 patients with congenital isolated AV block, vs. the 115 patients diagnosed later in life with isolated childhood AV block, in the absence of maternal antibodies, were similar. Our observations suggest that the prognosis is closely related to the maternal immune status, since the long-term prognosis of children with non-immune disease was favourable, including when it was diagnosed during foetal life.

Progression to complete atrioventricular block

We have previously described that incomplete sero-negative isolated heart block evolve more frequently than the immune ones.¹⁶ Here, in our 42 children whose AV block was incomplete at the time of diagnosis, 70% progressed to complete AV block

over a mean of <3 years, regardless of their age at the time of diagnosis. This progression suggests (i) the existence of a post-natal degenerative disorder of the specialized conduction system, and (ii) the need to closely follow the ECG of children presenting with isolated, incomplete AV block.

Paediatric cardiac pacing

The incidence of pacemaker implantation in our cohort is high (79%). These results are in line with the previous publication in this field with an incidence of pacemaker implantation varying from 95 to 66%.^{3,16} We observed a surprisingly low rate of pacemaker-related complications, compared with earlier publications.^{3,21} Over a mean follow-up of nearly 12 years, <10% of children suffered an even minor pacemaker-related complication. Our study was retrospective and conducted at multiple medical centres, increasing the likelihood of underestimating the rate of adverse events, despite the exclusion of children with missing follow-up data. However, these observations are consistent with the 3.3% rate of major pacemaker-related complications in children reported by Welisch et al.²² in their institution, and with other long-term follow-up paediatric pacing experiences.²³ As a result of technological progress and growing experience in the young, paediatric permanent cardiac pacing was safe and effective.

Nearly two-third of the permanent pacemakers were implanted for prophylactic indications. Michaelsson et al.²⁴ had reported a high incidence of unpredictable Stokes–Adams attacks due to isolated congenital AV block, and a high mortality associated with the first attack. In our study, prophylactic pacing, as currently recommended,^{17,19} is associated with strong reduction in the morbidity and mortality due to Stokes–Adams attacks.

Non-immune, isolated atrioventricular block and risk of dilated cardiomyopathy

Dilated cardiomyopathy is one of the major complications of congenital and antibody-associated AV block, associated with a high mortality,^{16,25–29} though no patient in our study developed irreversible DCM. Several trials and studies^{29–33} in patients paced for complete AV block have observed an association between (i) long-term RV apical pacing and (ii) ventricular remodelling and prognosis. Dysynchronous electro-mechanical activation induced by apical pacing and the reversal of DCM after upgrade of the system to biventricular stimulation support the hypothesis of detrimental effects of RV apical pacing on LV function. However, patients paced at the RV apex do not all develop DCM, suggesting the existence of an individual susceptibility to the detrimental effects of RV apical pacing.³⁴ Kim et al. reported a 92% rate of cumulative dysfunction free survival at 20 years follow-up in a series of 63 children. Furthermore, in children with normal cardiac anatomy, pacing-induced dyssynchrony may be observed in the absence of degradation of right ventricular systolic function.

Dilated cardiomyopathy has been described before pacemaker implantation in children with antibody-associated complete AV block and some authors have proposed that, in seropositive AV block, DCM may be due to myocardial injury caused by an inflammatory process, which may progress or be reactivated.^{16,35,36}

In our study, no child developed DCM, regardless of the diagnostic age and despite a long follow-up and a high prevalence of permanent right ventricular apical pacing. Our results are concordant with those of the recent study by Sagar et al.³⁷ in adults, suggesting that long-term RV apical pacing alone does not appear to be associated with development of LV systolic dysfunction and heart failure in non-immune isolated AV block.

While developing DCM is unlikely to occur in isolated non-immune AV block, we recommend close echocardiographic monitoring, including of patients presenting with seronegative complete AV block.

Limitations

The 29 years of data collected for this study represents a limitation, since clinical practice has evolved, and considerable progress has been made in prenatal diagnosis and early cardiac pacing. In addition, since the review of medical records was not exhaustive at all hospitals, the prevalence of this type of AV block may have been underestimated. Incomplete AV blocks and especially lower degrees such as first-degree AV block were underreported in the database, and those who underwent pacemaker placement were more likely to be included in the database, constituting a bias in inclusion. The retrospective data collection at multiple medical centres may also have underestimated the incidence of adverse events during follow-up. Data on siblings or second children were not available.

Conclusions

The long-term outcome of non-immune, isolated AV block appears favourable in our era of paediatric cardiac pacing, with no death and no DCM observed in our study, regardless of the patient's age at the time of diagnosis. Nearly 70% of the patients with incomplete AV block progressed to a complete one, suggesting a postnatal degenerative process of the specialized conduction tissue. Further studies are needed to determine (i) the aetiology and pathogenic mechanisms of the disorder, and (ii) its long-term evolution in adulthood.

Funding

This study was supported in part by grants from 1) "Protocole Hospitalier de Recherche Clinique" 2001 R20/03 and 2004 R20/07 from the University Medical Center of Nantes, France, 2) the 2009 Philippe Coumel Research Grant from the French Society of Cardiology, 3) grant no 05 CVD 01 (Preventing Sudden Death) from the Foundation Leducq Trans-Atlantic Network of Excellence, and 4) "Agence Nationale de la Recherche" grant 05-MRAR-028.

Conflict of interest: none declared.

References

1. Michaelsson M, Engle MA. Congenital complete heart block: an international study of the natural history. *Cardiovasc Clin* 1972;**4**:85–101.
2. Michaelsson M, Riesenfeld T, Jonzon A. Natural history of congenital complete atrioventricular block. *Pacing Clin Electrophysiol* 1997;**20**:2098–2101.
3. Jaeggi ET, Hamilton RM, Silverman ED, Zamora SA, Hornberger LK. Outcome of children with fetal, neonatal or childhood diagnosis of isolated congenital atrioventricular block. A single institution's experience of 30 years. *J Am Coll Cardiol* 2002;**39**:130–137.

4. Chameides L, Truex RC, Vetter V, Rashkind WJ, Galiofo FM Jr, Noonan JA. Association of maternal systemic lupus erythematosus with congenital complete heart block. *N Engl J Med* 1977;**297**:1204–1207.
5. Taylor PV, Scott JS, Gerlis LM, Esscher E, Scott O. Maternal antibodies against fetal cardiac antigens in congenital complete heart block. *N Engl J Med* 1986;**315**:667–672.
6. Lupoglazoff JM, Denjoy I, Villain E, Fressart V, Simon F, Bozio A, Berthet M, Benammar N, Hainque B, Guicheney P. Long QT syndrome in neonates: conduction disorders associated with HERG mutations and sinus bradycardia with KCNQ1 mutations. *J Am Coll Cardiol* 2004;**43**:826–830.
7. Brucato A, Jonzon A, Friedman D, Allan LD, Vignati G, Gasparini M, Stein JJ, Montella S, Michaelsson M, Buyon J. Proposal for a new definition of congenital complete atrioventricular block. *Lupus* 2003;**12**:427–435.
8. Mark DB, Anstrom KJ, Sun JL, Clapp-Channing NE, Tsiatis AA, Davidson-Ray L, Lee KL, Bardy GH. Quality of life with defibrillator therapy or amiodarone in heart failure. *N Engl J Med* 2008;**359**:999–1008.
9. Schwartz PJ, Garson A Jr, Paul T, Stramba-Badiale M, Vetter VL, Wren C. Guidelines for the interpretation of the neonatal electrocardiogram. A task force of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2002;**23**:1329–1344.
10. Surawicz B, Childers R, Deal BJ, Gettes LS, Bailey JJ, Gorgels A, Hancock EW, Josephson M, Kligfield P, Kors JA, Macfarlane P, Mason JW, Mirvis DM, Okin P, Pahlm O, Rautaharju PM, van Herpen G, Wagner GS, Wellens H. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part III: intraventricular conduction disturbances: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society; endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *Circulation* 2009;**119**:e235–e240.
11. Lopes LM, Tavares GM, Damiano AP, Lopes MA, Aiello VD, Schultz R, Zugaib M. Perinatal outcome of fetal atrioventricular block: one-hundred-sixteen cases from a single institution. *Circulation* 2008;**118**:1268–1275.
12. Derksen RH, Meilof JF. Anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoantibody levels in relation to systemic lupus erythematosus disease activity and congenital heart block. A longitudinal study comprising two consecutive pregnancies in a patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;**35**:953–959.
13. Tseng CE, Di Donato F, Buyon JP. Stability of immunoblot profile of anti-SSA/Ro-SSB/La antibodies over time in mothers whose children have neonatal lupus. *Lupus* 1996;**5**:212–215.
14. Yamamoto AM, Amoura Z, Johannet C, Jeronimo AL, Campos H, Koutouzov S, Piette JC, Bach JF. Quantitative radioligand assays using de novo-synthesized recombinant autoantigens in connective tissue diseases: new tools to approach the pathogenic significance of anti-RNP antibodies in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2000;**43**:689–698.
15. Machado MV, Tynan MJ, Curry PV, Allan LD. Fetal complete heart block. *Br Heart J* 1988;**60**:512–515.
16. Villain E, Coatsedoat-Chalumeau N, Marijon E, Boudjemline Y, Piette JC, Bonnet D. Presentation and prognosis of complete atrioventricular block in childhood, according to maternal antibody status. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:1682–1687.
17. Sacher F, Sobieszczyk P, Tedrow U, Eisenhauer AC, Field ME, Selwyn A, Raymond JM, Koplán B, Epstein LM, Stevenson WG. Transcatheter ethanol ventricular tachycardia ablation in the modern electrophysiology era. *Heart Rhythm* 2008;**5**:62–68.
18. Gregoratos G, Abrams J, Epstein AE, Freedman RA, Hayes DL, Hlatky MA, Kerber RE, Naccarelli GV, Schoenfeld MH, Silka MJ, Winters SL. ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices—summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/NASPE Committee to Update the 1998 Pacemaker Guidelines). *J Am Coll Cardiol* 2002;**40**:1703–1719.
19. Vardas PE, Auricchio A, Blanc JJ, Daubert JC, Drexler H, Ector H, Gasparini M, Linde C, Morgado FB, Oto A, Sutton R, Trusz-Gluz M. Guidelines for cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy: The Task Force for Cardiac Pacing and Cardiac Resynchronization Therapy of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2007;**28**:2256–2295.
20. Villain E. Indications for pacing in patients with congenital heart disease. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008;**31**(Suppl. 1):S17–S20.
21. Balmer C, Fasnacht M, Rahn M, Molinari L, Bauersfeld U. Long-term follow up of children with congenital complete atrioventricular block and the impact of pacemaker therapy. *Europace* 2002;**4**:345–349.
22. Welisch E, Cherlet E, Crespo-Martinez E, Hansky B. A single institution experience with pacemaker implantation in a pediatric population over 25 years. *Pacing Clin Electrophysiol* 2010;**33**:1112–1118.
23. Stojanov PL, Savic DV, Zivkovic MB, Calovic ZR. Permanent endovenous pediatric pacing: absence of lead failure—20 years follow-up study. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008;**31**:1100–1107.
24. Michaelsson M, Jonzon A, Riesenfeld T. Isolated congenital complete atrioventricular block in adult life. A prospective study. *Circulation* 1995;**92**:442–449.
25. Breur JM, Kapusta L, Stoutenbeek P, Visser GH, van den Berg P, Meijboom EJ. Isolated congenital atrioventricular block diagnosed in utero: natural history and outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;**21**:469–476.
26. Kurosaki K, Miyazaki A, Watanabe K, Echigo S. Long-term outcome of isolated congenital complete atrioventricular block pacing since neonatal period: experience at a single Japanese institution. *Circ J* 2008;**72**:81–87.
27. Maeno Y, Himeno W, Saito A, Hiraishi S, Hirose O, Ikuma M, Inamura N, Kawataki M, Mizukami A, Ota M, Shiraishi H, Satomi G, Kato H. Clinical course of fetal congenital atrioventricular block in the Japanese population: a multicentre experience. *Heart* 2005;**91**:1075–1079.
28. Eronen M, Siren MK, Ekblad H, Tikanoja T, Julkunen H, Paavilainen T. Short- and long-term outcome of children with congenital complete heart block diagnosed in utero or as a newborn. *Pediatrics* 2000;**106**:86–91.
29. Thambo JB, Bordachar P, Garrigue S, Lafitte S, Sanders P, Reuter S, Girardot R, Crepin D, Reant P, Roudaut R, Jais P, Haissaguerre M, Clementy J, Jimenez M. Detrimental ventricular remodeling in patients with congenital complete heart block and chronic right ventricular apical pacing. *Circulation* 2004;**110**:3766–3772.
30. Chen CA, Wang JK, Lin MT, Lu CV, Wu KL, Chiu SN, Chiu HH, Wu ET, Lue HC, Wu MH. Dilated cardiomyopathy after long-term right ventricular apical pacing in children with complete atrioventricular block: role of setting of ventricular pacing. *J Card Fail* 2009;**15**:681–688.
31. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 1998;**281**:108–111.
32. Beaufort-Krol GC, Schasfoort-van Leeuwen MJ, Stienstra Y, Bink-Boelkens MT. Longitudinal echocardiographic follow-up in children with congenital complete atrioventricular block. *Pacing Clin Electrophysiol* 2007;**30**:1339–1343.
33. Verma AJ, Lemler MS, Zeltser J, Scott WA. Relation of right ventricular pacing site to left ventricular mechanical synchrony. *Am J Cardiol* 2010;**106**:806–809.
34. Sweeney MO, Hellkamp AS. Heart failure during cardiac pacing. *Circulation* 2006;**113**:2082–2088.
35. Nield LE, Silverman ED, Smallhorn JF, Taylor GP, Mullen JB, Benson LN, Hornberger LK. Endocardial fibroelastosis associated with maternal anti-Ro and anti-La antibodies in the absence of atrioventricular block. *J Am Coll Cardiol* 2002;**40**:796–802.
36. Marijon E, Villain E. Right ventricular pacing and left ventricular dysfunction in congenital atrioventricular block. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008;**31**:391.
37. Sagar S, Shen WK, Asirvatham SJ, Cha YM, Espinosa RE, Friedman PA, Hodge DO, Munger TM, Porter CB, Rea RF, Hayes DL, Jahangir A. Effect of long-term right ventricular pacing in young adults with structurally normal heart. *Circulation* 2010;**121**:1698–1705.

III- Etude #2: DÉPISTAGE PARENTAL ET ESTIMATION DE L'HÉRITABILITÉ

III.1- Problématique

Notre travail précédent (Etude #1) a mis en évidence, dans une cohorte multicentrique de 141 enfants porteurs d'un BAV considéré comme "idiopathique", que ce trouble de conduction était d'aggravation progressive, suggérant l'existence d'un processus de dégénérescence postnatale des voies de conduction [Baruteau *et al*, 2012].

Par ailleurs, une contribution génétique était suggérée de longue date par la publication de foyers familiaux de troubles de conduction dégénératifs comprenant quelques rares cas pédiatriques [Gazes *et al*, 1965; Lynch *et al*, 1973; Brink *et al*, 1977]. L'étude des arbres généalogiques de ces familles suggèrait une transmission héréditaire de type autosomique dominante à pénétrance incomplète et expressivité variable. Certains gènes – tels que *SCN5A*, *SCN1B* et *TRPM4* – ont depuis été décrits comme responsables de formes familiales de troubles de conduction dégénératifs héréditaires [Schott *et al*, 1999; Watanabe *et al*, 2008; Kruse *et al*, 2009] et il a été montré que plusieurs variants communs modulent la fréquence cardiaque, la durée de l'intervalle PR et la durée du complexe QRS [Holm *et al*, 2010; Pfeufer *et al*, 2010; Sotoodehnia *et al*, 2010].

III.2- Objectif

Nous avons formulé l'hypothèse que la dégénérescence progressive de la conduction cardiaque que nous avons mis en évidence dans le BAV "idiopathique" de l'enfant soit génétiquement déterminée, et que le BAV isolé et non-immun, lorsqu'il est diagnostiqué *in utero* ou au cours de l'enfance, soit une pathologie héréditaire. Notre objectif était de tester cette hypothèse dans notre cohorte de propositus porteurs d'un BAV "idiopathique", en recherchant des arguments cliniques forts pour une origine génétique et en estimant l'héritabilité du trouble de conduction dans cette population.

III.3- Méthodologie

Caractéristiques de l'étude. Nous avons mis en place un projet de recherche transversale, visant à tester l'hypothèse d'une origine génétique dans le BAV isolé et non-immun en pédiatrie. Cette étude #2 s'est inscrite dans la continuité directe de l'étude #1, à partir de notre cohorte de 141 enfants porteurs d'un BAV "idiopathique" colligée dans treize centres de cardiologie pédiatrique français (Figure 2-1).

Le volet clinique de ce travail a permis de documenter l'histoire familiale des propositus porteurs d'un BAV "idiopathique", d'analyser les résultats du dépistage électrocardiographique de 130 parents comparés à une population de 130 sujets sains contrôles appariés sur l'âge et le genre, et

de calculer l'héritabilité du trouble de conduction à partir de l'analyse de 57 trios familiaux (chaque trio étant constitué d'un enfant atteint et de ses deux parents).

Le volet fondamental de ce projet a permis la constitution d'une banque d'ADN sur le phénotype d'intérêt et une première approche de biologie moléculaire par séquençage direct de certains gènes candidats. Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de Jean-Jacques Schott à l'institut du thorax (équipe 3: Génétique des maladies cardiovasculaires héréditaires), INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291 à l'Université de Nantes. Cette étude a été agréée par le bureau de la Filiale de cardiologie pédiatrique et congénitale de la Société Française de Cardiologie. Les caractéristiques de l'étude #2 sont résumées dans le Tableau 3-2.

Recueil des données cliniques. Le cahier d'observation a été rédigé avec une attention particulière concernant les données relatives à l'histoire familiale (antécédents familiaux de mort subite, de mort subite inexpliquée du nourrisson, de syncope, d'implantation d'un stimulateur cardiaque). Nous avons contacté tous les parents des 141 propositus porteurs d'un BAV "idiopathique" (Etude #1) pour leur expliquer notre hypothèse de travail et leur proposer de réaliser un électrocardiogramme 12-dérivations de dépistage et un prélèvement sanguin à des fins de recherche génétique.

Parallèlement des sujets sains contrôles issus de la population générale ont été sélectionnés dans la base de données de l'institut du thorax pour être appariés sur l'âge et le genre aux parents qui avaient accepté de participer à cette étude. Il s'agissait d'apparentés de propositus porteurs de varices ou d'un syndrome du QT long congénital, pour lesquels le statut de sujets sains était certain, et pour lesquels un ECG 12-dérivations était disponible. L'appariement de ces sujets contrôles avec les parents inclus dans notre étude a été réalisé par Béatrice Guyomarc'h.

Tableau 3-2: Caractéristiques de l'étude #2

| | |
|----------------------------------|---|
| Etude #2 | Dépistage parental et estimation de l'héritabilité du BAV isolé non-immun diagnostiqué <i>in utero</i> et au cours de l'enfance |
| Institution coordinatrice | L'institut du thorax, INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291 Université de Nantes, Nantes, France |
| Investigateur principal | Dr. Alban-Elouen Baruteau |
| Comité scientifique | Dr. Jean-Jacques Schott, Pr. Vincent Probst |
| Attachée de recherche | Swanny Fouchard |
| Statisticiens | Béatrice Guyomarc'h, Christian Dina |
| Schéma de l'étude | Projet de recherche transversal 1- Etude clinique: antécédents familiaux; dépistage parental ECG; calcul de l'héritabilité (inclusion multicentrique) 2- Etude fondamentale: constitution d'une banque d'ADN (propositus et leurs parents) au sein de la Biocollection de l'Université de Nantes; premières approches gène-candidat. |
| Comité d'Ethique | CPPRB n°2 Région Pays de la Loire, 2008 |
| Agrément | Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale, SFC |
| Financement | Bourse de recherche Philippe Coumel 2009, SFC Leducq Foundation – Transatlantic Network of Excellence, grant n°05 CVD 01 Fondation pour la Recherche Médicale, "Aging and Cardiac Conduction: Genetics and Pathophysiology of Progressive Conduction Defects" |
| Co-Investigateurs | Dr. Albin Behaghel, CHU de Rennes Stéphanie Chatel, Estelle Baron, l'institut du thorax, Nantes Dr. Elisabeth Villain, APHP, Hopital Necker Enfants Malades, Paris Pr. Véronique Gournay, CHU de Nantes Dr. Sophie Guillaumont, CHU de Montpellier Dr. Caroline Bonnet, CHU de Dijon Pr. Jean-Benoit Thambo, CHU de Bordeaux Pr. Alain Fraisse, CHU de Marseille Dr. François Marçon, CHU de Nancy Dr. Francis Rouault, Espace Viton, Marseille Pr. Alain Chantepie, CHU de Tours Pr. François Godart, CHU de Lille Dr. Jean-Marc Schleich, CHU de Rennes Pr. Jean-René Lusson, CHU de Clermont-Ferrand Dr. Yves Dulac, CHU de Toulouse |
| Nb de sujets inclus | 141 propositus 130 parents, 130 sujets sains contrôles appariés |
| Analyses génétiques | Séquencage des gènes <i>SCN5A</i> , <i>SCN1B</i> , <i>NKX2.5</i> , <i>GJA1</i> , <i>GJA5</i> , <i>GJC1</i> |
| Publication | Baruteau AE et al, <i>Circulation</i> 2012;126:1469-77. |

SFC: Société Française de Cardiologie

Le recueil des ECG de dépistage et des prélèvements sanguins a été assuré par Swanny Fouchard. Un kit de prélèvement a été envoyé par voie postale à chaque parent, comprenant:

- a/ une feuille d'information expliquant par écrit la justification et les modalités de l'étude;
- b/ un consentement éclairé de participation à une enquête génétique "Localisation et identification de nouveaux gènes dans les troubles conductifs intra-cardiaques congénitaux" (2 exemplaires par personne soit 6 exemplaires: 2 pour le père, 2 pour la mère et 2 pour l'enfant lorsque son prélèvement n'avait pas été récupéré lors de l'étude #2);
- c/ une ordonnance pour faire réaliser un prélèvement sanguin dans un laboratoire d'analyses médicales (3 tubes EDTA par personne)
- d/ une lettre pour introduire une consultation auprès d'un cardiologue hospitalier ou libéral, afin de réaliser un ECG 12-dérivations de dépistage au repos à chacun des deux parents du propositus.
- e/ une enveloppe pré-timbrée et des boîtes de protection en plastique rigide pour le renvoi à l'institut du thorax à Nantes des exemplaires de consentement signés, des tubes de sang destinés à l'analyse génétique et des ECG de dépistage.

Analyses ECG. Les ECG 12-dérivations de 130 parents et de 130 sujets sains contrôles appariés sur l'âge et le genre, enregistrés au repos, ont été recueillis. Les ECG ont été systématiquement reinterprétés par deux médecins investigateurs (le Dr. Albin Behaghel et moi) "en aveugle" concernant le statut "parent" ou "contrôle" et la notion de troubles de conduction ou non. Le diagnostic des troubles de conduction atrioventriculaire et/ou intraventriculaire et l'analyse de l'intervalle QT ont été réalisés selon les définitions usuelles et les critères recommandés par l'American Heart Association et l'Heart Rhythm Society [Surawicz *et al*, 2009; Rautaharju *et al*, 2009; Elizari *et al*, 2007; Mangrum *et al*, 2000]. Les mesures de la fréquence cardiaque, de l'intervalle PR (non réalisée en cas de BAV complet), de la durée du complexe QRS et de l'intervalle QT ont été réalisées en utilisant le logiciel de mesure DatInf® (Datinf GmbH, Tübingen, Germany). L'intervalle QT a été corrigé pour la fréquence cardiaque en utilisant la formule de Bazett [Bazett *et al*, 1920]. Chacun des deux médecins a analysé tous les tracés ECG, et les mesures des différents intervalles ont ensuite été moyennées.

Estimation de l'héritabilité. L'héritabilité est une donnée statistique évaluant la part des facteurs génétiques dans la probabilité d'apparition d'un trait phénotypique donné au sein d'une population donnée. Autrement dit, il s'agit de la part de variance phénotypique relevant de la variance génotypique. L'héritabilité sert donc à quantifier la part des facteurs génétiques et la part des facteurs environnementaux dans la constitution d'un phénotype d'une population. L'héritabilité ne s'applique qu'au sein d'une population donnée dans un environnement donné, contrairement à l'hérédité qui dépend du caractère mesuré. L'héritabilité (h^2) varie entre 0 et 1. Si $h^2 < 0.1$, alors l'héritabilité est faible et on considère que le trait phénotypique dépend essentiellement des

facteurs environnementaux. En revanche si $h^2 > 0.4$, on considère que l'héritabilité est élevée, le trait phénotypique est alors fortement lié aux facteurs génétiques.

Le calcul de l'héritabilité du trouble de conduction dans notre population a été réalisé par Christian Dina en utilisant le modèle biométrique, à partir de l'analyse de 57 trios familiaux, chacun des trios étant constitué d'un propositus et de ses deux parents. La méthodologie de ce calcul est détaillée dans l'article ci-dessous.

Recueil des échantillons d'ADN et analyses génétiques

A notre connaissance, la banque d'ADN que nous avons constituée sur le BAV congénital et de l'enfance est unique au monde. Elle a été conservée au sein de la Biocollecion cardiogénétique de l'Université de Nantes gérée par Mme Martine Le Cunff.

Extraction de l'ADN génomique. Pour chaque individu ont été prélevés 3 tubes contenant chacun 5ml de sang veineux périphérique prélevés sur EDTA (anticoagulant chélateur des ions Mg^{2+} empêchant l'action des DNases). Le sang était ensuite conservé à $-20^{\circ}C$ jusqu'à l'extraction. L'ADN génomique des lymphocytes était extrait des lymphocytes du sang veineux périphérique en utilisant le kit Nucleospin Blood XL (Macherey-Nagel) selon le protocole du fabricant.

Amplification par réaction de polymérisation en chaine. La réaction de polymérisation en chaine (polymerase chain reaction ou PCR) est une technique permettant d'amplifier sélectivement *in vitro* une séquence cible d'ADN à partir de petites quantités d'ADN génomique. Il s'agit d'une réaction en chaine, les brins d'ADN néoformés étant utilisés comme matrice pour la synthèse d'ADN lors du cycle suivant. Pour le séquençage direct d'un gène candidat, les séquences cibles amplifiées sont les séquences exoniques du gène. Pour les amplifier sélectivement, on utilise deux amorces nucléotidiques complémentaires et spécifiques des séquences flanquantes extérieures aux extrémités de la séquence cible. On prépare pour chaque patient et pour chaque séquence cible d'ADN un mélange réactionnel de 30 μ l, contenant: a/ 5 μ l de solution d'ADN (dilué à 10 ng/ μ l); b/ 3 μ l de tampon 10x (Invitrogen); c/ 0.9 μ l de $MgCl_2$ (à 50 mM); d/ 3 μ l d'une solution de dNTP (à 2,5 mM); e/ 1.5 μ l d'amorce sens et antisens (à 10 μ M); f/ 0,2 μ l d'enzyme Taq DNA polymérase (Invitrogen); g/ 14.9 μ l d'eau stérile. Le mélange réactionnel est soumis à 30 cycles d'amplification dans un thermocycleur automatique GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) selon le protocole suivant: a/ dénaturation initiale de l'ADN pendant 3 min à $94^{\circ}C$; b/ 30 cycles comprenant une dénaturation de l'ADN pendant 30 sec à $94^{\circ}C$, une hybridation des amorces pendant 30 sec à $53^{\circ}C$ et une synthèse d'ADN à l'aide de la Taq DNA polymérase pendant 30 sec à $72^{\circ}C$; c/ extension finale de 10 min à $72^{\circ}C$; et d/ température finale de $4^{\circ}C$.

Migration électrophorétique sur gel d'acrylamide. Les produits d'amplification sont contrôlés par une migration électrophorétique sur gel d'acrylamide. La taille des produits d'amplification est calculée en fonction de leur vitesse de migration. Une solution de gel d'acrylamide à 6% est préparée en mélangeant 7.4 ml d'eau, 1 ml de tampon TBE 10X, 1,5 ml d'acrylamide, 100 µl d'APS (ammonium persulfate) à 10 % et 10µl de TEMED à 100%. Cette solution est coulée entre 2 plaques de verre puis polymérise pendant 15 minutes. Pour chaque individu, 5 µl des produits amplifiés par PCR sont mélangés à 1.5 µl d'un tampon de charge (bleu dextran 500 mg/ml). Ce mélange est déposé dans un des puits du gel pour chaque produit de PCR. Cinq microlitres d'un marqueur de taille (100 pb) sont également déposés dans un puit du gel. Les produits de PCR migrent sur le gel d'acrylamide en présence de tampon TBE 1X dans un champ électrique de 140V appliqué pendant 40 minutes. Ils sont ensuite révélés par le bromure d'éthidium et visualisés sous rayonnement ultraviolet.

Purification des produits de PCR. afin d'éliminer les amorces et nucléotides restants, les produits d'élongation ou amplicons sont purifiés dans une plaque 96 puits (Applied Biosystems microamp). Un mix associant 2 µl de produit d'élongation, 0.5 µl d'Exosap (Amersham Biosciences) et 7.5 µl d'eau pure milliQ par puit est déposé sur glace. La réaction de purification des produits d'élongation a lieu dans le thermocycleur automatique programmé à 37°C pendant 15 min puis 80°C pendant 15 min, température finale de 4°C.

Réaction de séquence. la méthode utilisée est le séquençage par terminaison de chaîne (méthode Sanger) avec le « Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » (Applied Biosystems) selon les instructions du fournisseur. La réaction de séquence a lieu en présence de 0,5 µl de BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems), 1,75 µl de tampon 5X BigDye Terminator (Applied Biosystems) et 0,25 µl d'amorce sens ou anti-sens (20 µM). la réaction de séquence requiert une dénaturation de 1 minute à 96°C, puis une amplification de 25 cycles (comprenant 10 secondes de dénaturation à 96°C, 5 secondes d'appariement à 50°C et 4 minutes d'élongation à 60°C). Les produits d'élongation sont purifiés en plaque 96 puits par 45 µl de « SAM solution » (Applied Biosystems) et 10 µl de « X Terminator Solution » (Applied Biosystems) puis sont injectés sur un polymère POP7 (Applied Biosystems) pour une migration électrophorétique sur séquenceur automatique 48-capillaires ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Les séquences obtenues sont ensuite analysées avec les logiciels Sequencing Analysis v3.4 et SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

Interprétation des résultats: Polymorphisme ou mutation? La séquence des 3×10^9 paires de bases qui composent le génome humain n'est pas identique d'un individu à l'autre. Il existe un grand

nombre de variations, ou polymorphismes, environ 1 toutes les 1000 paires de bases, de fréquence variable dans la population [Venter *et al.* 2001]. Les variations les plus courantes sont des substitutions d'un nucléotide par un autre, appelées SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Les autres types de variations sont les polymorphismes de répétition, d'insertion/délétion et les polymorphismes de structure qui affectent de grandes régions chromosomiques. La plupart des polymorphismes sont situés dans des régions non fonctionnelles du génome et n'ont pas d'impact phénotypique. Ils sont dits neutres et désignés sous le terme de marqueurs. Cependant quand ces polymorphismes affectent des régions codantes ou régulatrices des gènes, ils peuvent modifier la séquence de la protéine ou le niveau d'expression du gène et se traduire par des effets phénotypiques observables. Lorsqu'un variant est identifié par séquençage direct d'un gène candidat, la première étape consiste à caractériser la variabilité de séquence de ce gène à partir des bases de données (www.ncbi.nlm.nih.gov et www.ensembl.org) et vérifier si ce variant est ou non répertorié. La seconde étape consiste à déterminer si ce variant est situé dans une séquence nucléotidique conservée ou non au cours de l'évolution phylogénétique. Enfin la fréquence d'apparition de ce variant dans la population générale est vérifiée par analyse de sujets contrôles par la technique de digestion enzymatique. Lorsque les variants sont rares dans la population générale (<1%), il peut s'agir de mutations à effet majeur qui conduisent à un phénotype morbide. La mutation doit être présente sur un seul allèle (mode de transmission dominant) ou sur chacun des deux allèles (mode de transmission récessif) pour s'exprimer. Ces variants, polymorphismes ou mutations, peuvent se trouver au sein des régions codantes des gènes, les exons, ils sont alors synonymes ne changeant pas la séquence en acides aminés de la protéine ou non-synonymes (faux-sens, non sens, décalage du cadre de lecture). Situés dans les régions non codantes, les introns ou les régions intergéniques, ils peuvent avoir des conséquences sur la fixation des facteurs de transcription, l'épissage, la stabilité, l'adressage et la localisation subcellulaire des ARN messagers. Le risque relatif d'un variant est dépendant de sa localisation dans le génome. Il faut noter que certains polymorphismes, même s'ils sont insuffisants à eux seuls pour causer une maladie, peuvent agir comme modulateurs de l'expression d'une pathologie ou d'un trait phénotypique ou comme facteur de prédisposition génétique. Le phénotype propre à chacun est lié en partie à l'ensemble des caractéristiques du génome, c'est-à-dire l'ensemble des génotypes, chacun définissant les deux allèles pour un polymorphisme donné.

Relation gène-fonction: étude des effets fonctionnels des mutations. Lorsqu'un variant exonique rare entraînant un changement d'acide aminé est identifié, une étude de fonction est entreprise pour déterminer si ce variant induit un effet majeur sur la fonction de la protéine et s'il peut être impliqué dans la pathogénie du phénotype morbide.

Choix des gènes candidats. En accord avec Jean-Jacques Schott et Vincent Probst, notre approche gène-candidat a porté sur 6 gènes: *SCN5A*, *SCN1B*, *NKX2.5*, *GJA1*, *GJA5*, *GJC1*. Seule l'étude de *SCN5A* est rapportée ici, le résultat du séquençage des autres gènes étant décrit dans les études #3 et #4.

Le gène *SCN5A*, situé sur le chromosome 3 (position 3p21, 28 exons, ADN génomique de 101611 paires de bases, transcrit de 8504 paires de bases, accession number NM 198056) qui code pour Na_v1.5, la sous-unité alpha des canaux sodiques cardiaques (protéine de 2016 acides aminés, poids moléculaire de 227 kDa, accession number NP 932173).

Implication personnelle. En dehors du travail de recherche clinique, cette étude m'a permis de réaliser, avec Stéphanie Chatel et Estelle Baron, les manipulations suivantes: extraction de l'ADN génomique et séquençage des gènes *SCN5A*, *SCN1B*, *NKX2.5*, *GJA1*, *GJA5*, *GJC1* sur un échantillon de 97 propositus.

III.4- Principaux résultats

L'ensemble des résultats est détaillé dans l'article « **Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood nonimmune isolated atrioventricular block** » (*Circulation* 2012;126:1469-1477) présenté à la fin de cette section.

Les principaux résultats sont résumés ici. Dans cette étude, 130 parents (âge moyen: 42.0±6.8, sex ratio: 0.88, 57 couples) d'enfants porteurs d'un BAV "idiopathique" et 130 sujets sains contrôles appariés sur l'âge et le genre ont été inclus. Les caractéristiques des propositus sont détaillées dans l'étude #1.

Anamnèse. Aucune consanguinité n'était retrouvée parmi les parents des propositus. Les parents et les sujets contrôles n'avaient aucun antécédent familial de syncopes, de BAV congénital, de BAV de l'enfance ou d'implantation d'un stimulateur cardiaque. Une histoire familiale de mort subite était retrouvée chez un parent (1.4%) et aucun des témoins (p=1.0). En revanche, un antécédent familial de troubles de conduction dégénératifs survenus avant l'âge de 50 ans était documenté chez 8 parents (11.1%) mais aucun sujet contrôle (p=0.01).

Dépistage parental électrocardiographique. Tous les parents et sujets contrôles étaient asymptomatiques et en rythme sinusal, à l'exception d'un parent asymptomatique chez qui l'ECG de dépistage a permis de mettre en évidence un BAV complet méconnu avec rythme d'échappement à complexes QRS larges.

La durée de l'onde P, du complexe QRS, de l'intervalle QT et de l'intervalle QT corrigé étaient significativement plus longs dans le groupe des parents que dans le groupe des sujets contrôles. En revanche, la fréquence cardiaque, la durée de l'intervalle PR et l'axe des QRS n'étaient pas significativement différents entre ces deux groupes. Des troubles caractérisés de la conduction cardiaque étaient plus fréquemment observés dans le groupe des parents que chez les sujets contrôles, respectivement retrouvés dans 50.8% et 4.6% des cas ($p < 0.001$). Parmi les 57 trios familiaux, une altération infra-clinique de la conduction cardiaque était observée chez au moins l'un des deux parents dans 68.4% des cas, et chez les deux parents dans 29.8% des cas.

Calcul de l'héritabilité. L'analyse des trios familiaux a mis en évidence que l'héritabilité du trouble de conduction cardiaque dans cette population était très élevée, calculée à $h^2 = 0.91$ (intervalle de confiance à 95%: 0.8-1.0). Un enfant ayant au moins un parent porteur de troubles de conduction infra-cliniques avait une augmentation du risque relatif multiplié par 6 de présenter un BAV isolé non-immun.

Séquencage direct du gène SCN5A. Le séquençage direct du gène *SCN5A* parmi 97 propositus a permis de mettre en évidence 2 mutations différentes chez 2 enfants (p.Thr1806SerfsX27 et p.Arg367His). La mutation p.Thr1806SerfsX27 a été identifiée chez un propositus de 7 ans, porteur d'un BAV du premier degré, et chez son père qui présentait un trouble de conduction étagé associant un BAV du premier degré, un bloc de branche droit complet et un hémibloc antérieur gauche. La mutation p.Arg367His a quant-à-elle été identifiée chez un enfant de 12 mois porteur d'un BAV 2/1 à complexes QRS fins. Cette mutation, déjà décrite dans le syndrome de Brugada et dans le syndrome de repolarisation précoce [Vatta *et al*, 2002; Hong *et al*, 2004; Watanabe *et al*, 2011] était également retrouvée chez la mère du propositus. Bien que celle-ci présentait une conduction cardiaque normale sur l'ECG de dépistage, un antécédent familial d'implantation d'un stimulateur cardiaque était noté chez la tante maternelle et la grand-mère maternelle du propositus. Le séquençage direct des 28 exons du gène *SCN5A* sur 95 autres cas index n'a pas mis en évidence d'autre variant exonique non répertorié dans les bases de données (www.ncbi.nlm.nih.gov et www.ensembl.org).

Séquencage des autres gènes candidats. Le résultat du séquençage direct des autres gènes candidats est détaillé dans l'étude #3 (gènes *GJA1*, *GJA5* et *GJC1*) et dans l'étude #4 (gènes *SCN1B* et *NKX2.5*).

Surprise, Surprise: Idiopathic, Isolated Complete Atrioventricular Block May Be Heritable

Bryan C. Cannon and Michael J. Ackerman

Circulation. 2012;126:1434-1435; originally published online August 16, 2012;
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.130575

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/126/12/1434>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Surprise, Surprise

Idiopathic, Isolated Complete Atrioventricular Block May Be Heritable

Bryan C. Cannon, MD; Michael J. Ackerman, MD, PhD

Baruteau and colleagues¹ present findings that further the potential for a genetic basis for nonimmune isolated atrioventricular (AV) block. Their observations warrant further consideration in the evaluation and management of patients with no definitive cause of their cardiac conduction defect.

Article see p 1469

Congenital complete AV block (CAVB) affects \approx 1 in 20 000 live-born infants² and is commonly associated with an immune-related cause associated with maternal collagen vascular disease or structural cardiac disease.³ Other causes of CAVB have been described, including infections, myopathies, and genetic disorders such as the Hunter and Hurler syndromes. Still, the specific cause of CAVB remains elusive for a significant number of patients, raising the possibility that a portion of idiopathic CAVB stems from CAVB-susceptibility genes. Currently, mutations in transcription factors and cardiac channels yield electrocardiographic phenotypes that include cardiac conduction abnormalities.

For example, patients with NKX2.5 mutations can have cardiac conduction defects, cardiomyopathy, and atrial septal defects.⁴ Long-QT syndrome has also been associated with both 2:1 AV block and CAVB, but this is usually in the presence of overt QT prolongation on the ECG.⁵ Mutations in the *SCN5A*-encoded Nav1.5 sodium channel have an ever-expansive breadth of channelopathic/cardiomyopathic phenotypes, including type 3 long-QT syndrome, type 1 Brugada syndrome, dilated cardiomyopathy, and atrial standstill and conduction disturbances.⁶

Among patients with idiopathic CAVB, the electrophysiological phenotype may extend beyond the AV node. In the Baruteau et al cohort, a wide QRS complex was noted in almost 10% of patients with childhood AV block and in nearly one third of patients with congenital CAVB, which is extremely high compared with patients with immune-mediated CAVB in which a wide QRS complex is relatively rare and is a Class I indication for a pacemaker.⁷ This high

percentage of wide QRS complexes suggests a more diffuse disease of the conduction system rather than an effect on just the AV node. In addition, this defect may affect conduction velocity, as is evidenced by a prolonged P wave and QRS complex seen in the parents of affected individuals compared with control subjects. Although the QT and corrected QT intervals measured within normal limits, both intervals were statistically longer in parents compared with the control population. Although there is an effect on conduction velocity, there did not seem to be an effect on spontaneous depolarization because the heart rates were almost identical in the 2 groups.

It is interesting that more than two thirds of their patients with incomplete AV block progressed to having CAVB, suggesting a progressive mode of damage to the AV node, not just an underlying static channelopathy. However, this progression seems to involve the conduction system exclusively because no patient died or developed dilated cardiomyopathy during a median follow-up of 11 years.

There is likely a complex interaction between multiple genes in genetically mediated CAVB because the ECG phenotypes were different in children and their parents. Because virtually all cardiac channelopathies and cardiomyopathies are underscored by marked genetic and phenotypic heterogeneity, incomplete penetrance, and variable expressivity, we can anticipate the same story line for genetically mediated CAVB, not to mention the likely contribution of modifier genes in the patients who progress from incomplete to complete AV block. Furthermore, compound heterozygosity and the 2-hit phenomenon may underlie some CAVB, because we can infer from their observation that cardiac conduction impairment (but not complete AV block) was noted in both parents in 30% of the cohort.

However, before proceeding with genetic testing of known channelopathy- or cardiomyopathy-associated genes as intimated by the authors, caution and restraint are probably the words of the day. The recent 2011 guidelines suggested a "may be considered" recommendation concerning genetic testing for isolated/familial cardiac conduction disease and urged careful interpretation of the genetic test results.⁸ Currently, the anticipated yield of bona fide *SCN5A* defects for otherwise idiopathic CAVB is unknown, whereas the potential false-positive rate is \approx 2% in whites and 4% to 5% in nonwhites.

In addition, a major point lacking in this study is the evaluation of siblings. If there is truly a familial process, it would stand to reason that many of the siblings would be affected with conduction system disturbances or even unrecognized CAVB. Because there are many causes of conduction system disturbances in adults, including acquired coronary

The opinions expressed in this article are not necessarily those of the editors or of the American Heart Association.

From the Department of Pediatrics/Division of Pediatric Cardiology (B.C.C., M.J.A.) and Departments of Medicine/Division of Cardiovascular Diseases and Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Windland Smith Rice Sudden Death Genomics Laboratory (M.J.A.), Mayo Clinic, Rochester, MN.

Correspondence to Michael J. Ackerman, MD, PhD, Windland Smith Rice Sudden Death Genomics Laboratory, Mayo Clinic, Guggenheim 501, Rochester, MN 55905. E-mail ackerman.michael@mayo.edu (*Circulation*. 2012;126:1434-1435.)

© 2012 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.130575

artery disease, it is important to truly document that the CAVB is a heritable condition and is not related to exogenous environmental factors.

This study certainly has implications in the familial evaluation of infants and young children with progressive or complete AV block. Evaluation of the parents may reveal an underlying conduction defect. ECGs on siblings of affected individuals may also be indicated to reveal conduction disturbances with no overt symptoms. If these conduction disturbances are present, they may need to be followed up for progression to higher grades of AV block over time. Evaluation of multiple cohorts in families may lead to the identification of new genes responsible for cardiac conduction defects, which also may be responsible for other channelopathies. The study may have implications for affected individuals, particularly those stemming from *SCN5A* defects. These patients may need to be advised to avoid medications that are contraindicated in Brugada syndrome, long-QT syndrome, or both.

As with most studies, the authors have rightly suggested that further studies need to be conducted to determine the true ramifications of the findings of this study.

Disclosures

Dr Cannon is a consultant for Medtronic and St. Jude Medical. Dr Ackerman is a consultant for Biotronik, Boston Scientific, Medtronic, St. Jude Medical, and Transgenomic. Intellectual property derived from Dr Ackerman's research program resulted in license agreements in 2004 between Mayo Clinic Health Solutions (formerly Mayo Medical Ventures) and PGxHealth (formerly Genaisance Pharmaceuticals and now Transgenomic) with respect to their FAMILION-LQTS and FAMILION-CPVT genetic tests.

References

1. Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S, Mabo P, Schott JJ, Dina C, Chatel S, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gourmay V, Rouault F, Chantepie A,

- Guillaumont S, Godart F, Martins RP, Delasalle B, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lussion JR, Dulac Y, Daubert JC, Le Marec H, Probst V. Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood nonimmune isolated atrioventricular block. *Circulation*. 2012;126:1469–1477.
2. Michaelsson M, Engle M. Congenital complete heart block: an international study of the natural history. *Cardiovasc Clin*. 1972;4:85–101.
3. Scott JS, Maddison PJ, Taylor PV, Esscher E, Scott O, Skinner RP. Connective-tissue disease, antibodies to ribonucleoprotein, and congenital heart block. *N Engl J Med*. 1983;309:209–212.
4. Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, Amand TS, Kondo R, Pradervand S, Evans SM, Clark B, Feramisco JR, Giles W, Ho SY, Benson DW, Silberbach M, Shou W, Chien KR. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease: loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell*. 2004;117:373–386.
5. Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2007;116:134–142.
6. Ackerman MJ. Cardiac channelopathies: it's in the genes. *Nat Med*. 2004;10:463–464.
7. Epstein AE, Dimarco JP, Ellenbogen KA, Estes NA 3rd, Freedman RA, Gettes LS, Gillinov AM, Gregoratos G, Hammill SC, Hayes DL, Hlatky MA, Newby LK, Page RL, Schoenfeld MH, Silka MJ, Stevenson LW, Sweeney MO; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Association for Thoracic Surgery; Society of Thoracic Surgeons. ACC/AHA/HRS 2008 guidelines for device-based therapy of cardiac rhythm abnormalities. *Heart Rhythm*. 2008;5:e1–e62.
8. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Camm AJ, Ellinor PT, Gollob M, Hamilton R, Hershberger RE, Judge DP, Le Marec H, McKenna WJ, Schulze-Bahr E, Semsarian C, Towbin JA, Watkins H, Wilde A, Wolpert C, Zipes DP. Heart Rhythm Society; European Heart Rhythm Association. HRS/EHRS expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association. *Heart Rhythm*. 2011;8:1308–1339.

KEY WORDS: Editorials ■ atrioventricular block ■ genetics ■ heart diseases ■ long QT syndrome

Parental Electrocardiographic Screening Identifies a High Degree of Inheritance for Congenital and Childhood Nonimmune Isolated Atrioventricular Block

Alban-Elouen Baruteau, Albin Behaghel, Swanny Fouchard, Philippe Mabo, Jean-Jacques Schott, Christian Dina, Stéphanie Chatel, Elisabeth Villain, Jean-Benoit Thambo, François Marçon, Véronique Gournay, Francis Rouault, Alain Chantepie, Sophie Guillaumont, François Godart, Raphaël P. Martins, Béatrice Delasalle, Caroline Bonnet, Alain Fraise, Jean-Marc Schleich, Jean-René Lusson, Yves Dulac, Jean-Claude Daubert, Hervé Le Marec and Vincent Probst

Circulation. 2012;126:1469-1477; originally published online August 16, 2012;
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.069161
Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/content/126/12/1469>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Parental Electrocardiographic Screening Identifies a High Degree of Inheritance for Congenital and Childhood Nonimmune Isolated Atrioventricular Block

Alban-Elouen Baruteau, MD; Albin Behaghel, MD; Swanny Fouchard, PhD; Philippe Mabo, MD; Jean-Jacques Schott, PhD; Christian Dina, MS; Stéphanie Chatel, PhD; Elisabeth Villain, MD; Jean-Benoit Thambo, MD, PhD; François Marçon, MD; Véronique Gournay, MD, PhD; Francis Rouault, MD; Alain Chantepie, MD; Sophie Guillaumont, MD; François Godart, MD, PhD; Raphaël P. Martins, MD; Béatrice Delasalle, MS; Caroline Bonnet, MD; Alain Fraisse, MD, PhD; Jean-Marc Schleich, MD, PhD; Jean-René Lusson, MD; Yves Dulac, MD; Jean-Claude Daubert, MD; Hervé Le Marec, MD, PhD; Vincent Probst, MD, PhD

Background—The origin of congenital or childhood nonimmune isolated atrioventricular (AV) block remains unknown. We hypothesized that this conduction abnormality in the young may be a heritable disease.

Methods and Results—A multicenter retrospective study (13 French referral centers, from 1980–2009) included 141 children with AV block diagnosed in utero, at birth, or before 15 years of age without structural heart abnormalities and without maternal antibodies. Parents and matched control subjects were investigated for family history and for ECG screening. In parents, a family history of sudden death or progressive cardiac conduction defect was found in 1.4% and 11.1%, respectively. Screening ECGs from 130 parents (mean age 42.0 ± 6.8 years, 57 couples) were compared with those of 130 matched healthy control subjects. All parents were asymptomatic and in sinus rhythm, except for 1 with undetected complete AV block. Conduction abnormalities were more frequent in parents than in control subjects, found in 50.8% versus 4.6%, respectively ($P < 0.001$). A long PR interval was found in 18.5% of the parents but never in control subjects ($P < 0.0001$). Complete or incomplete right bundle-branch block was observed in 39.2% of the parents and 1.5% of the control subjects ($P < 0.0001$). Complete or incomplete left bundle-branch block was found in 15.4% of the parents and 3.1% of the control subjects ($P < 0.0006$). Estimated heritability for isolated conduction disturbances was 91% (95% confidence interval, 80%–100%). *SCN5A* mutation screening identified 2 mutations in 2 patients among 97 children.

Conclusions—ECG screening in parents of children affected by idiopathic AV block revealed a high prevalence of conduction abnormalities. These results support the hypothesis of an inheritable trait in congenital and childhood nonimmune isolated AV block. (*Circulation*. 2012;126:1469–1477.)

Key Words: atrioventricular block ■ conduction ■ ECG screening ■ genetics ■ pediatrics

Atrioventricular (AV) block is a rare electrocardiographic finding in neonates and children who are at risk of sudden death in the absence of cardiac pacing. It can be caused by various conditions such as transplacental passage of maternal anti-Ro/SSA or anti-La/SSB antibodies, structural congenital heart disease, postoperative complications, myocarditis, neuromuscular disorder, or metabolic disease. However, in

some cases, no obvious cause of AV conduction disorder can be identified. Familial clustering of progressive cardiac conduction defect (PCCD) of unknown cause, including congenital AV block, has been reported. Published pedigrees have shown an autosomal dominant inheritance with incomplete penetrance and variable expressivity.^{1–3} Given that a limited number of genes have been found to be responsible for hereditary PCCD in

Received October 18, 2011; accepted June 26, 2012.

From the Department de Chirurgie cardiaque des cardiopathies congénitales, Centre Chirurgial Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson (A.-E.B.); Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre (A.E.-B.); INSERM UMR1087, CNRS UMR 6291, L'Institut du thorax, Université de Nantes, Nantes (A.-E.B., S.F., J.-J.S., C.D., S.C., B.D., H.L.M., V.P.); INSERM, CIC-IT 804, Rennes (A.B., P.M., R.P.M., J.-M.S., J.-C.D.); INSERM, U642, Rennes (A.B., P.M., R.P.M., J.-M.S., J.-C.D.); Cardiologie, CHU Rennes, Rennes (A.B., P.M., R.P.M., J.-M.S., J.-C.D.); Cardiologie, L'Institut du thorax, Nantes (S.F., J.-J.S., S.C., B.D., H.L.M., V.P.); APHP, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris (E.V.); Cardiologie pédiatrique, CHU Bordeaux, Bordeaux (J.-B.T.); Cardiologie pédiatrique CHU Nancy, Nancy (F.M.); Cardiologie pédiatrique, CHU Nantes, Nantes (V.G.); Cabinet de Cardiologie pédiatrique, Marseille (F.R.); Cardiologie pédiatrique, CHU Tours, Tours (A.C.); Cardiologie Pédiatrique, CHU Montpellier, Montpellier (S.G.); Cardiologie Pédiatrique, CHU Lille, Lille (F.G.); Cardiologie Pédiatrique, CHU Dijon, Dijon (C.B.); Cardiologie Pédiatrique, CHU Marseille, Marseille (A.F.); Cardiologie, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand (J.-R.L.); and Cardiologie Pédiatrique, CHU Toulouse, Toulouse (Y.D.); all in France.

Correspondence to Vincent Probst, MD, PhD, Service de cardiologie, CHU de Nantes, 44093 Nantes CEDEX 01, France. E-mail vincent.probst@chu-nantes.fr

© 2012 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.069161

Downloaded from <http://circ.ahajournals.org/> at INSERM - DISC on December 13, 2013



Figure 1. Screening ECG of a 56-year-old father showing third-degree atrioventricular block and a wide QRS complex escape rhythm.

adults^{4–6} and that it has been recently shown that several common variants modulate heart rate, PR interval, and QRS complex durations,^{7–9} we hypothesized that idiopathic AV block in the young may be a heritable disease.

Editorial see p 1434
Clinical Perspective on p 1477

This hypothesis was tested in a nationwide (France) retrospective cohort of children with idiopathic pediatric AV block, with examination of family histories of conduction disorders or sudden death and the electrocardiographic characteristics of apparently healthy parents.

Methods

Clinical Investigation

A retrospective study conducted from 1980 to 2009 at 13 French tertiary hospitals provided the basis for a clinical database of 141 children presenting with nonimmune isolated AV block diagnosed in utero or in early childhood. Because 9% of mothers who are seronegative at the time of fetal diagnosis later become seropositive,¹⁰ and once they are detected, the antibodies permanently remain in the maternal serum, the mothers of all patients included in the present study systematically underwent, on inclusion, a screening for antibodies to soluble nuclear antigens 48-kd SSB/La, 52-kd SSA/Ro, and 60-kd SSA/Ro by use of previously described high-sensitivity, quantitative radioligand assays.¹¹ AV block was classified as congenital if it was diagnosed in utero, at birth, or during the first month of life and as childhood AV block if diagnosed between the first month and the fifteenth year of life.¹² The methodology and available data on the clinical characteristics of these patients have been reported previously.¹⁰ The parents of the 141 children studied were contacted by the genetic research unit of l'Institut du Thorax, Nantes, France, and informed about the possibility of parental screening for asymptomatic cardiac conduction disorders. Relatives were asked about family histories of sudden death, PCCD, or heart

block at a young age and invited to consult a cardiologist to undergo physical examination and a screening 12-lead ECG. Healthy control subjects from the general population, matched for age and sex, were also enrolled at l'Institut du Thorax and subjected to review of family history, physical examination, and a screening 12-lead ECG. The study was conducted according to the French guidelines for genetic research and was approved by the Ethics Committee of Nantes University Hospital. All participants gave their informed written consent.

ECGs were centralized at l'Institut du Thorax and analyzed by 3 medical investigators. ECG readers were blinded between control subjects and family members. The 3 ECG readers all analyzed each ECG, and measurements were then averaged. Paper speed was 25 mm/s. Heart rate, P-wave duration, PR interval, QRS-complex duration, QRS axis, and QT interval were measured at rest with DatInf Measure dedicated software (DatInf GmbH). All included values were averaged from 3 to 5 interval measurements. QT interval was measured in the lead that showed the longest QT, usually V₂ or V₃, and QT rate correction was performed with Bazett's formula, as recommended.¹³ The mean frontal plane electric axis, determined by the vector of the maximal QRS deflection, was considered to be normal within -30° and $+90^{\circ}$. Left-axis deviation was defined as -30° and beyond and right-axis deviation as $+90^{\circ}$ and beyond. Complete or incomplete right bundle-branch block (RBBB) and left bundle-branch block (LBBB) and left anterior or posterior fascicular block were defined according to American Heart Association/American College of Cardiology Foundation/Heart Rhythm Society recommendations.^{14,15} PR-interval duration <200 ms was considered normal. First-, second-, and third-degree AV blocks were classified according to consensual definition.¹⁶ Sinus bradycardia was defined as a sinus rhythm <60 bpm.

Statistical Analysis

Analyses were performed with PASW Statistics 18 software (SPSS Inc). Categorical variables were expressed as numbers and percentages. Continuous variables with normal distribution were expressed as mean \pm SD. Time variables were presented with median (25th–75th percentiles) or median (minimum–maximum). Parents and control subjects were matched 1-to-1 for sex and age on ECG

recording. Nonparametric tests for paired data were used to compare the 2 groups. The McNemar test was performed for categorical variables and Wilcoxon signed rank tests for continuous variables. The Kaplan-Meier method was used to estimate time to complete block and pacemaker implantation.

To compare children's data from groups with 0, 1, or 2 affected parents, a 1-way ANOVA was performed for continuous variables with a Tukey post hoc test if needed, and a Pearson χ^2 test was used for categorical variables. To compare continuous variables with nonnormal distribution, a Kruskal-Wallis test was performed. A 2-sided P value <0.05 was considered statistically significant.

Genetic Analysis

For 141 children, 97 parents gave their written consent for a blood sample from their child. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by use of standard protocols. Mutation screening of *SCN5A* was performed by high-resolution melting assay on the Light Cycler 480 System (Roche) followed by bidirectional sequencing of abnormal profiles or directly by sequencing (ABI PRISM 3730 DNA Sequencer, Applied Biosystems).

Heritability Estimate

To estimate heritability, we used the biometric model, assuming a quantitative liability normalized (mean 0 and variance 1) trait L and a threshold T above which an individual is declared affected (Falconer). The variance of L is divided into polygenic G (variance s^2_p) and environmental E (variance s^2_e) components. This classic model was modified slightly to allow 2 different thresholds, T_p and T_o , which reflect the different severity of status in parents and offspring: $L=G+E$. Both components follow a normal distribution, $L \sim N(0, s^2_g) + N(0, s^2_e)$, with $s^2_g + s^2_e = 1$. Because of independence of the 2 components $L \sim N(0, s^2_g + s^2_e)$ heritability is the proportion of genetic variance: $h^2 = s^2_g / (s^2_g + s^2_e) = s^2_g$.

We simulated trios (1 child and 2 parents) for a grid of heritability values i and retained trios in which the children were affected ($L > T_o$) to estimate mean L_i in parents (μ_p), conditioned on the children being severely affected. The likelihood of observing 66 affected children of 130 given children polygenic value was estimated for each heritability value i as follows: $L_i(A/pg) = 66 \times \log_e(\pi) + 64 \times \log_e(1 - \pi)$. $\pi = \Phi^{-1}(T_p, \mu = \mu_p, \sigma^2 = 1)$.

Results

A total of 130 parents, including 57 couples and 16 isolated parents, and 130 matched control subjects were analyzed. Sex ratio was 0.88 in the 2 groups, and mean age at the time of ECG recording was 42.0 ± 6.8 and 42.0 ± 6.6 years, respectively.

Characteristics of Nonimmune Isolated AV Block in Children

A cohort of 141 white children affected by a nonimmune isolated AV block was compiled. Their characteristics and long-term outcomes have been published elsewhere.¹⁰ Briefly, AV block was asymptomatic in 119 patients (84.4%) and complete in 100 (70.9%). Incomplete AV block progressed to complete in 29 patients (70.7%) with incomplete block. At 10 years' time, the proportion of children with incomplete block was $81.1\% \pm 3.6\%$. Narrow QRS complexes were present in 18 (69.2%) of 26 patients with congenital AV block and 106 (92.2%) of 115 with childhood AV block. Pacemakers were implanted in 112 children (79.4%), during the first year of life in 18 (16.1%) and before 10 years of age in 90 (80.4%). The median (25th–75th percentile) time to pacemaker implantation was 2.0 (0–8.5) years. The pacing indication was prophylactic in 70 children (62.5%). During a median (25th–75th percentile) follow-up of 11 (6–16.5)

Table 1. Characteristics of ECG Parameters in Parents and Matched Control Subjects

| | Parents (n=130) | Control Subjects (n=130) | P Value |
|---------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------|
| Male/female sex ratio | 0.88 | 0.88 | |
| Age at ECG, y | | | |
| Mean \pm SD | 42.0 ± 7 | 42.0 ± 7 | |
| Median (minimum–maximum) | 41 (24–65) | 40 (25–62) | |
| Heart rate, bpm | | | 0.69 |
| Mean \pm SD | 69 ± 12.0 | 68 ± 10.0 | |
| Median (minimum–maximum) | 69 (48–100) | 65 (47–92) | |
| P wave, ms | | | <0.001 |
| Mean \pm SD | 98.2 ± 22.3 | 88.6 ± 12.8 | |
| Median (minimum–maximum) | 98 (47–188) | 87 (56–125) | |
| PR interval, ms | | | 0.33 |
| Mean \pm SD | 165 ± 39 | 156 ± 19 | |
| Median (minimum–maximum) | 157 (97–313) | 160 (110–200) | |
| QRS complex, ms | | | <0.001 |
| Mean \pm SD | 109 ± 29 | 73 ± 13 | |
| Median (minimum–maximum) | 105 (55–247) | 74 (41–110) | |
| QRS axis, ° | | | 0.15 |
| Mean \pm SD | 38 ± 47 | 46 ± 29 | |
| Median (minimum–maximum) | 60 (–140 to 140) | 60 (–60 to 100) | |
| QT interval, ms | | | <0.001 |
| Mean \pm SD | 408 ± 69 | 372 ± 30 | |
| Median (minimum–maximum) | 392 (245–587) | 370 (317–451) | |
| Corrected QT interval, ms | | | 0.002 |
| Mean \pm SD | 423 ± 36 | 408 ± 25 | |
| Median (minimum–maximum) | 417 (350–549) | 405 (360–462) | |

All conduction intervals were significantly longer in parents than in control subjects. No difference appeared when heart rates in the 2 groups were compared.

years, no patient died or developed dilated cardiomyopathy. At the time of last follow-up, children's median (minimum–maximum) age was 15 (2–34) years. No complications occurred during long-term follow-up in 127 children (90.1%).

Family History

None of the parents or control subjects had a personal history of unexplained syncope, known conduction disorders, or pacemaker implantation. A family history of sudden death was found in 1 parent (1.4%) and no control subjects ($P=1.0$). PCCD history was found in 8 parents (11.1%) and no control subjects ($P=0.01$). No family history of congenital or childhood AV block was found in the 2 groups. No consanguineous marriages were known in the families of affected children.

Screening ECG Analysis

All parents and control subjects were asymptomatic and in sinus rhythm except for 1 asymptomatic parent in whom previously

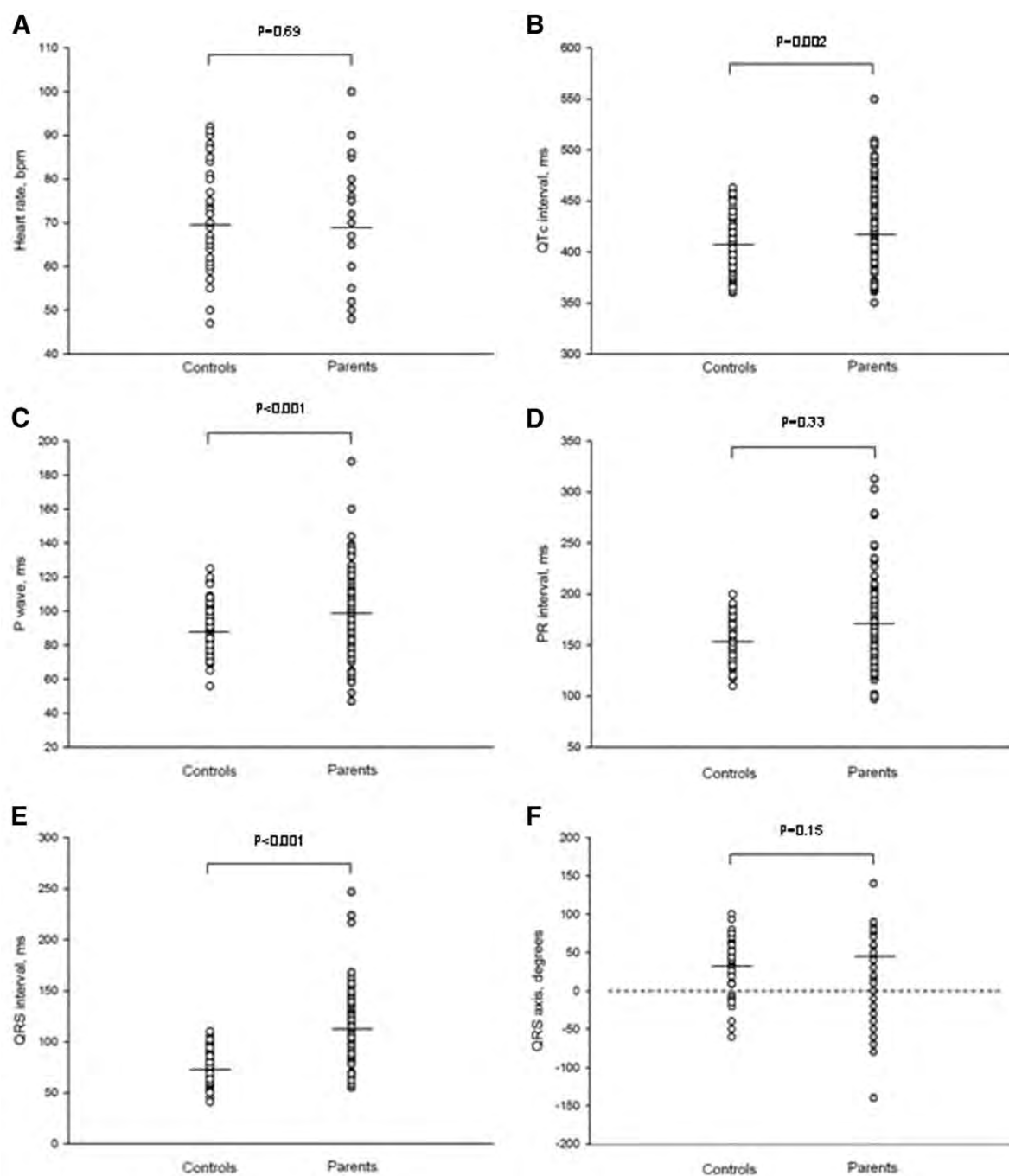


Figure 2. Comparison of heart rate (A), QRS axis (F), and different conduction intervals between parents and matched control subjects. P wave (C), PR interval (D), QRS complex (E), corrected QT interval (QTc) (B) durations were longer in parents than in control subjects. No differences appeared when heart rate and QRS axis were compared in the 2 groups.

undetected permanent complete AV block with broad QRS complex escape rhythm was found (Figure 1). ECG characteristics are presented in Table 1 and Figure 2. P wave, QRS complex, QT interval, and corrected QT-interval durations were significantly longer in parents than in control subjects. No significant difference was found when we compared heart rate, PR interval, and QRS axis in the 2 groups. Conduction abnormalities were more frequent in parents than in control subjects (Table 2), respectively found in 66 (50.8%) and 6 (4.6%)

individuals ($P<0.001$). PR interval was prolonged in 24 parents (18.5%) but in no control subjects ($P<0.0001$). Complete or incomplete RBBB was observed in 51 parents (39.2%) and 2 control subjects (1.5%; $P<0.0001$). Incomplete RBBB was significantly more frequent in parents than in control subjects, found in 16 (12.3%) versus 2 (1.5%) cases, respectively ($P<0.001$). Complete or incomplete LBBB was found in 20 parents (15.4%) and 4 control subjects (3.1%; $P<0.0006$). Intraventricular conduction defect of any type (RBBB, LBBB,

Table 2. Subclinical Characterized Conduction Disturbances in Parents and Matched Control Subjects

| | Parents, n (%) | Control Subjects, n (%) | P Value |
|---|-------------------|-------------------------------|---------|
| Sinus bradycardia | 14 (10.7) | 12 (9.2) | 0.67 |
| Normal AV and intraventricular conduction | 64 (49.3) | 124 (95.4) | <0.001 |
| Isolated incomplete RBBB | 13 (10.0) | 2 (1.5) | 0.004 |
| Incomplete RBBB+LAFB | 2 (1.5) | 0 (0) | 0.16 |
| Isolated complete RBBB | 16 (12.3) | 0 (0) | <0.0001 |
| Complete RBBB+LAFB | 4 (3.1) | 0 (0) | 0.05 |
| Isolated LAFB | 5 (3.8) | 4 (3.1) | 0.74 |
| Isolated LPFB | 0 (0.0) | 0 (0) | |
| Isolated incomplete LBBB | 2 (1.5) | 0 (0) | 0.16 |
| Isolated complete LBBB | 0 (0.0) | 0 (0) | |
| Isolated first-degree AVB | 7 (5.4) | 0 (0) | 0.008 |
| First-degree AVB+incomplete RBBB | 1 (0.8) | 0 (0) | 0.32 |
| First-degree AVB+complete RBBB | 7 (5.4) | 0 (0) | 0.008 |
| First-degree AVB+complete RBBB+LAFB | 5 (3.8) | 0 (0) | 0.02 |
| First-degree AVB+LAFB | 3 (2.3) | 0 (0) | 0.08 |
| Third-degree AVB | 1 (0.8) | 0 (0) | 0.32 |
| PR prolongation | 24 (18.5) | 0 (0) | <0.0001 |
| Impaired conduction in the RBBB | 51 (39.2) | 2 (1.5) | <0.0001 |
| Impaired conduction in the LBBB | 20 (15.4) | 4 (3.1) | <0.0006 |

AV indicates atrioventricular; RBBB, right bundle-branch block; LBBB, left bundle-branch block; LAFB, left anterior fascicular block; LPFB, left posterior fascicular block; and AVB, atrioventricular block.

left-axis deviation, right-axis deviation) was observed in 59 parents (45.4%) and 6 control subjects (4.6%; $P<0.0001$). Sinus bradycardia was not found in a statistically different proportion in the 2 groups (Figure 3). Among the 57 trios (made up of a child and his or her 2 parents) with available ECGs, cardiac conduction impairment was found in at least 1 parent of 39 children (68.4%) and in both parents of 17 children (29.8%).

Heritability Estimate

The heritability estimate for isolated conduction disturbances was very high, calculated at $h^2=91\%$ (95% confidence interval, 80%–100%). Individuals with at least 1 parent presenting with asymptomatic conduction impairment had a 6-fold increased relative risk of presenting with isolated nonimmune AV block.

Phenotype of Children According to Parents

Children were classified in 3 groups, respectively, of having 0, 1, or 2 parents presenting with subclinical conduction abnormalities (Table 3). No difference was found to be significant when the 3 groups were compared one to each other. Severity of conduction disorders in children, evaluated by age at diagnosis, time of progression from incomplete to complete heart block, baseline heart rate, presence of block-related symptoms, and age at cardiac pacing, did not differ significantly in these groups.

Genetic Study in Children

SCN5A gene screening was performed in 97 children and led to the identification of 2 different mutations in 2 children (p.Thr1806SerfsX27 and p.Arg367His). The p.Thr1806SerfsX27 mutation carrier was diagnosed at 7 years of age with first-degree AV block; the mutation was also found in her father, who was affected by a cardiac conduction defect (first-degree AV block, complete RBBB, and left anterior hemiblock). For the second mutation, the child was diagnosed at 12 months with a 2/1 AV block. The mutation was inherited from his mother, who did not present with any conduction block; however, pacemakers had been implanted in his maternal aunt and grandmother (no ECG or DNA available). This mutant p.Arg367His has been described in Brugada syndrome and early repolarization syndrome cases and failed to generate any current.^{17–19}

Discussion

The aim of the present study was to evaluate the hypothesis that idiopathic AV block in the young may be a heritable disease. Parental ECG screening performed in a large cohort of children with pediatric idiopathic heart block provided strong evidence for a genetic origin in congenital and childhood nonimmune isolated AV block.

ECG screening in asymptomatic parents of children affected by idiopathic AV block revealed a high prevalence of impaired cardiac conduction characterized by a long P wave and prolonged PR and QRS intervals, indicative of intra-atrial, AV, and intraventricular conduction abnormalities. Moreover, well-characterized conduction disturbances were more frequent in parents than control subjects, mainly consisting of first-degree AV block, complete or incomplete RBBB, and left-axis deviation. The very low rate of conduction abnormalities observed in control subjects was comparable with that of historical studies reporting ECG findings in the general population. In a series of 122 043 asymptomatic adults, the prevalence of first-degree AV block, complete RBBB, and complete LBBB was reported to be 6.5, 1.8, and 0.13 per 1000, respectively, in this age group.^{16,20,21} In addition, we found that congenital and childhood isolated nonimmune AV block is a highly heritable trait, because almost 95% of variation in the presence of the trait was attributed to heritable factors.

A genetic contribution has been suggested for a long time by reports of familial clusters of isolated heart block segregation, which included some rare pediatric cases.^{1,3,4,22,23} Similarly, some affected children have been described in large families in whom *SCN5A* and *TRPM4* have been identified as the genes causing the conduction defect, but their ECG phenotype differed from the proband cases in the present study because they presented with intraventricular conduction impairment.

This is the first relatively large-scale study looking for heritability in a cohort with pediatric idiopathic heart block. The present findings demonstrate a high degree of inheritance and a strong genetic contribution in the pathogenesis of congenital and childhood nonimmune isolated AV block.

A family history of sudden death or conduction disturbances was not relevant to determine whether an isolated pediatric heart block may be inherited or not, because the vast majority of index cases had no known family history. To date,

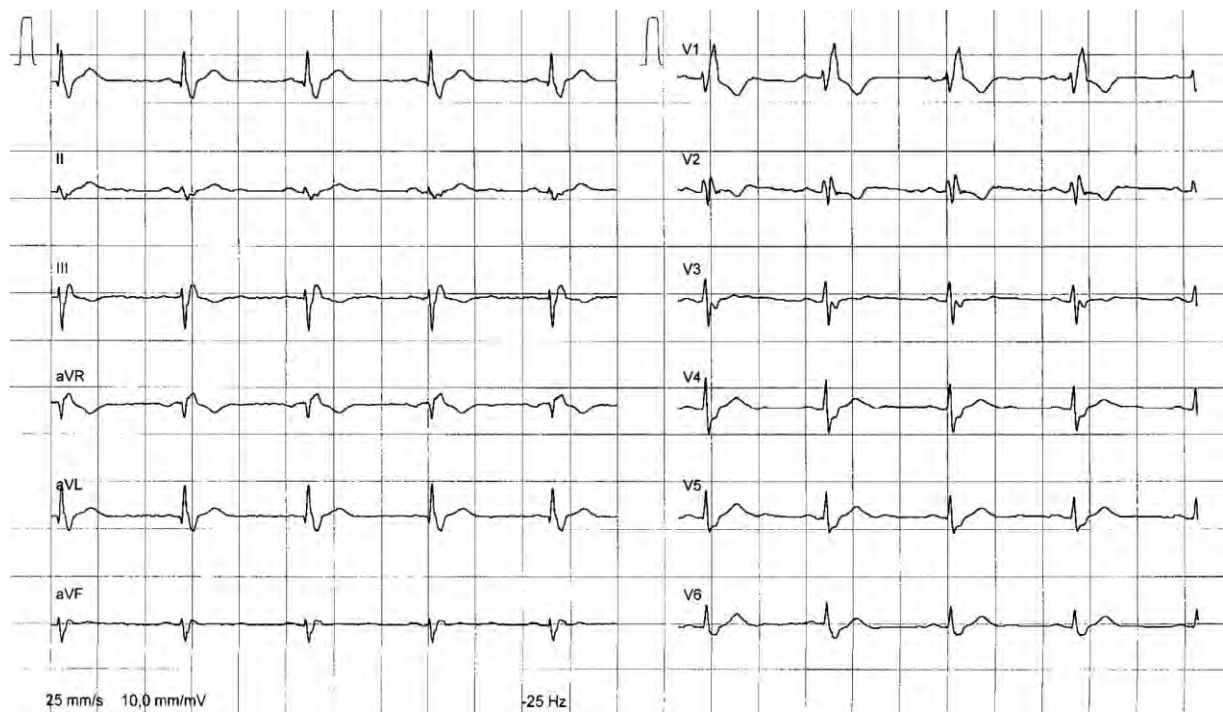


Figure 3. Screening ECG of a 48-year-old father showing sinus rhythm, complete right bundle-branch block, and left-axis deviation.

all published cases of inherited congenital or childhood isolated heart block have revealed an autosomal dominant inheritance in familial pedigrees, which suggests a major effect of the causative mutation.^{2–6,22–25} Our findings from parental screening make this transmission mode less probable here. The phenotype of our proband associates complete heart block with a narrow QRS complex, which differs from that reported to date in large affected families. These former data suggest that pediatric isolated AV block may have a distinct genetic background. The role of consanguinity has been discussed because this condition has been reported in some families with AV conduction defect, but no evidence of consanguineous marriages in families was found.²⁶ However, both parents were found to have subclinical conduction abnormalities in nearly 30% of the cases. Nonaffected parents may also be carriers of a variant with an incomplete penetrance. Parental phenotype appeared less severe than that of the children, mainly with diffuse conduction impairment but without complete heart block, except in 1 case. We hypothesize that parents may carry 1 or more allelic variant with a mild effect, which would explain the less severe phenotype. Once inherited from both parents, variants may cause more severe cardiac conduction disturbances in their progeny. This kind of transmission should correspond to a polygenic model of inheritance.

Surprisingly, we found different ECG phenotypes in children and their parents. Children were mainly diagnosed with permanent, complete AV block and narrow QRS escape rhythm. Those initially presenting with incomplete AV block progressed to a permanent, complete block in a short mean time and also had a narrow QRS complex. Only 17 (12.0%) of the 141 children were diagnosed with intraventricular

conduction abnormalities. In contrast, parental ECG screening revealed mainly bundle-branch defects, particularly RBBB and left-axis deviation, possibly associated with first-degree AV block. An isolated PR-interval prolongation without evidence of infrahisian conduction impairment was found in only 5% of the parents.

In 1901, Morquio first called attention to a familial segregation of cardiac conduction disorders.²⁶ Since then, several cases of familial heart block segregation have been reported in the literature. They can be classified into 3 distinct clinical entities: (1) PCCD or hereditary Lenègre disease, also designated by some authors as progressive familial heart block type I or hereditary bundle-branch defect^{2,4,22}; (2) progressive familial heart block type II²; and (3) hereditary progressive atrioventricular conduction defect.¹ Both a genetic background and congenital cases have been published for PCCD and progressive familial heart block type II.

PCCD is an autosomal dominant inherited disorder with incomplete penetrance, which phenotype associates RBBB possibly with right- or left-axis deviation or a prolonged PR interval.²⁷ Progression to complete heart block with a wide QRS escape rhythm can lead to syncope or sudden death. PCCD is an isolated conduction disorder, but some cases of dilated cardiomyopathy have been described in overlapping syndromes.²⁸ This is the most frequently reported type of hereditary heart block. To date, linkage analysis of large affected families has led to the identification of several causal mutations in 3 main genes^{4–6,23,28–34}: *SCN5A*, the gene encoding the α -subunit of the cardiac sodium channel; *SCN1B*, the gene encoding the function-modifying sodium channel β 1-subunit; and *TRPM4*, the gene encoding the transient receptor potential subfamily M member 4, a

Table 3. Comparison of Children's Characteristics in Groups With 0, 1, or 2 Affected Parents

| | No Affected Parent (n=18) | 1 Affected Parent (n=22) | 2 Affected Parents (n=17) | P Value |
|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------|
| Male/female sex ratio | 1.57 | 0.57 | 0.7 | 0.27 |
| Family history, n | | | | |
| PCCD | 1 | 3 | 3 | 0.46 |
| Congenital AV block | 0 | 0 | 0 | 1.0 |
| Childhood AV block | 0 | 0 | 0 | 1.0 |
| Sudden death | 0 | 1 | 0 | 0.45 |
| At diagnosis | | | | |
| Age at diagnosis, y | | | | |
| Mean±SD | 3.8±4.7 | 3.7±3.5 | 3.8±4.9 | 0.99 |
| Median (minimum-maximum) | 2.5 (0–19.0) | 3.0 (0–12.0) | 1.3 (0–15.0) | 0.71 |
| Congenital AV block, n (%) | 4 (22.2) | 3 (13.6) | 3 (17.6) | 0.78 |
| Childhood AV block, n (%) | 14 (77.8) | 19 (86.4) | 14 (82.4) | 0.78 |
| Complete AV block, n (%) | 14 (77.8) | 14 (63.6) | 10 (58.8) | 0.29 |
| Wide QRS complex, n (%) | 4 (22.2) | 2 (9.1) | 3 (17.6) | 0.51 |
| Heart rate, bpm, mean±SD | 56±15 | 55±16 | 62±24 | 0.68 |
| P wave, ms, mean±SD | 96±66 | 70±18 | 80±19 | 0.37 |
| QRS complex, ms, mean±SD | 82±23 | 81±36 | 89±35 | 0.78 |
| cQT interval, ms, mean±SD | 456±100 | 450±47 | 403±64 | 0.25 |
| At last follow-up | | | | |
| Follow-up time, y | 11.6±6.7 | 10.8±8.6 | 11.1±6.9 | 0.95 |
| PM implantation, n (%) | 13 (72.2) | 16 (72.7) | 12 (70.6) | 0.99 |
| Time,* mo | | | | |
| Median (minimum-maximum) | 6 (0–132) | 0 (0–300) | 13 (0–122) | 0.53 |
| Age at first PM, y | | | | |
| Mean±SD | 5.4±6.4 | 6.0±6.1 | 5.4±4.9 | 0.96 |
| Median (minimum-maximum) | 4 (0–22) | 5 (0–25) | 3 (0–15) | 0.34 |
| Mortality, n (%) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1.0 |

PCCD indicates progressive cardiac conduction defect; AV, atrioventricular; cQT, corrected QT; and PM, pacemaker.

*Time between AV block diagnosis and first pacemaker implantation.

calcium-activated nonselective cation channel. The *NKX2.5* gene, which encodes a homeobox transcription factor, has also been identified in isolated pediatric AV blocks, but a conduction defect is most often associated with a secundum atrial septal defect or tetralogy of Fallot.^{32,33}

Progressive familial heart block type II has been described in a South African family of European descent as an autosomal dominant cardiac disorder of adult onset. The pattern may present with associated isolated conduction disturbances, isolated dilated cardiomyopathy, or both.³⁴ Conduction impairment is characterized by sinus bradycardia and AV block with a narrow QRS complex. No gene has been identified yet, but a locus has been mapped to chromosome 1q32.2-q32.3.³⁵

Hereditary progressive atrioventricular conduction defect is a rare condition, transmitted in an autosomal dominant manner with incomplete penetrance. It has been described in a limited number of families, including congenital cases of AV block.^{1,36–38} ECG features were characterized by a progressive increase in AV conduction delay, from first-degree to complete AV block, with no associated intraventricular conduction defect.¹

In the present study, the ECG phenotype of affected parents was close to that described in PCCD with RBBB, possibly associated with PR prolongation or left- or right-axis

deviation, as in the historical descriptions of the idiopathic Lev-Lenègre disease.^{39,40} Interestingly, the ECG phenotype of their children was similar to that described in hereditary progressive atrioventricular conduction defect. No differences appeared when we compared children from 0, 1, or 2 affected parents. The mixing of these 2 distinct phenotypes in the same family is highly unusual, although we found it in 39 of 57 trios made up of an affected child and his or her 2 parents. Why the ECG phenotype differs between a child and his or her parents remains to be clearly elucidated. We have previously shown that the pathophysiology of the *SCN5A*-related hereditary Lenègre disease results from haploinsufficiency of the cardiac Na⁺ channel gene, which exacerbates physiological age-related progressive conduction slowing caused by fibrosis or an alternative process.³⁰ We hypothesize that children, despite the strong effect of inherited variants, may have a high safety factor that leads to sufficient impulse propagation for almost normal conduction in the His bundle and its branches. The hypothesis that the heart in the young human does not need all of the Na⁺ channels for proper impulse propagation has been proposed.³⁰ Compensatory mechanisms of an unknown nature could also explain the difference in the phenotype between a child and his or her parents. ECG follow-up of these children until adulthood would be of interest

to determine whether intraventricular conduction impairment would subsequently appear with aging.

Study Limitations

We did not initially perform cardiological screening of siblings and second-degree relatives. At the time we designed the present study, we believed that we could not clinically or ethically justify offering ECG screening to these families, because the chances of identifying clinically relevant findings seemed smaller than the possible side effects (such as psychological stress, unforeseen diagnostic findings outside this context, and health insurance refusal or complaint) that could arise from such screening. Given our results, we are now aware that an isolated AV block in the young, despite apparently being sporadic with no known family history, may also reveal familial transmission of conduction disturbances.

Another limitation is that only 57 trios (including a child and his or her 2 parents) were constituted. Analysis of more familial clusters should lead to the ability to find differences when children from 0, 1, or 2 affected parents are compared.

Conclusions

ECG screening in parents of children affected by idiopathic AV block revealed diffuse subclinical impairment of cardiac conduction, which provides strong evidence for a genetic origin in congenital and childhood nonimmune isolated AV block. The heritability estimate confirmed the high contribution of genetic factors. Extensive investigations are now needed to assess family pedigrees and to determine the mode of transmission, which would open the field to further molecular studies.

Acknowledgment

The authors thank the Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale of the French Society of Cardiology for supporting this study.

Sources of Funding

This study was supported in part by grants from PHRC 2004 R20/07 and 2010 from the University Medical Center of Nantes, France; the 2009 Philippe Coumel Research Grant from the French Society of Cardiology; grant No. 05 CVD 01 (Preventing Sudden Death) from the Foundation Leducq Trans-Atlantic Network of Excellence; Agence Nationale de la Recherche grant 05-MRAR-028; and Fondation pour la Recherche Médicale, "Aging and Cardiac Conduction: Genetics and Pathophysiology of Progressive Conduction Defects."

Disclosures

None.

References

- Lynch HT, Mohiuddin S, Sketch MH, Krush AJ, Carter S, Runco V. Hereditary progressive atrioventricular conduction defect: a new syndrome? *JAMA*. 1973;225:1465–1470.
- Brink AJ, Torrington M. Progressive familial heart block: two types. *S Afr Med J*. 1977;52:53–59.
- Gazes PC, Culler RM, Taber E, Kelly TE. Congenital familial cardiac conduction defects. *Circulation*. 1965;32:32–34.
- 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;23:20–21.
- Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott J-J, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld ACP, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann H-E, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AAM, Roden DM, Bezzina CR. Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest*. 2008;118:2260–2268.
- Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I, Schulze-Bahr E, Brink P, Pongs O. Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest*. 2009;119:2737–2744.
- Holm H, Gudbjartsson DF, Arnar DO, Thorleifsson G, Thorgeirsson G, Stefansdottir H, Gudjonsson SA, Jonasdottir A, Mathiesen EB, Njølstad I, Nymes A, Wilsgaard T, Hald EM, Hveem K, Stoltenberg C, Lochen M-L, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nat Genet*. 2010;42:117–122.
- Pfeufer A, van Noord C, Marcianti KD, Arking DE, Larson MG, Smith AV, Tarasov KV, Müller M, Sotoodehnia N, Sinner MF, Verwoert GC, Li M, Kao WHL, Köttgen A, Coresh J, Bis JC, Psaty BM, Rice K, Rotter JI, Rivadeneira F, Hofman A, Kors JA, Stricker BHC, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Beckmann BM, Sauter W, Gieger C, Lubitz SA, Newton-Cheh C, Wang TJ, Magnani JW, Schnabel RB, Chung MK, Barnard J, Smith JD, Van Wagoner DR, Vasan RS, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB, Launer LJ, Najjar SS, Lakatta E, Schlessinger D, Uda M, Abecasis GR, Müller-Myhsok B, Ehret GB, Boerwinkle E, Chakravarti A, Soliman EZ, Lunetta KL, Perz S, Wichmann H-E, Meitinger T, Levy D, Gudnason V, Ellinor PT, Sanna S, Kääh S, Witteman JCM, Alonso A, Benjamin EJ, Heckbert SR. Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet*. 2010;42:153–159.
- Sotoodehnia N, Isaacs A, de Bakker PI, Dörr M, Newton-Cheh C, Nolte IM, van der Harst P, Müller M, Eijgelsheim M, Alonso A, Hicks AA, Padmanabhan S, Hayward C, Smith AV, Polasek O, Giovannone S, Fu J, Magnani JW, Marcianti KD, Pfeufer A, Gharib SA, Teumer A, Li M, Bis JC, Rivadeneira F, Aspelund T, Köttgen A, Johnson T, Rice K, Sie MP, Wang YA, Klopp N, Fuchsberger C, Wild SH, Mateo Leach I, Estrada K, Völker U, Wright AF, Asselbergs FW, Qu J, Chakravarti A, Sinner MF, Kors JA, Petersmann A, Harris TB, Soliman EZ, Munroe PB, Psaty BM, Oostra BA, Cupples LA, Perz S, de Boer RA, Uitterlinden AG, Völzke H, Spector TD, Liu FY, Boerwinkle E, Dominiczak AF, Rotter JI, van Herpen G, Levy D, Wichmann HE, van Gilst WH, Witteman JC, Kroemer HK, Kao WH, Heckbert SR, Meitinger T, Hofman A, Campbell H, Folsom AR, van Veldhuisen DJ, Schwenbacher C, O'Donnell CJ, Volpato CB, Caulfield MJ, Connell JM, Launer L, Lu X, Franke L, Fehrmann RS, te Meerman G, Groen HJ, Weersma RK, van den Berg LH, Wijmenga C, Ophoff RA, Navis G, Rudan I, Snieder H, Wilson JF, Pramstaller PP, Siscovick DS, Wang TJ, Gudnason V, van Duijn CM, Felix SB, Fishman GI, Jamshidi Y, Stricker BH, Samani NJ, Kääh S, Arking DE. Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nat Genet*. 2010;42:1068–1076.
- Baruteau A-E, Fouchard S, Behaghel A, Mabo P, Villain E, Thambo J-B, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepeie A, Guillaumont S, Godart F, Bonnet C, Fraisse A, Schleich J-M, Lusson J-R, Dulac Y, Leclercq C, Daubert J-C, Schott J-J, Le Marec H, Probst V. Characteristics and long-term outcome of non-immune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicentre study. *Eur Heart J*. 2012;33:622–629.
- Yamamoto AM, Amoura Z, Johannet C, Jeronimo AL, Campos H, Koutouzov S, Piette JC, Bach JF. Quantitative radioligand assays using de novo-synthesized recombinant autoantigens in connective tissue diseases: new tools to approach the pathogenic significance of anti-RNP antibodies in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2000;43:689–698.
- Brucato A, Jonzon A, Friedman D, Allan LD, Vignati G, Gasparini M, Stein JJ, Montella S, Michaelsson M, Buyon J. Proposal for a new definition of congenital complete atrioventricular block. *Lupus*. 2003;12:427–435.
- Rautaharju PM, Surawicz B, Gettes LS, Bailey JJ, Childers R, Deal BJ, Gorgels A, Hancock EW, Josephson M, Kligfield P, Kors JA, Macfarlane P, Mason JW, Mirvis DM, Okin P, Pahlm O, van Herpen G, Wagner GS, Wellens H. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part IV: the ST segment, T and U waves, and the QT interval: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society: endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:982–991.
- Surawicz B, Childers R, Deal BJ, Gettes LS, Bailey JJ, Gorgels A, Hancock EW, Josephson M, Kligfield P, Kors JA, Macfarlane P, Mason JW, Mirvis DM, Okin P, Pahlm O, Rautaharju PM, van Herpen G,

- Wagner GS, Wellens H. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part III: intraventricular conduction disturbances: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society: endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *Circulation*. 2009;119:e235–240.
15. Elizari MV, Acunzo RS, Ferreiro M. Hemiblocks revisited. *Circulation*. 2007;115:1154–1163.
 16. Johnson RL, Averill KH, Lamb LE. Electrocardiographic findings in 67,375 asymptomatic subjects.: VII: atrioventricular block. *Am J Cardiol*. 1960;6:153–177.
 17. Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, Aihara N, Nademane K, Brugada R, Brugada J, Veerakul G, Li H, Bowles NE, Brugada P, Antzelevitch C, Towbin JA. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet*. 2002;11:337–345.
 18. Hong K, Berruazo-Sanchez A, Pongvarin N, Oliva A, Vatta M, Brugada J, Brugada P, Towbin JA, Dumaine R, Piñero-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;15:64–69.
 19. Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:874–881.
 20. Averill KH, Lamb LE. Electrocardiographic findings in 67,375 asymptomatic subjects, I: incidence of abnormalities. *Am J Cardiol*. 1960;6:76–83.
 21. Hiss RG, Lamb LE. Electrocardiographic findings in 122,043 individuals. *Circulation*. 1962;25:947–961.
 22. Stephan E. Hereditary bundle branch system defect: survey of a family with four affected generations. *Am Heart J*. 1978;95:89–95.
 23. Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balse JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature*. 2001;409:1043–1047.
 24. Sarachek NS, Leonard JL. Familial heart block and sinus bradycardia: classification and natural history. *Am J Cardiol*. 1972;29:451–458.
 25. Nounira S, Kamoun I, Ouragini H, Charfeddine C, Mahjoub H, Ouechati F, Bchetnia M, Ben Halima A, Abdelhak S, Kachboura S. Clinical and genetic investigation of atrial septal defect with atrioventricular conduction defect in a large consanguineous Tunisian family. *Arch Med Res*. 2008;39:429–433.
 26. Morquio. Sur une maladie infantile et familiale caractérisée par des modifications permanentes du pouls, des attaques syncopales et épileptiformes et la mort subite. *Arch Med Enfants*. 1901;4:467–475.
 27. Lenegre J. Etiology and pathology of bilateral bundle branch block in relation to complete heart block. *Prog Cardiovasc Dis*. 1964;6:409–444.
 28. Brink PA, Ferreira A, Moolman JC, Weymar HW, van der Merwe PL, Corfield VA. Gene for progressive familial heart block type I maps to chromosome 19q13. *Circulation*. 1995;91:1633–1640.
 29. Wang DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL, Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation*. 2002;105:341–346.
 30. de Meeus A, Stephan E, Debrus S, Jean MK, Loiselet J, Weissenbach J, Demaille J, Bouvagnet P. An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Circ Res*. 1995;77:735–740.
 31. Liu H, El Zein L, Kruse M, Guinamard R, Beckmann A, Bozio A, Kurtbay G, Mégarbané A, Ohmert I, Blaysat G, Villain E, Pongs O, Bouvagnet P. Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:374–85.
 32. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest*. 1999;104:1567–1573.
 33. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*. 1998;281:108–111.
 34. Fernandez P, Corfield VA, Brink PA. Progressive familial heart block type II (PFHBII): a clinical profile from 1977 to 2003. *Cardiovasc J Afr*. 2004;15:129–132.
 35. Fernandez P, Moolman-Smook J, Brink P, Corfield V. A gene locus for progressive familial heart block type II (PFHBII) maps to chromosome 1q32.2-q32.3. *Hum Genet*. 2005;118:133–137.
 36. Wright FS, Adams P Jr, Anderson RC. Congenital atrioventricular dissociation due to complete or advanced atrioventricular heart block: clinical and cardiac catheterization findings in twelve children without cardiac malformations, including three siblings. *AMA J Dis Child*. 1959;98:72–79.
 37. Wallgren G, Agorio E. Congenital complete A-V block in three siblings. *Acta Paediatr*. 1960;49:49–56.
 38. Lynch RJ, Engle MA. Familial congenital complete heart block: its occurrence in 2 children with another genetically determined anomaly. *Am J Dis Child*. 1961;102:210–217.
 39. Lev M. Anatomic basis for atrioventricular block. *Am J Med*. 1964;37:742–748.
 40. Lenegre J, Moreau P. Chronic auriculo-ventricular block: anatomical, clinical and histological study [in French]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1963;56:867–888.

CLINICAL PERSPECTIVE

The origin of congenital or childhood nonimmune isolated atrioventricular (AV) block remains unknown. Because familial clustering of progressive cardiac conduction defects of unknown causes, including congenital AV block, has been reported, we hypothesized that idiopathic AV block in the young may be a heritable disease. This hypothesis was tested in a nationwide (France) retrospective cohort of 141 idiopathic pediatric AV blocks. Screening ECGs from 130 parents (mean age 42.0 ± 6.8 years, 57 couples) were compared with 130 matched healthy control subjects. Although a family history of sudden death or progressive cardiac conduction defect, respectively, was found in only 1.4% and 11.1% of parents, conduction abnormalities were more frequent in parents than in control subjects, found in 50.8% versus 4.6%, respectively ($P < 0.001$), and estimated heritability for isolated conduction disturbances was 91% (standard error, 1.019; $P = 2.10^{-16}$). SCN5A mutation screening identified 2 mutations in 2 patients among 97 children. Thus, ECG screening in parents of children affected by idiopathic AV block revealed diffuse subclinical impairment of cardiac conduction, which provides strong evidence for a genetic origin in congenital and childhood nonimmune isolated AV block. Such an ECG screening may be helpful in clinical practice if other obvious causes have been ruled out. Heritability estimate confirmed a high contribution of genetic factors, which opens the field to further molecular studies.

IV- Etude #3: ETUDE DES GÈNES DES CONNEXINES (*GJA5*, *GJA1*, *GJC1*)

IV.1- Rappel sur les connexines

Les jonctions communicantes participent à la conduction de proche en proche au sein du système de conduction cardiaque. Elles sont constituées de canaux intercellulaires, ou canaux jonctionnels, agrégés dans des zones membranaires spécialisées appelées jonctions communicantes ou « gap junctions » (Figure 3-4). Chaque canal est constitué par l'assemblage de deux héli-canaux (connexons), un dans chacune des membranes adjacentes. Il met directement en communication les cytoplasmes des deux cellules, assurant une continuité cytoplasmique. Les canaux homotypiques sont constitués de deux connexons identiques et symétriques; les canaux hétérotypiques, de deux connexons dissemblables. Les canaux jonctionnels s'agrègent pour former des jonctions communicantes, dans lesquelles l'espace intermembranaire est réduit à 2–3 nm (le gap résiduel entre les membranes). Chaque connexon est formé par l'assemblage de 6 protéines transmembranaires nommées connexines (Cx), distinguées par leur masse moléculaire théorique (par exemple Cx43 pour celle de 43 kDa). Quatre connexines (Cx31.9, Cx40, Cx43, Cx45) sont présentes dans les cardiomyocytes de mammifères avec des patrons d'expression spécifiques [Jansen *et al*, 2010; Temple *et al*, 2010]. Alors que les Cx40, Cx43 et Cx45 sont fortement exprimées dans les tissus nodaux et/ou le faisceau de His et ses branches, la Cx31.9 est peu exprimée dans la jonction atrioventriculaire et le faisceau de His (Figures 3-5 et 3-6).

Tous les cardiomyocytes sont donc interconnectés par des jonctions communicantes principalement localisées dans les disques intercalaires [Greener *et al*, 2011]. Le nombre de canaux dans une jonction communicante varie de quelques unités à plusieurs milliers en fonction de l'espèce, du stade de développement du myocarde et du tissu cardiaque considéré. Le domaine C-terminal des connexines interviendrait dans la modulation de la perméabilité des canaux jonctionnels et dans les interactions des connexines avec des protéines partenaires qui, elles-mêmes, interfèrent avec l'activité des canaux [Greener *et al*, 2011; Lambiase *et al*, 2015].

Les canaux jonctionnels assurent entre les cellules la diffusion directe, de cytoplasme à cytoplasme, d'ions et de petites molécules (métabolites, seconds messagers, ARNi) de masse moléculaire inférieure ou égale à 1 kDa. Ils permettent ainsi aux cellules d'uniformiser leur potentiel électrique (couplage électrique) et chimique (couplage métabolique). Comparés aux autres canaux ioniques présents dans la membrane plasmique, ils ont pour particularité d'être peu sélectifs vis-à-vis des ions et d'avoir une probabilité d'ouverture élevée, assurant ainsi une communication intercellulaire permanente [Temple *et al*, 2010; Lambiase *et al*, 2015]. Le degré de couplage électrique entre deux cellules peut être mesuré par la technique du potentiel imposé en double patch-clamp, technique qui consiste à établir une différence de potentiel (potentiel transjonctionnel ou V_j) entre les deux cellules d'une paire isolée pour induire la diffusion de charges électriques via les canaux jonctionnels joignant les deux cellules. La mesure de l'intensité du courant jonctionnel (I_j), pour une différence de V_j donnée, permet de calculer la conductance

jonctionnelle globale ou macroscopique (Gj) entre deux cellules (Figure 3-7). Les valeurs de Gj, exprimées en nanoSiemens (nS) dépendent du type cellulaire interrogé. La perméabilité des canaux jonctionnels à des molécules fluorescentes (couplage diffusionnel ou dye coupling) peut également être étudiée par injection intracellulaire de composés fluorescents de petite taille soit à l'aide de micropipettes.

Les Cx40, Cx43 et Cx45 sont codées respectivement par les gènes *GJA5*, *GJA1* et *GJC1*.

a/ *GJA5* est un gène situé sur le chromosome 1 (position 1q21.1, 2 exons, ADN génomique de 17153 paires de bases, transcrit de 3177 paires de bases, accession number NM 005266) qui code pour la connexine 40 (protéine de 358 acides aminés, poids moléculaire de 40 kDa, accession number NP 005257);

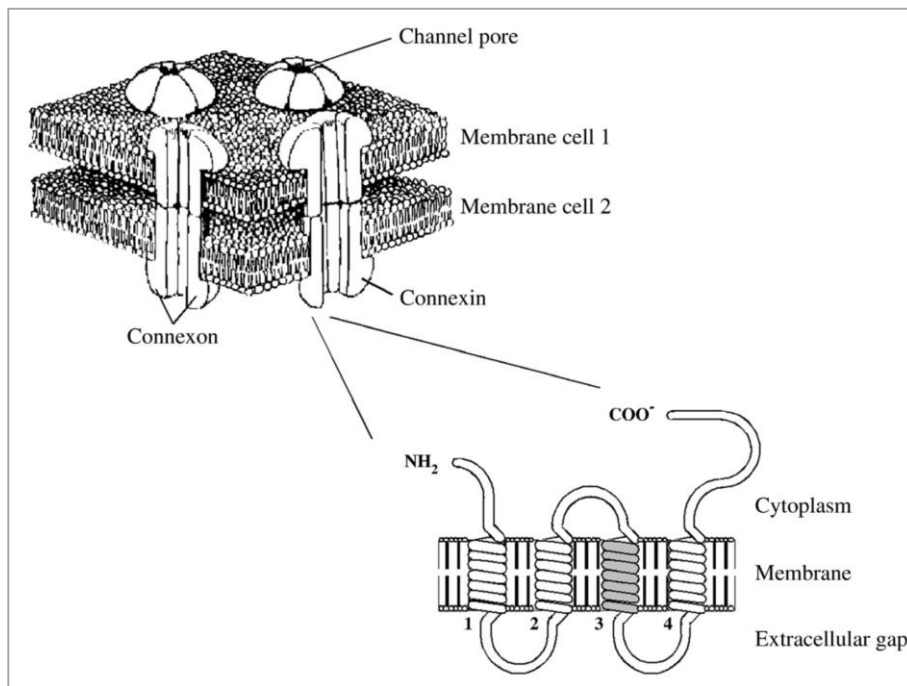
b/ *GJA1* est situé sur le chromosome 6 (position 6q21-q23.2, 2 exons, ADN génomique de 14129 paires de bases, transcrit de 3130 paires de bases, accession number NM 000165) code pour la connexine 43 (protéine de 382 acides aminés, poids moléculaire de 43 kDa, accession number NP 000156);

c/ *GJC1*, situé sur le chromosome 17 (position 17q21.31, 1 exon, ADN génomique de 32364 paires de bases, transcrit de 7640 paires de bases, accession number NM 001080383), qui code pour la connexine 45 (protéine de 396 acides aminés, poids moléculaire de 45 kDa, accession number NP 001073852).

IV.2- Problématique

Le trouble de conduction progressif héréditaire, encore appelé maladie de Lev-Lenègre familiale ou bloc progressif familial de type 1 ou "progressive familial heart block type I" (PFHBI, OMIM 113900) est une maladie rythmique héréditaire caractérisée par une altération progressive de la conduction de l'influx électrique dans le système de His-Purkinje. Les patients présentent des troubles de conduction intraventriculaires (bloc de branche droite, hémibloc antérieur gauche, hémibloc postérieur gauche, bloc complet). Ces troubles sont volontiers dégénératifs, et le suivi prospectif d'un sujet atteint peut mettre en évidence une altération de la conduction cardiaque, progressant d'un ECG normal, vers un bloc de branche droit ou gauche et ensuite vers le bloc complet. Les gènes *SCN5A* et *TRPM4* ont déjà été impliqués dans la physiopathologie de ce trouble conductif, mais ils ne sont retrouvés que dans un nombre limité de cas, justifiant d'investiguer d'autres gènes candidats.

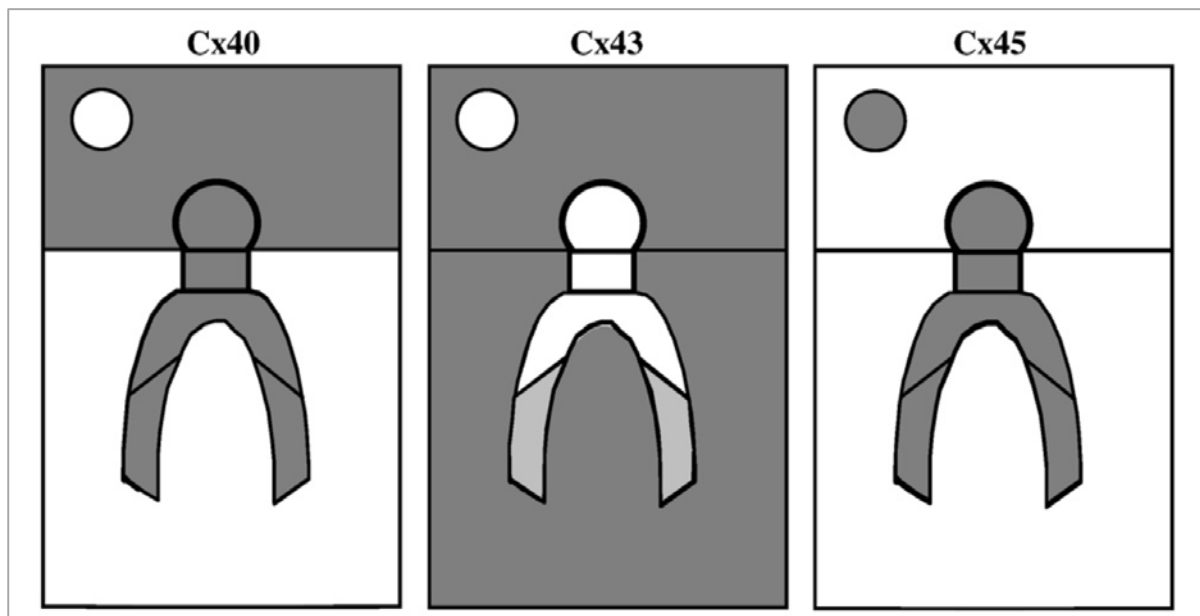
Figure 3-4: Représentation schématique d'une jonction communicante.



Chaque canal jonctionnel est formé de deux connexons, lui-même composé de six connexines.

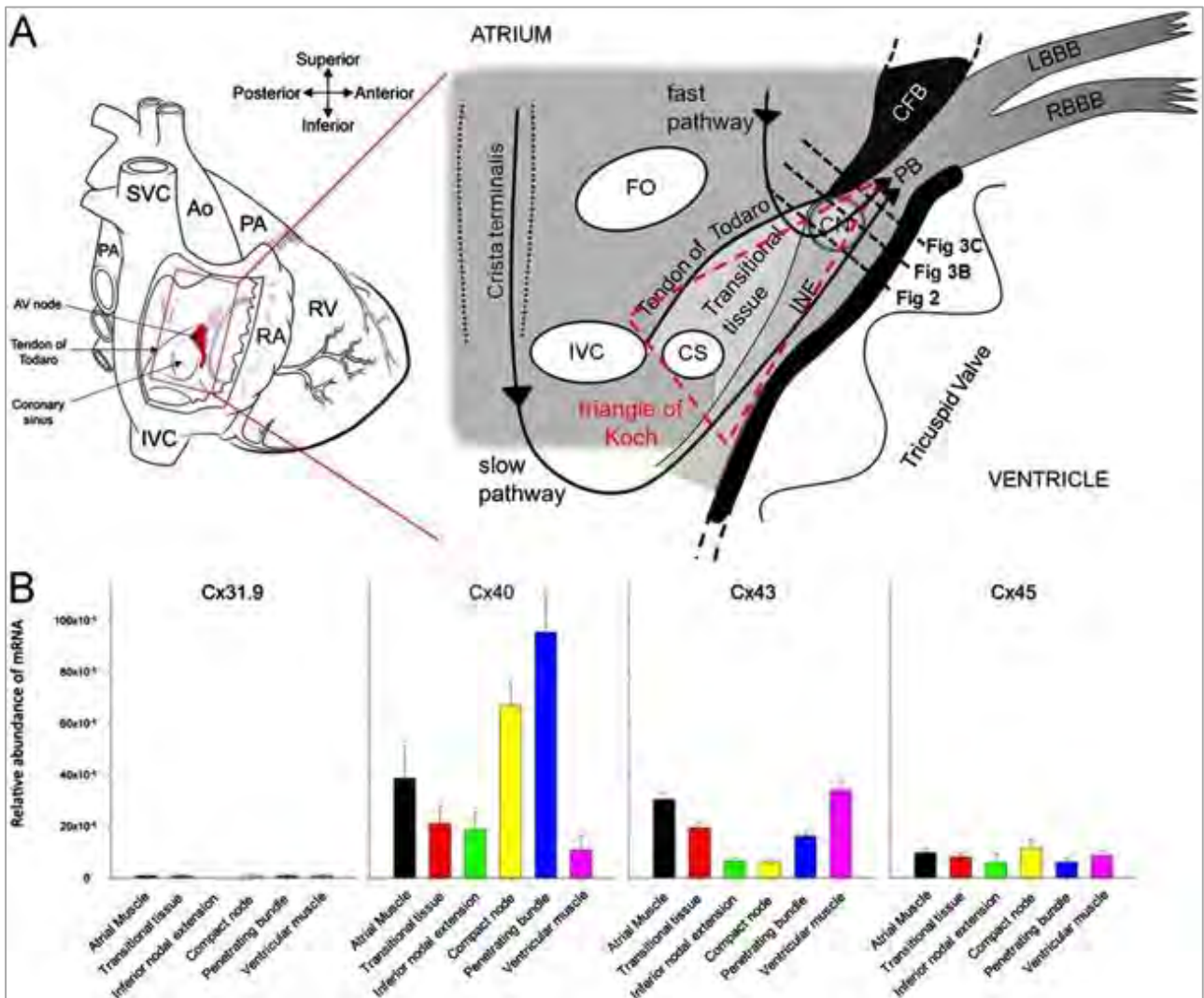
Adapté de [Jansen *et al*, 2010]

Figure 3-5: Patron d'expression des trois principales connexines cardiaques dans le coeur de souris adulte.



Adapté de [Jansen *et al*, 2010]

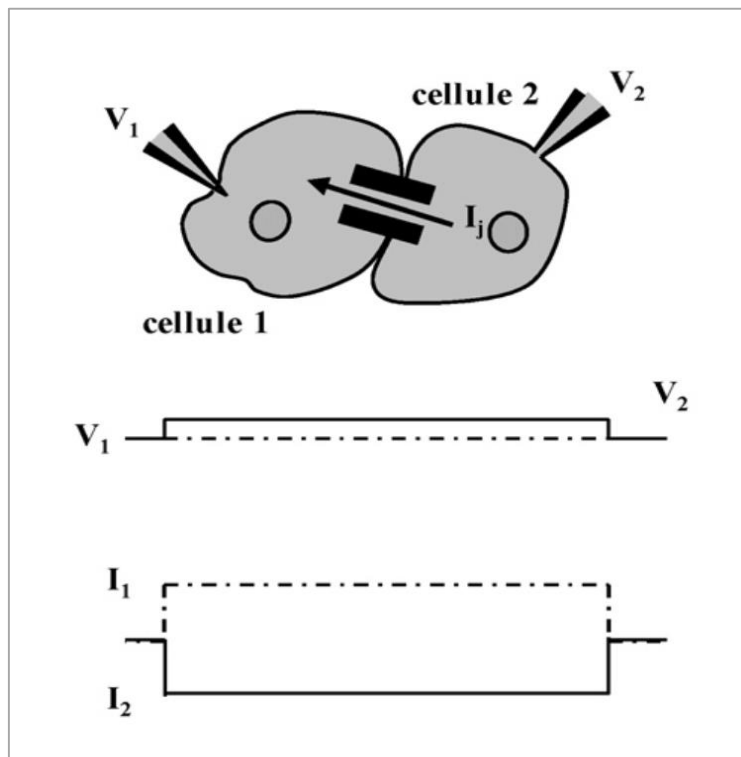
Figure 3-6: Profil d'expression de l'ARN messager des connexines cardiaques au sein de la jonction atrioventriculaire.



A: Anatomie du nœud atrioventriculaire, situé dans le triangle de Koch; B: Abondance relative des ARN messagers des 4 connexines cardiaques selon les régions de la jonction atrioventriculaire (cœur humain).

Adapté de [Temple *et al*, 2013 ; Greener *et al*, 2011]

Figure 3-7: Enregistrement des courants jonctionnels entre deux cellules d'une paire isolée par la technique du double patch-clamp.



Deux pipettes sont posées sur les membranes plasmiques, puis les petits patches de membrane situés sous leurs pointes sont rompus, mettant l'intérieur des pipettes en communication avec les cytoplasmes des cellules. Les cellules sont d'abord maintenues au m. me potentiel électrique ($V_1 = V_2$), proche de leur potentiel de repos. Puis une modification de V_2 est imposée tout en maintenant V_1 inchangé. Cette différence de potentiel transjonctionnel ($V_J = V_2 - V_1$) entre les cellules couplées génère un courant transjonctionnel (I_j) permettant de déterminer G_j .

Adapté de [Hervé et al, 2008]

IV.3- Objectif

L'objectif de ce travail était d'explorer l'association entre cette pathologie et les gènes connus pour être impliqués dans la propagation du potentiel d'action, et en particulier les gènes codant pour les connexines.

IV.4- Méthodologie

Une approche collaborative a permis de colliger 156 propositus de différentes origines ethniques (Europe, Asie, Amérique du Nord) porteurs du phénotype d'intérêt. Une approche gène candidat a conduit au séquençage direct des gènes *GJA5* (Connexine 40), *GJA1* (Connexine 43), *GJC1* (Connexine 45), *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *SCN1B*, *SCN4B* et *HCN4*. La méthodologie de ce travail est détaillée dans l'article #6.

Implication personnelle. Mon implication personnelle dans ce travail a consisté à vérifier et décrire les phénotypes cliniques et ECG des propositus, et à séquencer les gènes *SCN5A*, *SCN1B*, *GJA5*, *GJA1* et *GJC1* sur un échantillon de 48 cas index lors de mon stage de master-2 à l'institut du thorax.

IV.5- Principaux résultats

L'ensemble des résultats est détaillé dans l'article « **A connexin40 mutation associated with a malignant variant of progressive familial heart block type I** » (*Circulation Arrhythmia and Electrophysiology* 2012;5:163-172) présenté à la fin de cette section.

Les principaux résultats sont résumés ici. Un total de 12 gènes candidats ont été séquencés sur un échantillon de 156 propositus. Neuf mutations ont été identifiées dans *SCN5A*, 3 mutations dans *SCN1B* et une mutation germinale (Cx40-Q58L) a été mise en évidence au sein du gène *GJA5* (codant pour la connexine 40) dans une famille. L'expression hétérologue de Cx40-Q58L dans des cellules déficientes en connexine a conduit en une réduction franche de la conductance jonctionnelle (Cx40-wild type: 22.2 ± 1.7 nS, n=14; versus Cx40-Q58L: 0.56 ± 0.34 nS, n=14; $p < 0.001$) et une localisation diffuse des protéines immunoréactives au sein de la membrane plasmique, sans formation de jonctions communicantes. La cotransfection de Cx40-wild type et de Cx40-Q58L a conduit en une distribution homogène des protéines dans la membrane plasmique plutôt qu'en la formation de jonctions communicantes dans environ 50% des cellules, alors que des jonctions communicantes étaient identifiées dans l'autre moitié des cellules. Les caractéristiques des jonctions communicantes observées dans les cellules coexprimant Cx40-wild type et Cx40-Q58L était variable, la moitié des cellules transfectées ayant des jonctions communicantes individualisées alors que l'autre moitié des cellules montrait un profil d'expression

diffus et l'absence de jonctions communicantes caractérisées. La valeur de conductance jonctionnelle était corrélée avec la distribution des jonctions communicantes.

La mutation Cx40-Q58L altère la formation des jonctions communicantes et la propagation de l'influx électrique dans le système de conduction cardiaque. Il s'agit de la première publication rapportant la responsabilité d'une mutation germinale dans un des gènes codant pour les connexines, associée à un trouble de conduction chez l'homme.

A Connexin40 Mutation Associated With a Malignant Variant of Progressive Familial Heart Block Type I

Naomasa Makita, Akiko Seki, Naokata Sumitomo, Halina Chkourko, Shigetomo Fukuhara, Hiroshi Watanabe, Wataru Shimizu, Connie R. Bezzina, Can Hasdemir, Hideo Mugishima, Takeru Makiyama, Alban Baruteau, Estelle Baron, Minoru Horie, Nobuhisa Hagiwara, Arthur A.M. Wilde, Vincent Probst, Hervé Le Marec, Dan M. Roden, Naoki Mochizuki, Jean-Jacques Schott and Mario Delmar

Circ Arrhythm Electrophysiol. 2012;5:163-172; originally published online January 13, 2012;
doi: 10.1161/CIRCEP.111.967604

Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 1941-3149. Online ISSN: 1941-3084

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circep.ahajournals.org/content/5/1/163>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circep.ahajournals.org/content/suppl/2012/01/13/CIRCEP.111.967604.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* is online at:
<http://circep.ahajournals.org/subscriptions/>

A Connexin40 Mutation Associated With a Malignant Variant of Progressive Familial Heart Block Type I

Naomasa Makita, MD, PhD; Akiko Seki, MD, PhD; Naokata Sumitomo, MD, PhD;
Halina Chkourko, MS; Shigetomo Fukuhara, PhD; Hiroshi Watanabe, MD, PhD;
Wataru Shimizu, MD, PhD; Connie R. Bezzina, PhD; Can Hasdemir, MD; Hideo Mugishima, MD;
Takeru Makiyama, MD, PhD; Alban Baruteau, MD; Estelle Baron, BS; Minoru Horie, MD, PhD;
Nobuhisa Hagiwara, MD, PhD; Arthur A.M. Wilde, MD; Vincent Probst, MD, PhD;
Hervé Le Marec, MD; Dan M. Roden, MD; Naoki Mochizuki, MD, PhD;
Jean-Jacques Schott, PhD; Mario Delmar, MD, PhD

Background—Progressive familial heart block type I (PFHBI) is a hereditary arrhythmia characterized by progressive conduction disturbances in the His-Purkinje system. PFHBI has been linked to genes such as *SCN5A* that influence cardiac excitability but not to genes that influence cell-to-cell communication. Our goal was to explore whether nucleotide substitutions in genes coding for connexin proteins would associate with clinical cases of PFHBI and if so, to establish a genotype-cell phenotype correlation for that mutation.

Methods and Results—We screened 156 probands with PFHBI. In addition to 12 sodium channel mutations, we found a germ line *GJA5* (connexin40 [Cx40]) mutation (Q58L) in 1 family. Heterologous expression of Cx40-Q58L in connexin-deficient neuroblastoma cells resulted in marked reduction of junctional conductance (Cx40-wild type [WT], 22.2 ± 1.7 nS, $n=14$; Cx40-Q58L, 0.56 ± 0.34 nS, $n=14$; $P<0.001$) and diffuse localization of immunoreactive proteins in the vicinity of the plasma membrane without formation of gap junctions. Heteromeric cotransfection of Cx40-WT and Cx40-Q58L resulted in homogenous distribution of proteins in the plasma membrane rather than in membrane plaques in $\approx 50\%$ of cells; well-defined gap junctions were observed in other cells. Junctional conductance values correlated with the distribution of gap junction plaques.

Conclusions—Mutation Cx40-Q58L impairs gap junction formation at cell-cell interfaces. This is the first demonstration of a germ line mutation in a connexin gene that associates with inherited ventricular arrhythmias and emphasizes the importance of Cx40 in normal propagation in the specialized conduction system. (*Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012; 5:163-172.)

Key Words: heart block ■ genes ■ ion channels ■ death sudden ■ gap junctions

Cardiac myocyte excitability in atria, His-Purkinje system, and ventricles is largely determined by the properties of voltage-gated sodium channels. Once activated, excitatory currents rapidly propagate to neighboring cells through low-resistance intercellular channels called gap junctions, which facilitate the synchronous contraction of the heart.^{1,2} Loss of expression and function of cardiac gap junctions and sodium currents can severely impair action potential propagation,

which sets the stage for life-threatening arrhythmias.^{1,2} Although multiple mutations in genes coding for components of the voltage-gated sodium channel complex have been previ-

Clinical Perspective on p 172

ously described in relation to arrhythmias and sudden death in young persons³ and connexin40 (Cx40) mutations have been implicated in atrial fibrillation,^{4,5} no study has identified an

Received September 24, 2011; accepted January 9, 2012.

From the Department of Molecular Pathophysiology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, Japan (N. Makita); Cardiology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan (A.S., N.H.); Pediatrics and Child Health, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan (N.S., H.M.); Cardiology, New York University Medical School, New York, NY (H.C., M.D.); Cell Biology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Japan (S.F., N. Mochizuki); Cardiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan (H.W.); Cardiology, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Japan (W.S.); Experimental Cardiology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands (C.R.B., A.A.M.W.); Cardiology, Ege University School of Medicine, Bornova, Izmir, Turkey (C.H.); Cardiovascular Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan (T.M.); l'institut du thorax, INSERM UMR915, Nantes, France (E.B., V.P., H.L., J.-J.S.); Cardiovascular Medicine, Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan (M.H.); and Pharmacology and Medicine, Vanderbilt University, Nashville, TN (D.M.R.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circep.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCEP.111.967604/-DC1>.

Correspondence to Naomasa Makita, MD, PhD, Department of Molecular Pathophysiology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto, 852-8523 Nagasaki, Japan. E-mail makitan@nagasaki-u.ac.jp

© 2012 American Heart Association, Inc.

Circ Arrhythm Electrophysiol is available at <http://circep.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCEP.111.967604

Downloaded from <http://circep.ahajournals.org> at INSERM - DISC on December 13, 2013

association between germ line mutations in gap junction proteins and inherited ventricular arrhythmias in humans.

In this study, we investigated a group of patients with progressive familial heart block type I (PFHBI) (Online Mendelian Inheritance in Man 113900), also known as progressive cardiac conduction defect or Lenègre-Lev disease,^{6,7} is a dominant inherited disorder of the His-Purkinje system. Affected individuals show electrocardiographic evidence of bundle branch disease (ie, right bundle branch block, left anterior or posterior hemiblock, complete heart block) with broad QRS complexes. The disease can progress from a normal ECG to right bundle branch block and from the latter to complete heart block. Affected individuals often present with family history of syncope, pacemaker implantation, and sudden death.⁸ Although structural abnormalities have been invoked as a cause of the disease,^{6,7} a number of patients present with normal cardiac structure and contractile function. Linkage analysis in a large South African PFHBI kindred⁹ and a Lebanese kindred¹⁰ mapped a causal locus on chromosome 19q13.3, and further work identified mutations in genes encoding for the transient receptor potential nonselective cation channel, subfamily M, member 4 (*TRPM4*) gene¹¹ at this locus. Haploinsufficiency of *SCN5A* and aging have been implicated in PFHBI,⁸ and age-dependent manifestations of the disease have been recapitulated in mice.¹²

Here, we sought to expand on the association between PFHBI and mutations in genes relevant to action potential propagation; in particular, we assessed the possible association between nucleotide substitutions in connexin-coding genes and PFHBI. We evaluated 156 probands of diverse ethnic backgrounds from Asia, Europe, and North America given a clinical diagnosis of PFHBI. In addition to the sodium channel mutations previously reported,^{13–15} we identified a germ line missense mutation in *GJA5* in a family with severe, early onset disease. This gene codes for the gap junction protein connexin40 (Cx40), which predominantly expresses in the atria and His-Purkinje system.¹⁶ Heterologous expression experiments revealed that this novel mutation (Cx40-Q58L) significantly impaired the ability of Cx40 to form gap junction channels. Confocal microscopy showed that the Cx40-Q58L mutant but not the wild type (WT) failed to form plaques at sites of cell-cell apposition. Coexpression experiments indicated that the Cx40-WT protein provided only partial rescue of the Cx40-Q58L cellular phenotype. To our knowledge, this is the first description of a germ line mutation in a connexin gene associated with inherited ventricular arrhythmias. The results open the possibility of *GJA5* as a candidate gene for screening in patients with PFHBI, yet in the absence of further evidence, screening may be limited to the research environment rather than included as a part of the routine diagnostic examination.¹⁷ The data also emphasize the importance of Cx40 in the maintenance of normal propagation in the specialized conduction system of the human heart.

Methods

Genetic Screening of PFHBI

Genomic screening by polymerase chain reaction and DNA sequencing was performed for *GJA5* (Cx40), *GJA1* (Cx43), *GJCI* (Cx45), *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *SCN1B*,

SCN4B, *HCN4*. Primer information is provided in the online-only Data Supplement. All participating probands and family members gave written informed consent in accordance with standards (Declaration of Helsinki) and local ethics committees.

Plasmid Construction

A 1.1-kb Cx40-DNA fragment was subcloned into bicistronic plasmids pIRES2-EGFP and pIRES2-DsRED2. An EGFP or FLAG epitope was added at Cx40 C terminal to generate EGFP- or FLAG-tagged Cx40. Site-directed mutagenesis (Q58L) was performed with QuikChange. Primer information and additional details are provided in the online-only Data Supplement.

Cell Culture and Transfection

Constructs were introduced into connexin-deficient HeLa cells or mouse neuroblastoma (N2A) cells using Lipofectamine as per manufacturer's protocol.

Electrophysiology

Gap junction currents were recorded from transiently transfected N2A cell pairs using whole-cell double-patch clamp techniques as previously described.^{18,19} Further details are provided in the online-only Data Supplement.

Immunocytochemistry and Western Blotting

HeLa cells, transfected with pEGFPN1-Cx40-WT, pCMV-FLAG-Cx40-Q58L, or both, were stained with anti-FLAG M2 antibody and Alexa546-labeled secondary antibody. EGFP and Alexa546 fluorescence images were recorded by confocal microscopy. For western blotting, N2A cells were transiently transfected with 3 μ g of Cx40 plasmids. Two days after transfection, cells were lysed, and proteins were extracted and separated by conventional methods. Further details are provided in the online-only Data Supplement.

Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Mann-Whitney rank sum tests with Bonferroni post hoc correction were used in comparisons for which normality or equal variance assumptions were invalid. In other instances, differences between groups were assessed by 1-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc correction. Statistical significance was assumed for $P < 0.05$.

Results

Genetic Screening of PFHBI Probands

We genetically screened 156 probands given a clinical diagnosis of PFHBI. We identified 4 novel and 5 previously reported mutations in *SCN5A*,^{13,15} 3 mutations in *SCN1B*,¹⁴ and a novel germ line heterozygous missense mutation in exon 2 of the Cx40 gene *GJA5* (online-only Data Supplement Table I). Mutations were not found in connexin genes *GJA1* (Cx43) or *GJCI* (Cx45) or in the other genes screened (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *HCN4*, or *SCN4B*). Of the novel *SCN5A* mutations, 1 caused a modification of the amplitude and voltage gating kinetics of the sodium current in heterologously expressing cells (online-only Data Supplement Figure I); 3 other mutant constructs failed to express functional channels, suggesting that patients carrying the mutation were functionally haploinsufficient for Nav1.5 (online-only Data Supplement Figure I). The *GJA5* mutation (c.173A>T) caused an amino acid substitution (glutamine [Q] replaced by leucine [L]) at position 58 in Cx40 (Cx40-Q58L) (Figure 1A and 1B). The mutation was absent in 400 alleles from unaffected control subjects and in the other 155 PFHBI probands. Screening of the entire gene

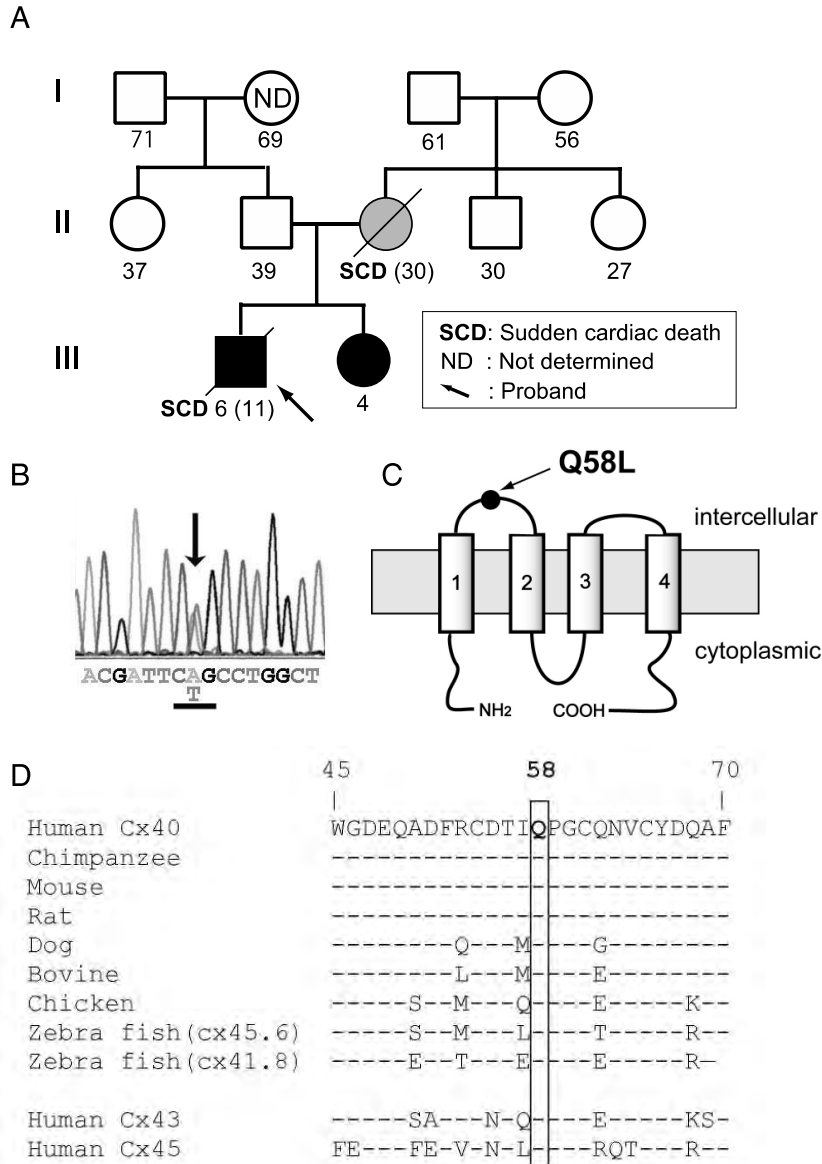


Figure 1. GJA5 mutation identified in a family given the clinical diagnosis of progressive familial heart block type I. **A**, Family pedigree. Genetically affected and unaffected individuals are shown with closed and open symbols, respectively. The hatched circle indicates the proband's mother not genotyped; clinical data suggest that she was a de novo mutation carrier. Number below each symbol indicates the age at registration or age of SCD (parenthesis). **B**, Sequence electropherogram of exon 2 GJA5 of proband. Arrow indicates heterozygous missense mutation of leucine (CTG) for glutamine-58 (CAG). **C**, Cx40 predicted membrane topology indicating position Q58 in first extracellular loop. **D**, Sequence alignment of human Cx40 and its homologues (residues 45–70). Notice the conservation in human Cx43 and Cx45. Dashes indicate residues identical with the top sequence. Cx indicates connexin.

panel (including *SCN5A* and *SCN1B*) revealed no other sequence modification in the DNA of this proband. Topological analysis placed amino acid 58 of Cx40 within the first extracellular loop (Figure 1C). The presence of glutamine in this position is highly conserved among *GJA5* orthologs, and 2 other cardiac connexins, Cx43 and Cx45 (Figure 1D). The clinical and genotypic characteristics of proband and tested family members are described next.

Clinical Phenotypes and Genotype of the PFHBI Pedigree With the GJA5 Mutation

The proband, an 11-year-old boy at time of death, was first referred for evaluation when he was age 6 years because of ECG abnormalities. Although asymptomatic at that time, his ECG showed advanced atrioventricular block, complete left bundle branch block, and left axis deviation (Figure 2A). Echocardiography and cardiac scintigraphy did not reveal

signs of structural heart disease. He experienced an episode of syncope at age 9; implantation of a permanent pacemaker was recommended by the physician but not authorized by the legal guardian. The proband died suddenly 2 years later during exercise (running), and the family declined postmortem examination. The proband's younger sister shares the Cx40-Q58L mutation. She is asymptomatic, with a QRS duration at the upper limit of normal, left axis deviation that has been progressive (online-only Data Supplement Table II), and QRS notch. These findings are consistent with impaired intraventricular conduction (Figure 2B). The mother died suddenly at age 30 after delivering the second child. An ECG on record, obtained when she was age 16, was similar to that of the proband (compare Figure 2C with 2A). In addition, a ventricular tachycardia was recorded during the recovery phase of an exercise stress test (online-only Data Supplement Figure II). DNA from the mother was not available for

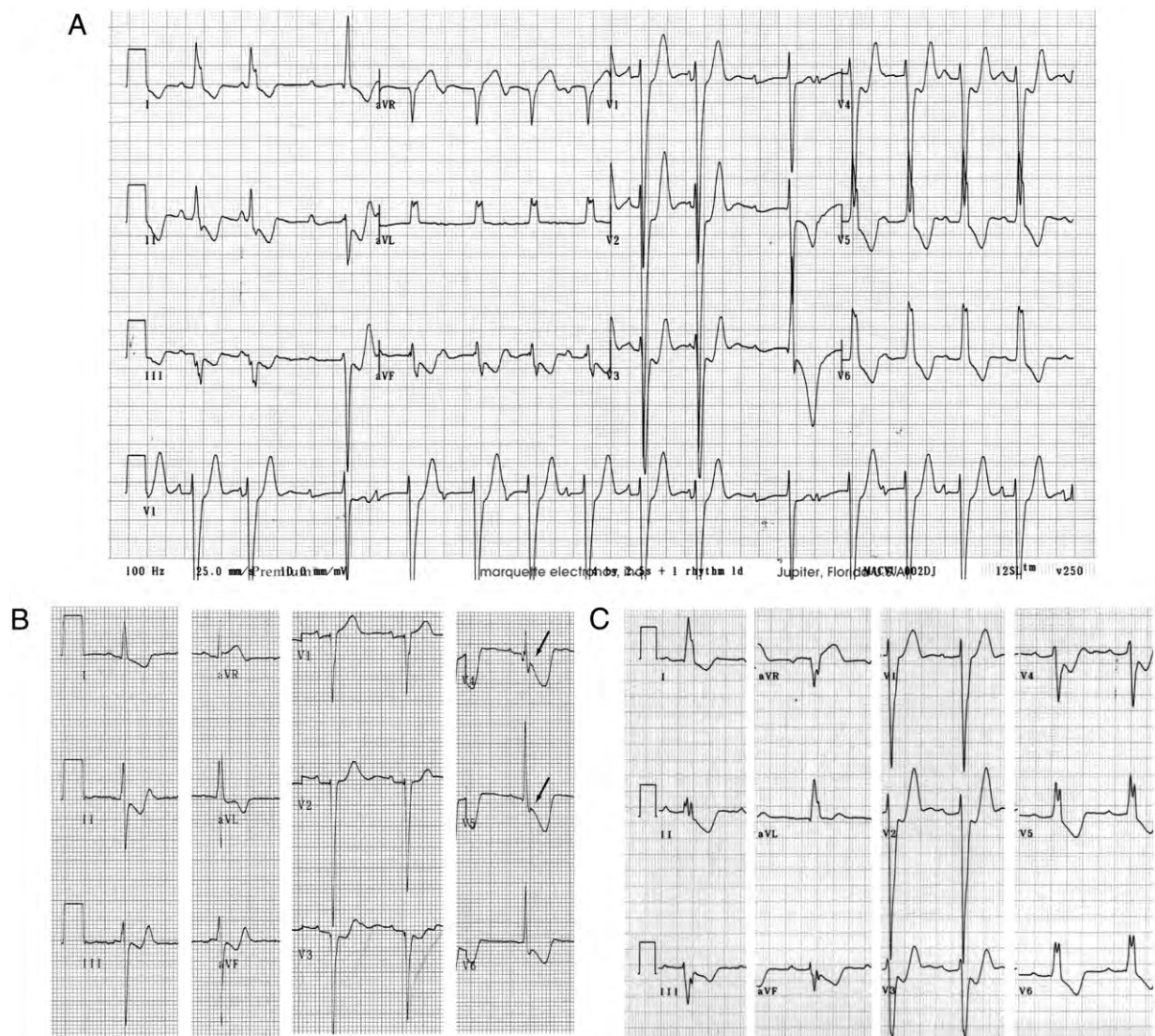


Figure 2. ECGs of proband and affected family members. **A**, ECG of proband at age 6 years, showing advanced atrioventricular block, complete left bundle branch block, and left axis deviation. Patient died suddenly 5 years later. **B**, ECG of proband's sister at age 6 years, showing QRS duration at the upper limit of normal, left axis deviation that has been progressive, and QRS notch in leads V4 and V5 (arrows) consistent with impaired intraventricular conduction. **C**, ECG of proband's mother at age 16 years, showing complete left bundle branch block and left axis deviation. She died suddenly at age 30.

examination. Other family members, including the proband's father, showed normal ECGs. DNA analysis of proband's father and maternal grandparents revealed absence of the Cx40-Q58L mutation. On the basis of clinical data and genotypic features of the proband and sister, it is most likely that the Cx40-Q58L mutation appeared *de novo* in the proband's mother. The data also indicate an early onset of PFHBI in this family compared with the natural history of the disease in most other cases.⁸ As an initial step to assess the functional implications of the Cx40-Q58L mutation, modified constructs were transiently expressed in an exogenous system and evaluated for localization and function.

Electrophysiological Properties of Mutant Cx40-Q58L Channels

Connexin-deficient N2A cells were transiently transfected with cDNA for Cx40-WT or Cx40-Q58L; electrophysiological

properties of homologous Cx40 channels were analyzed by conventional dual whole-cell patch clamp. Figure 3A shows representative junctional current traces elicited by a transjunctional voltage gradient of -60 mV. Average junctional conductance (G_j) decreased from 22.2 ± 1.7 nS in cells expressing Cx40-WT ($n=14$) to 0.56 ± 0.34 nS in cells expressing the Cx40-Q58L mutant ($n=14$; $P<0.001$). The probability of functional coupling, calculated by dividing the number of electrically coupled pairs by the number of pairs tested, was 100% and 57.1% for Cx40-WT and Cx40-Q58L, respectively.

Figure 3B depicts representative single-channel recordings elicited by a transjunctional voltage of -60 mV in cell pairs expressing Cx40-WT or Cx40-Q58L. Unitary events for WT channels displayed current transitions corresponding to 2 conducting states (O_1 and O_2) of 43.3 and 119.5 pS, respectively. Figure 3C shows the event histograms for both cell

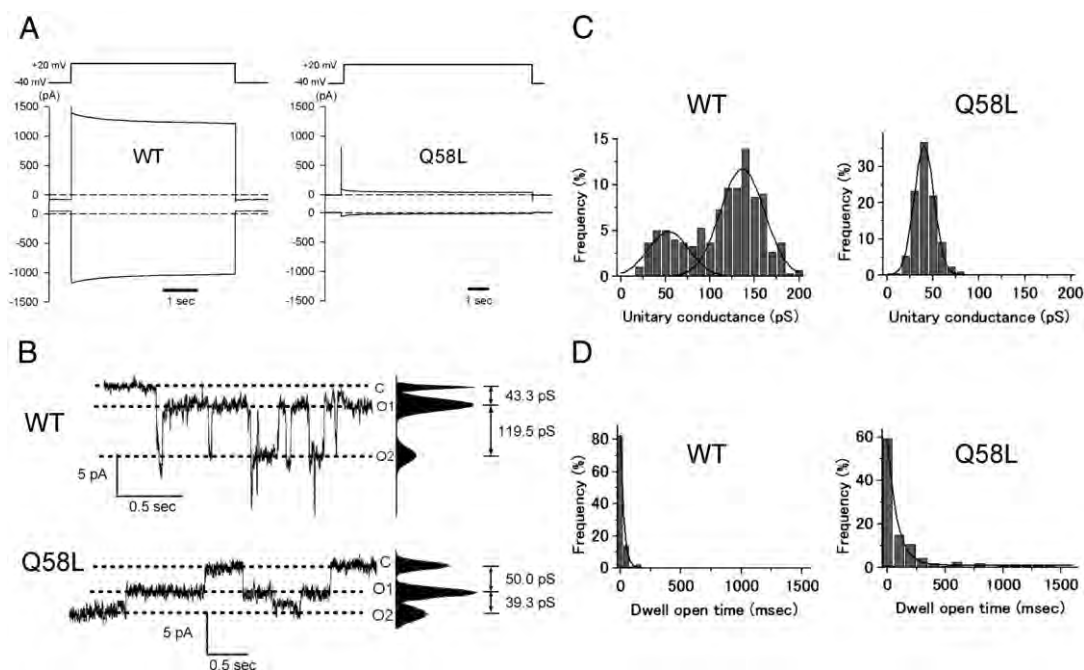


Figure 3. Whole-cell and single-channel properties of connexin40 (Cx40)-WT and Cx40-Q58L channels. **A**, Voltage pulse (top) and junctional current (bottom) from a homomeric WT cell pair (junctional conductance, 12.9 nS) and a Q58L cell pair (junctional conductance, 1.2 nS). **B**, Unitary currents recorded from homomeric Cx40-WT and Cx40-Q58L channels. O₁ and O₂ refer to 2 conducting (open) unitary levels of current. **C**, All-event histograms pooled from WT (n=3) and Q58L (n=3) cells with homologous channels. For WT, Gaussian peaks centered at 136.2 ± 2.3 and 53.1 ± 5.3 pS. For Q58L, best fit by a single Gaussian distribution centered at 40.2 ± 0.3 pS (n=3). **D**, Frequency of events in relation to dwell open time. Binned data were fit by single exponentials (τ_{open} WT, 27.9 ± 0.5 ms, 4 cells, 186 events; τ_{open} Q58L, 92.0 ± 7.8 ms, 3 cells, 163 events). WT indicates wild type.

types (Cx40-WT, 3 cell pairs and 303 events; Cx40-Q58L, 3 cell pairs and 416 events). The histogram for the Cx40-WT channels was best described by 2 Gaussian distributions centered at 136.2 ± 2.3 and 53.1 ± 5.3 pS. In contrast, the histogram for Cx40-Q58L channels was best described by a single Gaussian function centered at 40.2 ± 0.3 pS. Moreover, the length of time that a channel dwelled in the open state (dwell open time) was substantially longer for the Cx40-Q58L channels (92.0 ± 7.8 ms, 3 cell pairs, 163 events) than for Cx40-WT channels (27.9 ± 0.5 ms, 4 cell pairs, and 186 events) (Figure 3D). Of note, the Q58L mutation had a strong dominant effect on formation of heterotypic functional gap junctions. Cells were transfected with either pIRES2-EGFP-Cx40-WT or pIRES2-DsRED2-Cx40-Q58L, and heterotypic pairs were identified by fluorescence microscopy (an EGFP-expressing cell paired with a DsRED2-expressing cell). We recorded from 8 cell pairs and detected unitary current events in only 2 pairs. A total of 57 events were recorded, and average macroscopic junctional conductance was 0.04 ± 0.03 nS. Collectively, the data demonstrated that the Q58L mutation significantly affects the biophysical properties of Cx40 channels and the overall ability of Cx40 gap junctions to form a low-resistance pathway between cells.

Electrophysiological Properties and Gap Junction Plaque Formation in Cells Coexpressing WT and Q58L Proteins

In the clinical cases identified, the Q58L mutation was detected in only 1 carrier allele. Therefore, we assessed the

function of gap junctions in cells coexpressing WT and mutant proteins. N2A cells were cotransfected with cDNA for both GFP-tagged Cx40-WT and Cx40-Q58L ($0.5 \mu\text{g}$ of pEGFPN1-Cx40-WT combined with $0.5 \mu\text{g}$ of pEGFPN1-Cx40-Q58L). Results were compared with those obtained when only 1 of the constructs ($1 \mu\text{g}$) was transfected. Cells expressing both constructs (WT/Q58L) showed intermediate conductance (15.4 ± 3.7 nS, n=16) between WT (28.8 ± 3.6 nS, n=16, $P < 0.001$) and Q58L (0.28 ± 0.11 nS, n=14, $P < 0.001$) (Figure 4A). These values were comparable to those obtained using the bicistronic pIRES2-EGFP constructs (WT, 22.2 ± 1.7 nS, n=14; WT/Q58L, 13.0 ± 2.4 nS, n=17; Q58L, 0.56 ± 0.34 nS, n=14). The coexpression results were consistent with those obtained using pIRES plasmids that tagged the cells both green and red, if cotransfected (online-only Data Supplement Figure I). The probability of finding functional coupling in cotransfected cells was 76.5%, which was intermediately between WT (100%) and Q58L (57.1%).

The characteristics of gap junction plaques observed in cells coexpressing WT and Q58L varied significantly between pairs (Figure 4B). Nearly one half of transfected (fluorescence-positive) cells exhibited clear and discrete gap junction plaques (arrow a), whereas the rest of fluorescent-positive cells showed a diffuse expression pattern and absence of well-defined plaques (arrow b). Fluorescence-positive and gap junction plaque-positive cells were counted in 10 different views for each group, and efficacy of gap junction plaque formation was statistically analyzed (Figure 4C) by calculating the ratio of cells with gap junction plaques

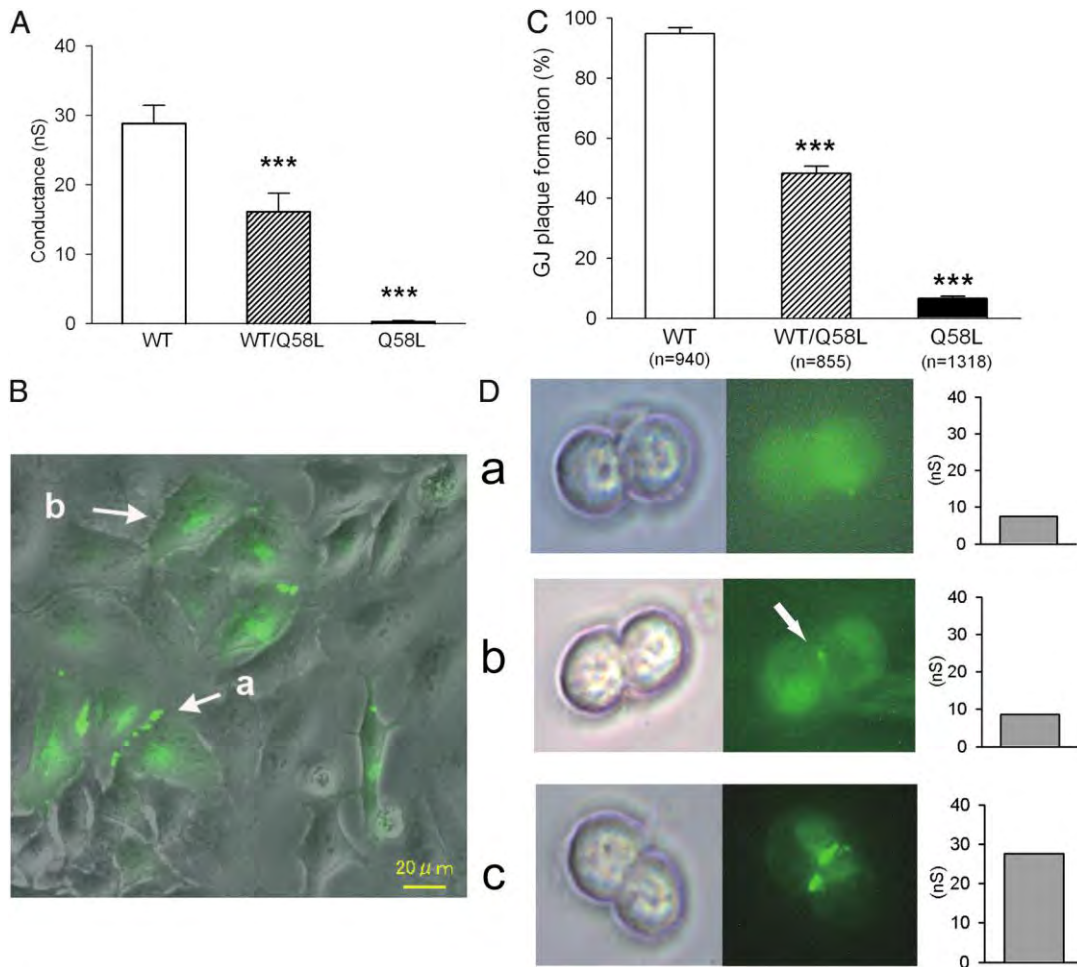


Figure 4. Macroscopic conductance and gap junction plaque morphology in cells coexpressing connexin40 (Cx40)-WT and Cx40-Q58L. **A**, Junctional conductance of cells transfected with plasmid pEGFPN1-Cx40-WT (1 μ g), pEGFPN1-Cx40-Q58L (1 μ g), or cotransfected with WT and Q58L (WT/Q58L, pEGFPN1-Cx40-WT 0.5 μ g+pEGFPN1-Cx40-Q58L 0.5 μ g). **B**, Phase contrast/fluorescence overlay image of neuroblastoma cells transfected with WT/Q58L constructs. Arrow *a* points to gap junction plaque; arrow *b* points to an example of cells transfected but devoid of gap junction plaque. **C**, Efficacy of gap junction plaque formation was measured as the ratio between the number of gap junction plaque-positive cells and the number of fluorescent-positive cells (WT, n=940; WT/Q58L, n=855; Q58L, n=1318). **D**, Representative images of phase contrast (left), EGFP fluorescence (middle), and junctional conductance (right) from neuroblastoma cells cotransfected with pEGFPN1-Cx40-WT (0.25 μ g) and pEGFPN1-Cx40-Q58L (0.25 μ g). Three different examples illustrate the relation between plaque morphology and recorded junctional conductance. WT indicates wild type. *** P <0.001 compared with WT.

to the number of fluorescence-positive cells. In the Cx40-WT group, almost all fluorescent-positive cells exhibited clear gap junction plaques ($94.9 \pm 1.9\%$, n=940), whereas there was a more-diffuse and homogenous pattern with only occasional plaque formation in the Cx40-Q58L group ($6.6 \pm 0.7\%$, n=1318, P <0.001 compared with WT). In contrast, results varied widely in cells cotransfected with WT/Q58L; nearly one half of fluorescence-positive cells exhibited gap junction plaques similar to those observed in cells transfected with the WT construct ($48.2 \pm 2.4\%$, n=855, P <0.001), whereas the rest showed a diffuse expression pattern similar to that of Cx40-Q58L. To establish a better correlation between plaque formation and junctional conductance, both variables were measured concurrently in the same cell pair for 39 N2A cell pairs where GFP-tagged plasmids of Cx40-WT and Cx40-Q58L were cotransfected. As shown in Figure 4D, about one half of GFP-positive cell pairs showed

a very small G_j (<5 nS) and very few or negligible gap junction plaques (a). In the other half of cell pairs, small, dot-like junctional plaques correlated with intermediate G_j values (b), and there were clear, extensive gap junction plaques associated with G_j values >25 nS (c). Overall, we found significant heterogeneity in the extent of electric coupling, although the measurements of G_j correlated with the localization of proteins in transfected cells. These results indicate that the Q58L mutation significantly impairs the ability of cells to form gap junction plaques, although the effect is not purely dominant when both WT and mutant proteins are coexpressed.

Subcellular Distribution of WT and Q58L Cx40 in Transiently Transfected Cells

To further analyze the subcellular distribution of Cx40-WT and Cx40-Q58L proteins, the C terminal of Cx40-WT was

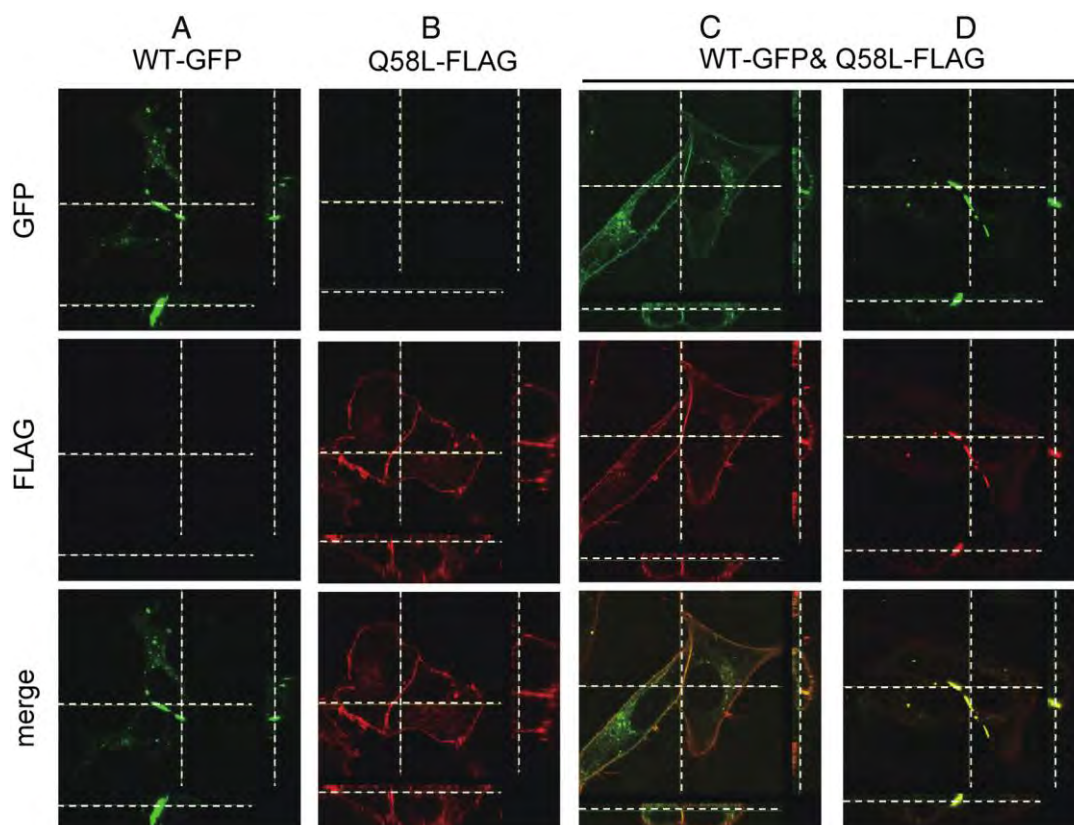


Figure 5. Subcellular distribution of connexin40 (Cx40)-WT and Cx40-Q58L in transiently transfected cells. HeLa cells were transiently transfected with pEGFPN1-Cx40-WT (3.0 μ g) (A), pCMV-FLAG-Cx40-Q58L (3.0 μ g) (B), or pEGFPN1-Cx40-WT (1.5 μ g) plus pCMV-FLAG-Cx40-Q58L (1.5 μ g) (C); immunostained for the respective tag protein; and visualized by confocal laser scanning microscopy. Notice that gap junction plaques (A) are absent in Q58L transfectants (B) and present in some (D) but not all (C) cotransfected cells. Bar=20 μ m. WT indicates wild type.

tagged with GFP, whereas the C terminal of Cx40-Q58L was FLAG tagged. After transfection of N2A cells with the tagged constructs, the distribution of each protein was examined by confocal microscopy. As shown in Figure 5, green color indicates the position of GFP-tagged molecules, whereas red indicates the position of FLAG-tagged molecules. In cells transfected only with GFP-tagged Cx40-WT, fluorescence was consistently detected at sites of cell-cell apposition, following the pattern previously described for GFP-labeled gap junction plaques (Figure 5A). A similar distribution was found when cells were transfected with FLAG-tagged Cx40-WT (not shown). In contrast, most FLAG-tagged Cx40-Q58L signals were evenly distributed around the cell in the vicinity of the plasma membrane (Figure 5B). Biotinylation experiments showed that the Q58L mutation did not prevent the Cx40 protein from inserting into the membrane and presenting a domain-reachable form in the extracellular space (online-only Data Supplement Figure II). Microscopy experiments in cells coexpressing GFP-tagged Cx40-WT and FLAG-tagged Cx40-Q58L proteins yielded results intermediate to those obtained when only 1 construct was expressed. Nearly one half of cell pairs showed that both proteins distributed homogeneously at or near the cell membrane, without the formation of well-defined gap junction plaques (Figure 5C). These images resembled those obtained when

only Cx40-Q58L proteins were expressed (Figure 5B, FLAG). In contrast, other cell pairs showed clustering of fluorescent signals within closely confined areas that appeared to be gap junction plaques (Figure 5D).

The experiments described herein led us to speculate that the distribution and function of heteromeric connexons is determined by their mutant subunit content, whereby formation (or not) of plaques and channels are determined, at least in part, by the abundance of expression of one protein over the other. As an initial step to probe this hypothesis, we took advantage of the characteristics of the bicistronic plasmid pIRES, in which the expression rate of the upstream gene is several-fold greater than that of the downstream gene,²⁰ and explored the functional properties of heteromeric connexons. Cx40-WT and GFP-tagged Cx40-Q58L were subcloned into the pIRES vector, either alone or in combination, in the specific orientations shown in Figure 6A. Protein expression levels of Cx40-WT and Cx40-Q58L were determined by immunochemistry. In contrast to the data obtained when Cx40-WT and GFP-tagged Cx40-Q58L plasmids were cotransfected at a 1:1 ratio (lane 6), expression of heteromeric pIRES plasmids WT-IRES-Q58L-EGFP (lane 3) and Q58L-EGFP-IRES-WT (lane 4) resulted in uneven protein expression levels of WT (40 kDa) and Q58L-EGFP (67 kDa), depending on their orientation in the pIRES vector. Based on

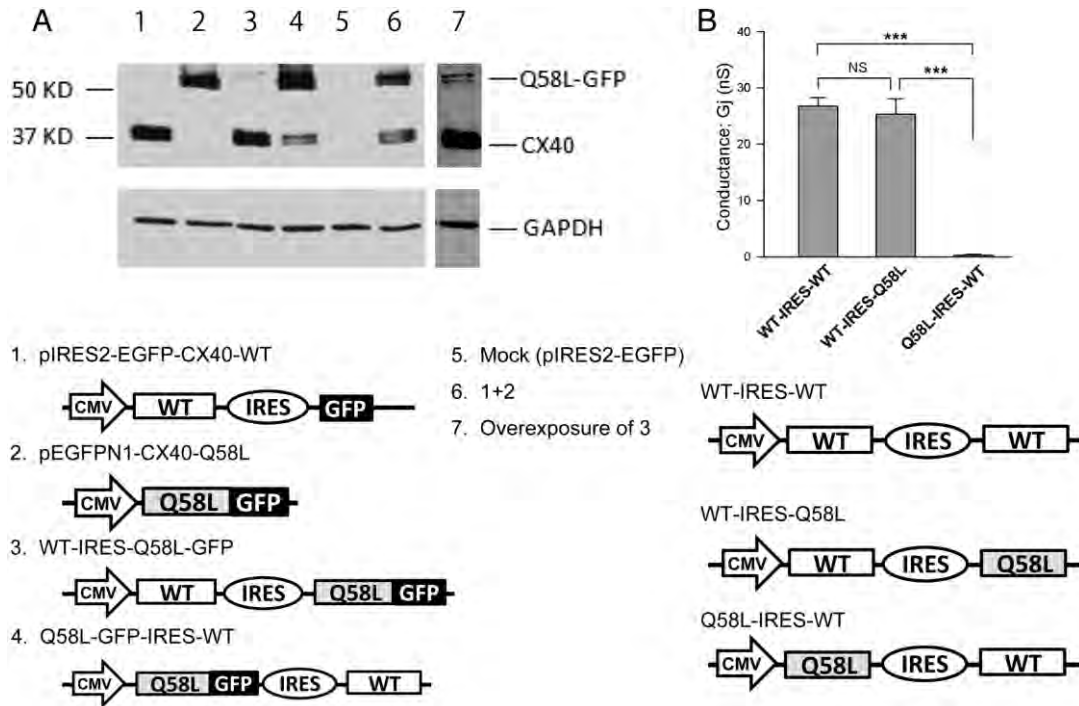


Figure 6. Mutant subunit abundance correlated with gap junction function. **A**, Neuroblastoma cells were transiently transfected with 3 μ g Cx40 constructs in IRES plasmids. Cell lysates were analyzed by western blot using anti-Cx40 (top) and anti-GAPDH antibodies (bottom). The number in each lane corresponds to the plasmid noted below the image. Samples from cells cotransfected with plasmids 1 and 2 (1.5 μ g each) were loaded on lane 6. Double bands of Cx40-WT (40 kDa) and Q58L-EGFP (67 kDa) are shown in lanes 3, 4, 6, and 7. Results were repeated in 3 separate experiments. Overexposure (lane 7) confirmed expression of the high-molecular-weight protein in lane 3. **B**, Junctional conductance of homomeric and heteromeric constructs (WT-IRES-Q58L and Q58L-IRES-WT). Conductance of cell pairs expressing WT-IRES-WT (n=17) was comparable to heteromeric construct WT-IRES-Q58L (n=17). However, converse heteromeric construct Q58L-IRES-WT (n=15) showed significantly reduced conductance ($P<0.001$ versus WT-IRES-WT and WT-IRES-Q58L). *** $P<0.001$. NS indicates not significant; WT, wild type.

these observations, we constructed a homomeric Cx40-WT plasmid (WT-IRES-WT) and heteromeric plasmids of Cx40-WT and Cx40-Q58L with different orientations (WT-IRES-Q58L and Q58L-IRES-WT) (Figure 6B). The junctional conductance of cell pairs expressing WT-IRES-Q58L (25.3 ± 2.8 nS, n=17) was nearly indistinguishable from that of the homomeric plasmid WT-IRES-WT (27.8 ± 1.4 nS, n=17, P not significant). By contrast, the converse heteromeric construct Q58L-IRES-WT showed substantially reduced junctional conductance (0.29 ± 0.12 nS, n=15, $P<0.001$) comparable with that of the homomeric Q58L (0.56 ± 0.34 nS) (Figure 3A). These results suggest that the final electrophysiological properties of the heteromeric connexons are determined predominantly by the numbers of mutant subunits in each gap junction rather than defined by a dominant-negative effect.

Discussion

Genetic screening confirmed the association of *SCN5A* and *SCN1B* with PFHBI¹³⁻¹⁵ and revealed novel mutations within these genes (online-only Data Supplement Table I). More importantly, we identified a particularly severe, early onset case of PFHBI associated with a germ line mutation in *GJA5* in 2 blood relatives (proband and sister) given a clinical diagnosis of PFHBI. The data also indicate that the protein expressed (Cx40-Q58L) failed to form functional gap junc-

tions in an exogenous expression system and decreased the probability of gap junction formation in cells coexpressing the WT protein.

So far, *SCN5A*, *SCB1B*, and *TRPM4* are the only genes associated with PFHBI.^{11,13,14} The National Human Genome Research Institute database shows no association of *GJA5* single-nucleotide polymorphisms with arrhythmias or conduction system diseases. PR interval and QRS have been associated with several loci, including *SCN5A*, *SCN10A*, *NKX2.5*, and *TBX5*^{21,22} but not *GJA5*, which is located at chromosome 1q21.1. Overall, the present results suggest that *GJA5* is a candidate gene associated with PFHBI, likely in a small fraction of the affected population. Yet, given the limited cosegregation observed in the reported family, we remain cautious in assigning a causative nature to the *GJA5* mutation. It will be of great interest to expand the screening of *GJA5* at the research level to identify other cases associated with amino acid changes in Cx40, although it may be premature to include *GJA5* as a part of the routine diagnostic screen.¹⁷ The present results also emphasize the importance of Cx40 in the maintenance of normal cardiac rhythm.

To our knowledge, this is the first report of a germ line mutation in Cx40 associated with a high risk of ventricular arrhythmias (online-only Data Supplement Figure II). Other studies have shown somatic mutations of Cx40 or Cx43 in patients with idiopathic atrial fibrillation^{5,23}; those mutations

were confined to the atria, and conduction abnormalities in the ventricles or His-Purkinje system were not observed. On the other hand, as in all cases involving identified genetic substrates for disease, the possibility of compound mutations in unexamined genes cannot be excluded. We do emphasize that the mutation led to a severe cellular phenotype in an exogenous expression system, supporting the argument that just the Q58L substitution can impair the formation of gap junctions necessary for propagation of action potentials between cells.

The results show that Cx40-Q58L was abundantly expressed in an exogenous system. The protein reached the vicinity of the cell membrane but failed to form gap junction plaques (Figure 5B). This result may be due to impaired docking of mutant hemichannels within the intercellular space because of the mutation in the extracellular loop (Figure 1C). During trafficking, connexin subunits oligomerize to form a hemichannel (or connexon). Once at the site of cell contact, connexons from apposing cells dock, sealing the hydrophilic path (the channel pore) from the extracellular space. The locking of 2 connexons into 1 gap junction channel is believed to stabilize connexin subunits in place, facilitating aggregation of other oligomers into their vicinity and eventually forming a plaque. Amino acid substitutions within the extracellular loop, as in Q58L, can prevent hemichannel docking and, thus, plaque formation.²⁴ The present biotinylation experiments indicate that the Q58L protein integrates into the cell membrane, supporting the notion that the inability of the Q58L mutation to form functional gap junctions is related to events that occur after the oligomer is delivered to the cell membrane and before a functional dodecamer converts into a functional channel in a gap junction plaque.

Results obtained in cells coexpressing both mutant and WT proteins clearly show that one subunit can significantly influence the fate of the other (Figure 5). This suggests that Cx40-Q58L subunits retain their ability to oligomerize not only with other mutant subunits, but also with the WT protein. The results also present an interesting paradigm in that neither the WT nor the mutant construct exerted a dominant effect over the other. After transfection with equal amounts of cDNA, we found cells where both WT and mutant proteins displayed the phenotype of the mutant construct, whereas in other cases, junctional plaques could be easily discerned (although an outline of the cell, likely resulting from the presence of the FLAG-tagged mutant protein, could still be observed [see red signal in Figure 5D]). These results can be explained if we assume that the probability of proper targeting and integration of a connexon into a plaque decreases as a function of the number of mutant subunits contained. For cotransfection, we used equal amounts of cDNA; however, it is very likely that each cell was transfected with variable amounts of each construct and, thus, expressed variable amounts of each protein. We speculate that a majority (though of unknown stoichiometry) of WT connexin subunits are required in a connexon for proper formation of functional gap junctions. Thus, if a cell captures an abundance of Q58L cDNA, most oligomers will contain an excess of mutant subunits, and gap junction formation will fail. If, on the other hand, that cell captures and expresses

more of the WT cDNA, the distribution of the subunits within the oligomer will contain a majority of WT connexins, and the connexon will be properly integrated into a channel. This hypothesis will require further testing, although data presented in Figure 6 support the concept that success or failure of functional channel formation may relate to relative abundance of each protein (WT or mutant). If our hypothesis is correct, it suggests that the distribution of functional gap junctions in the His-Purkinje network of affected individuals could vary significantly among cells, depending on the extent of expression of each allele in each cell. The resulting phenotype may be that of a Purkinje network where gap junction-mediated coupling could be heterogeneous, setting the stage for local conduction block, microreentry, and ventricular arrhythmias at the Purkinje network or at the Purkinje-muscle junction.^{1,2}

Overall, we show that both proband and sister have a genotype that (1) is absent in hundreds of control subjects and in the unaffected parent (the father), (2) disrupts an important functional domain of the protein, and (3) disrupts the formation of gap junction channels. The data therefore support the notion of an association between the Cx40 mutation and the clinical phenotype and emphasize the importance of future studies to assess the possible involvement of Cx40 mutations as causative of the disease.

Acknowledgments

We thank Dr A.L. George for critical reading of the manuscript and Mss M. Fukuoka and C.R. Ingram for technical assistance.

Sources of Funding

This work was supported by research grant 21590921 (to Dr Makita), Scientific Research B (to Dr Mochizuki), and Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (HD Physiology) 22136007 (to Dr Makita) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan; a Health and Labor Sciences Research Grant for research on measures for intractable diseases from the Ministry of Health (2010-145) (to Dr Makita); the Mitsubishi Pharma Research Foundation (to Dr Makita); the Japan-France Integrated Action Program (SAKURA) (to Drs Makita and Schott); The Naito Foundation (to Drs Makita and Seki); the Support Center for Women Health Care Professionals and Researchers 21590921 (to Dr Seki); and grants GM057691, HL106632 and HL087226 from the National Institutes of Health (to Dr Delmar).

Disclosures

None.

References

1. Saffitz JE, Lerner DL, Yamada KA. Gap junction distribution and regulation in the heart. In: Zipes DP, Jalife J, eds. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*. Philadelphia, PA: Saunders; 2004:181–191.
2. Park DS, Fishman GI. The cardiac conduction system. *Circulation*. 2011; 123:904–915.
3. Ruan Y, Liu N, Priori SG. Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:337–348.
4. Firouzi M, Ramanna H, Kok B, Jongsma HJ, Koeleman BPC, Doevendans PA, Groenewegen WA, Hauer RNW. Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res*. 2004;95:e29–e33.
5. Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong X-Q, Shao Q, Liu X, Veinot JP, Tang ASL, Stewart AFR, Tesson F, Klein GJ, Yee R, Skanes AC, Guiraudon GM, Ebihara L, Bai D. Somatic mutations in the connexin 40 gene (*GJA5*) in atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2006;354:2677–2688.

6. Lenègre J. Etiology and pathology of bilateral bundle branch block in relation to complete heart block. *Prog Cardiovasc Dis*. 1964;6:409–444.
7. Lev M, Kinare SG, Pick A. The pathogenesis of atrioventricular block in coronary disease. *Circulation*. 1970;42:409–425.
8. 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 Lenègre disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:643–652.
9. Brink PA, Ferreira A, Moolman JC, Weymar HW, van der Merwe P-L, Corfield VA. Gene for progressive familial heart block type I maps to chromosome 19q13. *Circulation*. 1995;91:1633–1640.
10. de Meeus A, Stephan E, Debrus S, Jean M-K, Loiselet J, Weissenbach J, Demaille J, Bouvagnet P. An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Circ Res*. 1995;77:735–740.
11. Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I, Schulze-Bahr E, Brink P, Pongs O. Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest*. 2009;119:2737–2744.
12. Royer A, van Veen TAB, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbil V, Leoni A-L, Steenman M, van Rijen HVM, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JMT, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenègre's disease. Age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation*. 2005;111:1738–1746.
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;23:20–21.
14. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer 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;118:2260–2268.
15. McNair WP, Ku L, Taylor MRG, Fain PR, Dao D, Wolfel E, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation*. 2004;110:2163–2167.
16. Miquerol L, Meysen S, Mangoni M, Bois P, van Rijen HVM, Abran P, Jongasma H, Nargeot J, Gros D. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovasc Res*. 2004;63:77–86.
17. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Camm AJ, Ellinor PT, Gollob M, Hamilton R, Hershberger RE, Judge DP, Le Marec H, McKenna WJ, Schulze-Bahr E, Sensarian C, Towbin JA, Watkins H, Wilde A, Wolpert C, Zipes DP. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies. *Heart Rhythm*. 2011;8:1308–1339.
18. Seki A, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. Loss of electrical communication, but not plaque formation, after mutations in the cytoplasmic loop of connexin43. *Heart Rhythm*. 2004;1:227–233.
19. Anumonwo JMB, Taffet SM, Gu H, Chanson M, Moreno AP, Delmar M. The carboxyl terminal domain regulates the unitary conductance and voltage dependence of connexin40 gap junction channels. *Circ Res*. 2001;88:666–673.
20. Bochkov YA, Palmenberg AC. Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques*. 2006;41:283–284.
21. Holm H, Gudbjartsson DF, Arnar DO, Thorleifsson G, Thorgeirsson G, Stefansdottir H, Gudjonsson SA, Jonasdottir A, Mathiesen EB, Njolstad I, Nyrnes A, Wilsgaard T, Hald EM, Hveem K, Stoltenberg C, Lochen M-L, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nat Genet*. 2010;42:117–122.
22. Pfeufer A, van Noord C, Marcianti KD, Arking DE, Larson MG, Smith AV, Tarasov KV, Muller M, Sotoodehnia N, Sinner MF, Verwoert GC, Li M, Kao WHL, Kotgen A, Coresh J, Bis JC, Psaty BM, Rice K, Rotter JJ, Rivadeneira F, Hofman A, Kors JA, Stricker BHC, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Beckmann BM, Sauter W, Gieger C, Lubitz SA, Newton-Cheh C, Wang TJ, Magnani JW, Schnabel RB, Chung MK, Barnard J, Smith JD, Van Wagoner DR, Vasani RS, Aspelund T, Eiriksdottir G, Harris TB, Launer LJ, Najjar SS, Lakatta E, Schlessinger D, Uda M, Abecasis GR, Muller-Myhsok B, Ehret GB, Boerwinkle E, Chakravarti A, Soliman EZ, Lunetta KL, Perz S, Wichmann HE, Meitinger T, Levy D, Gudnason V, Ellinor PT, Sanna S, Kaab S, Witteman JCM, Alonso A, Benjamin EJ, Heckbert SR. Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet*. 2010;42:153–159.
23. Thibodeau IL, Xu J, Li Q, Liu G, Lam K, Veinot JP, Birnie DH, Jones DL, Krahn AD, Lemery R, Nicholson BJ, Gollob MH. Paradigm of genetic mosaicism and lone atrial fibrillation: physiological characterization of a connexin 43-deletion mutant identified from atrial tissue. *Circulation*. 2010;122:236–244.
24. Sosinsky GE, Nicholson BJ. Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1711:99–125.

CLINICAL PERSPECTIVE

Progressive familial heart block type I, also known as progressive cardiac conduction defect, is an inherited form of cardiac conduction system dysfunction that can lead to severe heart rhythm disturbances, including sudden cardiac death. The genetic causes of this disease are poorly understood. Here, we genetically screened 156 patients with progressive familial heart block type I. In addition to mutations in genes of the voltage-gated cardiac sodium channel complex (*SCN5A* and *SCN1B*), we found a novel germ line mutation in *GJA5*, the gene encoding the gap junction protein connexin40. The disease had an early onset and was associated with otherwise unexplained sudden cardiac death in the proband and his mother. The proband's sister is also affected. Cellular phenotype analysis revealed impaired gap junction formation at cell-cell interfaces and marked reduction of junctional conductance in cells expressing the mutated connexin40 protein. The results emphasize the importance of connexin40 in normal electrical propagation in the cardiac conduction system and open the possibility of including *GJA5* as a target gene for study in patients with progressive familial heart block type I.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTAL METHODS

1. Genetic screening of PFHB1

The exon 2 of *GJA5* and exon 3 of *GJC1* that cover the entire coding region of the Cx40 and Cx45, respectively, were amplified by PCR from genome DNA using following primer sets.

| | | |
|-------------|-------------------|--------------------------------|
| <i>GJA5</i> | Forward (Cx40-F2) | 5'-TGGAATCCCAGAACATGATAGA-3' |
| | Reverse (Cx40-R2) | 5'-TCAGTTCAGAAGGGACACGTCT-3' |
| <i>GJC1</i> | Forward (Cx45-F1) | 5'-GAGCCACCCTACCCA ACTGA-3' |
| | Reverse (Cx45-R1) | 5'-ACCAGAGCCAAATGTTTACTCAA -3' |

The coding regions of *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *SCN1B*, *SCN4B*, *HCN4*, *GJA1* (Cx43) were amplified by PCR using exon flanking intronic primers as previously described.¹⁻⁸ Direct DNA sequencing was performed using ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems).

2. Plasmid construction

A 1.1-kilobase DNA fragment, encompassing the entire coding region of Cx40, was amplified by PCR from human genomic DNA using the following primers.

| | |
|--------------------|--|
| Forward (Cx40-F7) | 5'-GA <u>AGATCT</u> CACCATGGGCGATTGGAGC TTCCT-3' |
| Reverse (Cx40-R2X) | 5'- <u>GGAATTC</u> CACACTGATAGGTCATCTG-3' |

(Underlines represent the restriction recognition sequences for BglII and EcoRI, respectively)

The PCR fragment was digested with BglII/EcoRI and subcloned into a bicistronic plasmid pIRES2-EGFP or pIRES2-DsRED2 (Takara Bio), for visual identification of cells expressing

connexins and green (EGFP) or red fluorescent protein (DsRED2), respectively. Site-directed mutagenesis was performed by QuikChange (Stratagene) as per manufacturer's instructions. Sequences of PCR-amplified regions were verified for both strands. For EGFP-tagged Cx40 plasmid, the 1.1 kb coding sequence of WT and Q58L Cx40 were PCR-amplified by the following primers.

Forward (Cx40-F2X) 5'-AACAAGCTTCACCATGGGCGATTGGAGCTTCCT-3'

Reverse (Cx40-R5X) 5'-GCGGATCCCACTGATAGGTCATCTGA-3'

(Underlines represent the restriction recognition sequences for HindIII and BamHI, respectively.) The PCR fragment was digested with HindIII/BamHI and subcloned in frame into the plasmid pEGFP-N1 (Takara Bio), generating fusion constructs (pEGFPN1-Cx40-WT and pEGFPN1-Cx40-Q58L). FLAG-tagged Cx40 plasmids were constructed by replacing the 0.8 kb EGFP fragment of the pEGFPN1-Cx40 plasmids in frame with the FLAG epitope (DYKDDDDK) cDNA at the C-terminal of the Cx40 (pCMV-FLAG-Cx40-WT and pCMV-FLAG-Cx40-Q58L, respectively). EGFP-tag or FLAG-tag did not change the conductance or the gating properties of Cx40 (data not shown).

Bicistronic constructs of WT-Cx40 and Q58L-Cx40 were made using the plasmid pIRES (Takara Bio). The WT-Cx40 (1.1 kb) and EGFP-tagged Q58L-Cx40 (1.8kb) were subcloned either at the upstream or the downstream cloning sites of the IRES (internal ribosomal entry site) (Fig 6B, constructs 3 and 4). Homomeric WT-Cx40 construct and the heteromeric constructs (WT-IRES-Q58L and Q58L-IRES-WT) in Fig 6C were constructed by PCR. WT-Cx40 or Q58L-Cx40 cDNAs were initially PCR-amplified by the primers Cx40-Fa and Cx40-Rb, and the PCR products were digested with NheI/EcoRI and subcloned in the upper multiple cloning sites NheI/EcoRI of pIRES.

Forward (Cx40-Fa) 5'-GCGCTAGCCACCATGGGCGATTGGAGC TTCCT-3'

Reverse (Cx40-Rb) 5'-AGAATTCTCACACTGATAGGTCATCTG-3'

(Underlines represent the restriction recognition sequences for NheI and EcoRI, respectively)

Similarly, WT-Cx40 or Q58L-Cx40 cDNAs were PCR-amplified by the primers Cx40-F8 and Cx40-R3, and the PCR products were digested with XbaI/NotI and subcloned in the lower multiple cloning sites XbaI/NotI of pIRES.

Forward (Cx40-F8) 5'-GCTCTAGACACCATGGGCGATTGGAGC TTCCT-3'

Reverse (Cx40-R3) 5'-ATAAGATGCGGCCGCTCACACTGATAGGTCATCTG-3'

(Underlines represent the restriction recognition sequences for XbaI and NotI, respectively)

Translation rate of the upstream cloned gene is generally greater than that cloned at the downstream site. Expression levels of WT-Cx40 (40 kDa) and Q58L-Cx40-GFP (67 kDa) are determined by western blotting using ant-Cx40 antibody.

3. Cell culture and transfection

Connexin 40 constructs were introduced into connexin-deficient HeLa cells or mouse neuroblastoma (N2A) cells, maintained in F-12 or Minimum Essential Medium, respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum. HeLa and N2A cells were transfected with plasmids using Lipofectamine LTX or Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per the manufacturer's protocol.

4. Electrophysiology

Gap junction currents from heterologously expressed N2A cell pairs were recorded using whole-cell double patch clamp techniques as previously described.^{9, 10} Recordings were carried out independently in each cell of a pair using two Axopatch 200B amplifiers (Axon Instruments). Current signals were filtered at 100-200 Hz and digitally sampled at 1-2 KHz

using an analog-to-digital interface (Digidata 1322A, Axon Instruments). The data were analyzed using Clampfit 9.2 (Axon Instruments) and Origin 7.5 (Origin Lab). The external solution contained (in mmol/L) 160 NaCl, 10 CsCl, 2 CaCl₂, 0.6 MgCl₂ and 10 HEPES, at pH 7.4. The intracellular (pipette) solution contained (in mmol/L) 130 CsCl₂, 0.5 CaCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 Na₂ATP and 3 MgATP (added daily), (pH = 7.2). Pipette resistance was 5-10 MΩ. Octanol was added directly to the external solution at the final concentration of 1 mmol/L at each experiment. Experiments were carried out at room temperature (20-22 °C). All the chemicals were purchased from Sigma or Wako (Tokyo, Japan).

Gap junction channel conductance (g_j) was determined by conventional methods. Briefly, both cells in the pair (cell₁ and cell₂) were independently voltage-clamped at the same holding potential (-40 mV). Cell₁ was then stepped to a new voltage, thus creating a potential difference across the junction (V_j). The current in cell₂ was considered equal and opposite to the junctional current (I_j), and g_j was measured from the ratio I_j/V_j . The pulses were 2 or 5 sec in duration with an interpulse interval of 15 sec. Unitary conductance was obtained from pairs where only one or two functional channels were spontaneously detected. In some cases, cells were uncoupled by exposure to 1 mmol/L octanol. Histograms of events were obtained from channels recorded during repetitive 10-20 sec steps to $V_j = +60$ mV. To measure unitary conductance, only junctional current traces with events that lasted for longer than 20 ms were included.^{9, 10} All-points histograms of digitized current traces and the frequency distribution histograms were constructed using Origin 7.5.

To analyze the electrophysiological properties of heterotypic gap junctions consisting of Cx40-WT and Cx40-Q58L, N2A cells were transiently transfected with either Cx40-WT (pIRES2-EGFP plasmid) or Cx40-Q58L (pIRES2-DsRED2 plasmid). Sixteen hours later, both cells were split with trypsin/EDTA and co-cultured. On the following day, the

heterotypic cell pairs of Cx40-WT (green) and Cx40-Q58L (red) were visually identified under fluorescent microscopy. Experiments were carried out at room temperature (20-22 °C).

5. Immunocytochemistry

HeLa cells were cultured on a glass-bottom dish (Asahi Techno Glass, Chiba, Japan) and transfected with the fusion plasmids of pEGFPN1-Cx40-WT, pCMV-FLAG-Cx40-Q58L, or both. Next day, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed in PBS containing 2% formaldehyde for 30 min at 4 °C, and permeabilized with 0.05% Triton X-100 for 30 min at 4 °C. After blocking with PBS containing 4% bovine serum albumin for 1 h at room temperature, the cells were stained with anti-FLAG M2 antibody (mouse monoclonal, 1:200, Sigma) for 1 h at room temperature. Protein reacting with antibody was visualized with Alexa 546-labeled secondary antibody (goat, 1:300, Invitrogen). EGFP and Alexa 546 fluorescence images were recorded with a FluoView FV1000 confocal microscope (Olympus Co, Tokyo) with a 60x oil immersion objective.

6. Western blotting

N2A cells maintained in a 6 well dish were transiently transfected with 3 µg Cx40 plasmids. Two days after transfection, cells were washed with PBS, and total cell lysate was extracted with lysis buffer including 50 mM Tris (pH7.5), 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1 µg/ml aprotinin, 1x complete protease inhibitor (Roche Applied Science). Lysates precleared by centrifugation at 15,000 xg for 10 min were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with rabbit anti-Cx40 antibody (Millipore). Proteins reacting with primary antibodies were visualized by ECL system (GE Healthcare). The membrane was reprobed by anti-GAPDH antibody (Sigma).

7. Surface biotinylation

HeLa cells plated on 100 mm dishes were transiently transfected with 11 µg of pEGFPN1-Cx40-Q58L using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Surface biotinylation was performed 48 hours after transfection using the Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Scientific, #89881) as per the manufacturer's protocol. Briefly, after 30 min of biotin labeling reaction at 4 °C, cells were lysed, mixed with NeutrAvidin agarose, and loaded on a column. The biotinylated proteins were eluted with the elution buffer. Fractions of the flowthrough, elute, and input lysate (1:1 diluted with lysate buffer) were subjected to a 4-12% gradient SDS-PAGE and immunoblotting with anti-Cx40 antibodies (Cx40-A, 1:50 dilution, Alpha Diagnostic International). Proteins reacting with primary antibodies were visualized by LI-COR infrared imaging technology. Detection was done using anti-rabbit IRDye 800CW (1:10,000) antibodies (LI-COR Biosciences, # 926-32213).

8. Functional evaluation of novel *SCN5A* mutations associated with PFHB1

Three novel *SCN5A* mutations associated with PFHB1 were identified; a missense mutation F777L, a compound heterozygous frame shift mutation p.P701fsX710 plus p.P2006fsX2037, and a frame shift mutation p.V1764fsX1786. These mutations were not found in 400 unaffected control alleles. Functional properties of these mutations were evaluated by whole-cell patch clamp. The mammalian expression plasmids encoding the mutations were constructed by site-directed mutagenesis as we described previously using a human Na channel α subunit (Nav1.5) cDNA.¹¹ The human cell line tsA-201 was transiently transfected together with Na channel β 1 subunit, and the whole-cell Na currents were recorded as we previously described.¹¹ Electrode resistance ranged from 0.8 to 1.5 M Ω . Data

acquisition was carried out using an Axopatch 200B patch clamp amplifier and pCLAMP10 software (Axon Instruments). Currents were filtered at 5 kHz (−3 dB; 4-pole Bessel filter) and digitized using an analog-to-digital interface (Digidata 1440A; Axon Instruments).

Experiments were carried out at room temperature (20–22°C). Voltage errors were minimized using series resistance compensation (generally 80%). Cancellation of the capacitance transients and leak subtraction were performed using an online P/4 protocol. The pulse protocol cycle time was 10 s. The data were analyzed using Clampfit 10 (Axon Instruments) and SigmaPlot 11 (SPSS Science). The holding potential was −120 mV. The bath solution contained (in mmol/l): 145 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, and 10 glucose, pH 7.35 (adjusted with NaOH). The pipette solution (intracellular solution) contained (in mmol/l): 10 NaF, 110 CsF, 20 CsCl, 10 EGTA, and 10 HEPES, pH 7.35 (adjusted with CsOH). The time from establishing the whole-cell configuration to onset of recording was consistent cell-to-cell to exclude the possible time-dependent shift of steady-state inactivation.

To determine activation parameters, the current-voltage relationship was fit to the Boltzmann equation $I = (V - V_{\text{rev}}) \times G_{\text{max}} \times (1 + \exp[(V - V_{1/2}) / k])^{-1}$, where I is the peak Na current during the test pulse potential V . The parameters estimated by the fitting are V_{rev} (reversal potential), G_{max} (maximum conductance), and k (slope factor) (Supplemental Figure 1B). Steady-state availability for fast inactivation was measured with a standard double-pulse protocol (Supplemental Figure 1C, left inset), and the data were fit with the Boltzmann equation $I/I_{\text{max}} = (1 + \exp[(V - V_{1/2}) / k])^{-1}$, where I_{max} is the maximum peak Na current, to determine the membrane potential for $V_{1/2}$ and k . Functional properties of other mutations in *SCN5A* or *SCN1B* were previously reported (Supplemental table S1).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGEND

Supplemental Figure S1

Functional properties of the novel *SCN5A* mutations

Panel A shows whole-cell Na currents recorded from tsA201 cells expressing wild type (WT) Nav1.5 (left) or Nav1.5 mutant F777L (right). Currents were elicited by step pulses from -90 mV to +60 mV (10 mV step) from a holding potential of -120 mV. Bars: 5 msec and 2 nA. Non-inactivated late currents were not observed. Panel B shows current-voltage relationship. Average peak current density was significantly reduced in F777L ($p < 0.001$). WT: 391.7 ± 47.1 pA/pF, $n = 15$ (open circles). F777L: 301.2 ± 30.0 pA/pF, $n = 9$ (closed circles). Panel C shows that the voltage-dependence of activation of F777L channels (closed circles) was not different from control, whereas steady-state inactivation curve was significantly shifted in the hyperpolarizing direction in F777L (WT: $V_{1/2} = -87.1 \pm 0.5$ mV, $n = 25$; F777L: $V_{1/2} = -92.4 \pm 1.3$ mV, $n = 9$; $p < 0.001$). These biophysical properties suggest a decrease in the number of functional (conductive) sodium channels during the action potential upstroke consequent to the mutation. Previous studies have revealed that mutations A1180V¹² and D1275N¹³, also found in our series (see supplemental Table S1), exhibit minor functional abnormalities when expressed in cultured cells, though more drastic changes are observed when the channels are expressed in cardiomyocytes¹⁴. Cells expressing compound heterozygous mutations p.P701fsX710 and p.P2006fsX2037, or a frame shift mutation p.V1764fsX1786, exhibited no Na current, suggesting haploinsufficiency of cardiac Na current in the afflicted population.

Supplemental Figure S2

Exercise stress test of the proband's mother

Electrocardiographic recording obtained from the probands's mother during a treadmill exercise stress test at the age of 16. A heart rate of 177 bpm was achieved after 9 min 20 sec of exercise test by Bruce protocol. During the recovery phase at 1 min 17 sec, superior axis narrow QRS ventricular tachycardia with a rate of 110 bpm was observed (upper panel) .Ventricular tachycardia was spontaneously terminated at 20 min 23 sec of the recovery phase (lower panel).

Supplemental Figure S3

Co-expression of Cx40-WT and Cx40-Q58L in N2A cells.

Panels A-C show fluorescence images from a cell pair recorded from cells co-transfected with pIRES2-EGFP-Cx40-WT and pIRES2-DsRED2-Cx40-Q58L (0.5 μ g each). Notice expression of both the green (A) and the red marker (B), giving a yellow color in the overlay (C).

Calibration bar: 20 μ m. Panel D: Junctional conductance recorded from cell pairs as that shown in panels A-C was 18.9 ± 5.4 nS (n=6). This number was not statistically different from that obtained from pairs expressing WT-GFP and Q58L-GFP (average $G_j = 13.0 \pm 2.4$ nS; n=17).

Supplemental Figure S4

Surface biotinylation of Q58L-Cx40 expressed in HeLa cells.

HeLa cells transfected with pEGFPN1-Cx40-Q58L were surface-labeled with biotin, and lysed. Cell lysate was mixed with NeutrAvidin agarose and loaded on a column. Flowthrough, elute (biotin-labeled membrane fraction) and the input lysate (1:1 diluted with lysate buffer) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. A single 67KDa band of similar intensity

was detected in both elute and the input lysate, but not in the flowthrough. These data indicate that mutation Q58L did not prevent surface expression of the Cx40 protein.

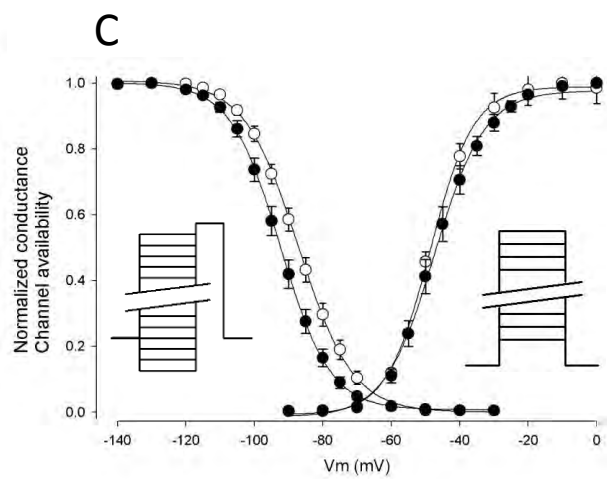
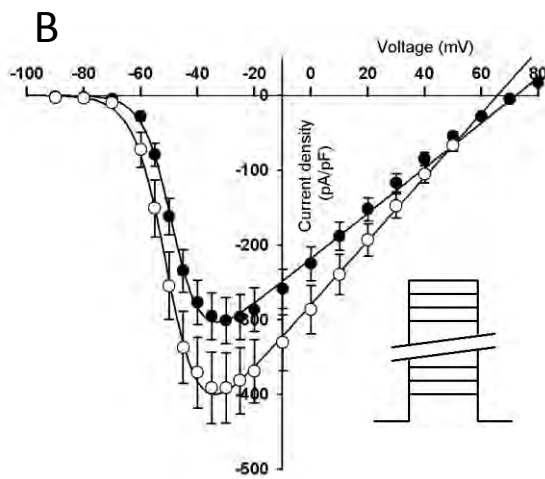
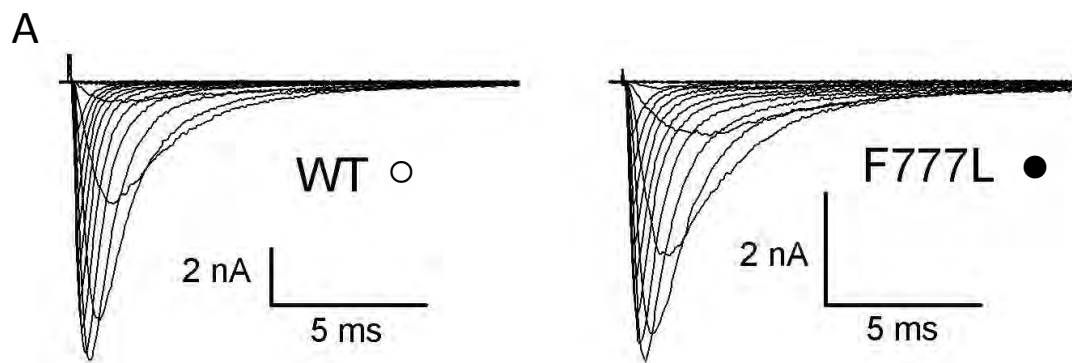
SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. 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
2. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation*. 2000;102:1178-1185
3. 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.
4. Makita N, Sloan-Brown K, Weghuis DO, Ropers HH, George AL, Jr. Genomic organization and chromosomal assignment of the human voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit gene (SCN1B). *Genomics*. 1994;23:628-634
5. Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer 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;118:2260-2268
6. 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 β4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2007;116:134-142

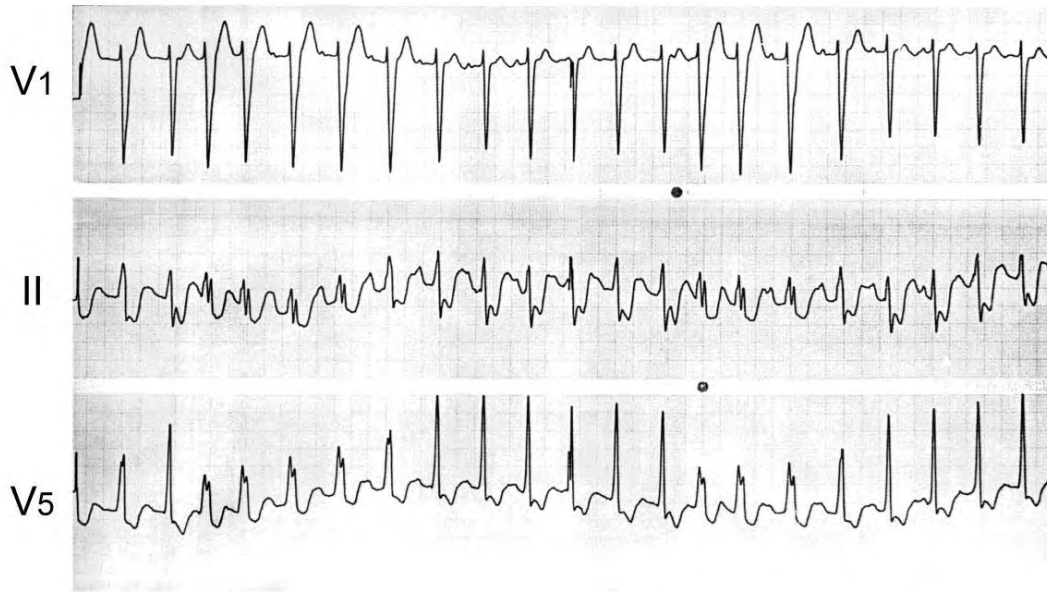
7. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J. Clin. Invest.* 2003;111:1537-1545
8. Britz-Cunningham SH, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH. Mutations of the connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *New Engl. J. Med.* 1995;332:1323-1330
9. Seki A, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. Loss of electrical communication, but not plaque formation, after mutations in the cytoplasmic loop of connexin43. *Heart Rhythm.* 2004;1:227-233
10. Anumonwo JMB, Taffet SM, Gu H, Chanson M, Moreno AP, Delmar M. The carboxyl terminal domain regulates the unitary conductance and voltage dependence of connexin40 gap junction channels. *Circ. Res.* 2001;88:666-673
11. 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 PJ, George AL, Roden DM. The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J. Clin. Invest.* 2008;118:2219-2229
12. Ge J, Sun A, Pajananen V, Wang S, Su C, Yang Z, Li Y, Wang S, Jia J, Wang K, Zou Y, Gao L, Wang K, Fan Z. Molecular and clinical characterization of a novel SCN5A mutation associated with atrioventricular block and dilated cardiomyopathy. *Circ Arrhythmia Electrophysiol.* 2008;1:83-92
13. Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongsma HJ, Wilde AA. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill.

Circ. Res. 2003;92:14-22

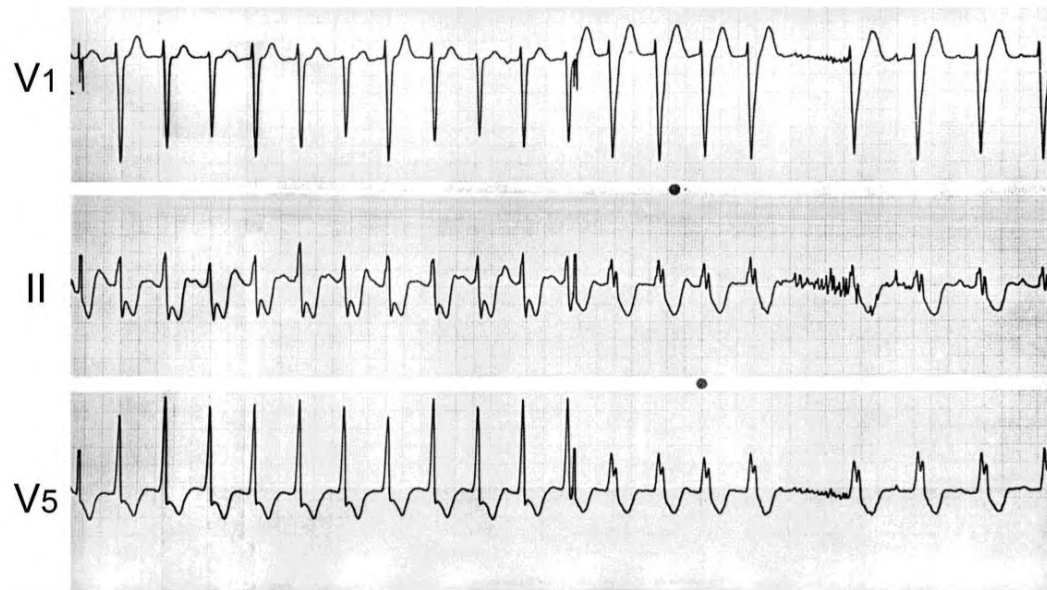
14. Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Electrocardiographic Characteristics and SCN5A Mutations in Idiopathic Ventricular Fibrillation Associated with Early Repolarization. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2011

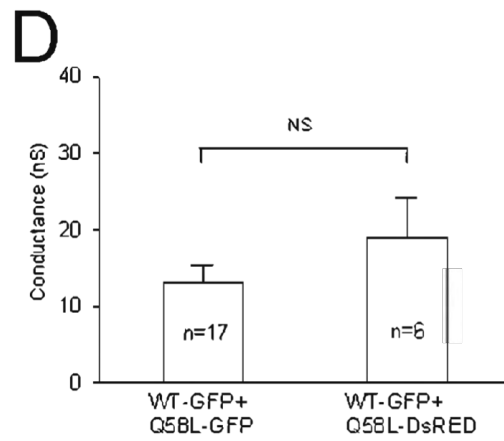
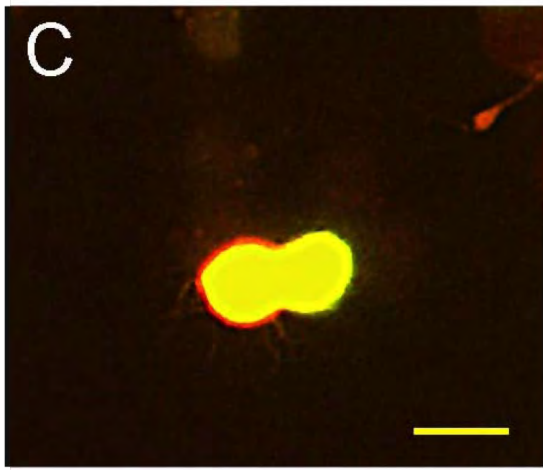
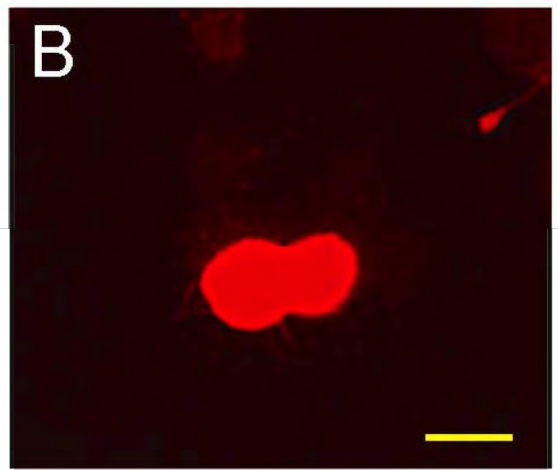
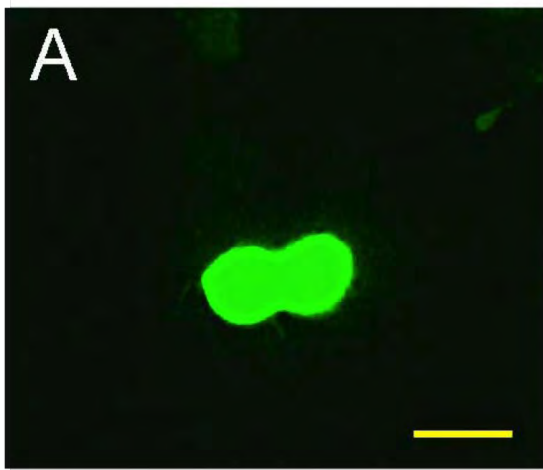


VT initiation at 1'17" (recovery phase)



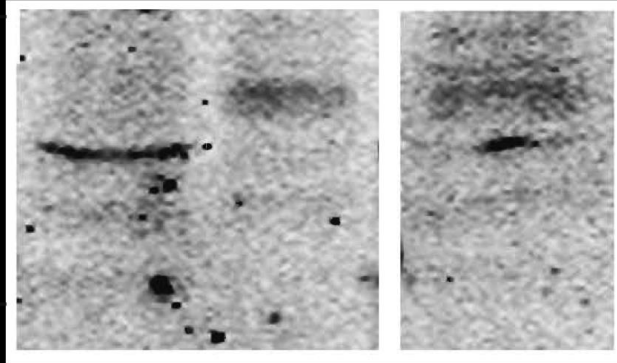
Spontaneous VT termination at 20'23"





Flow Through Elute Lysate

75



← Q58L-GFP

37

Supplemental Table S1. Genetic mutations identified in PFHBI probands

| Patient | Gene | Exon | cDNA mutation | Amino acid change | Mutation type | Phenotype | Reference |
|---------|--------------|-------|---------------|-------------------|---------------|----------------|---------------|
| 1 † | <i>GJA5</i> | 2 | c.173 A>T | Q58L | Missense | PFHBI | this study |
| 2 | <i>SCN5A</i> | 15 | c.2329T>C | F777L | Missense | PFHBI +DCM+MMD | this study |
| 3 †* | <i>SCN5A</i> | 14 | c.2102 delC | p.P701fsX710 | Deletion | PFHBI +BrS | this study |
| | <i>SCN5A</i> | 28 | c.6017 delC | p.P2006fsX2037 | Deletion | | this study |
| 4 | <i>SCN5A</i> | 28 | c.5290 delG | p.V1764fsX1786 | Deletion | PFHBI +BrS+MMD | this study |
| 5 | <i>SCN5A</i> | 20 | c.3539C>T | A1180V | Missense | PFHBI +DCM | ¹¹ |
| 6 | <i>SCN5A</i> | 21 | c. 3823G>A | D1275N | Missense | PFHBI +DCM | ¹² |
| 7 | <i>SCN5A</i> | Int22 | IVS22+2T>C | | Exon skipping | PFHBI | ¹³ |
| 8 | <i>SCN5A</i> | 28 | c.5280 delG | p.A1711fsX1786 | Deletion | PFHBI | ¹³ |
| 9 | <i>SCN5A</i> | 28 | c. 5129C>T | S1710L | Missense | PFHBI +IVF | ¹⁴ |
| 10 | <i>SCN1B</i> | 3 | c.259G>C | E87Q | Missense | PFHBI | ⁵ |
| 11 | <i>SCN1B</i> | 3A | c.536G>A | W179X | Missense | PFHBI+BrS | ⁵ |
| 12 | <i>SCN1B</i> | 3A | c.537G>A | W179X | Missense | PFHBI | ⁵ |

GJA5: connexin 40, *SCN5A*: cardiac voltage-gated Na channel α subunit, *SCN1B*: voltage-gated Na channel β 1 subunit

†: Patients 1 and 3 are sudden cardiac death victims

*: Patient 3 is a compound heterozygous carrier of *SCN5A* mutations

DCM: dilated cardiomyopathy, MMD: myotonic muscular dystrophy, BrS: Brugada syndrome, IVF: idiopathic ventricular fibrillation, Int22: Intron 22

Supplemental Table S2. ECG parameters of the family members

| Family | Age | HR (bpm) | PR (ms) | QRS (ms) | QTc (ms) | Axis (degree) | ST depression |
|---------|-----|----------|---------|----------|----------|---------------|------------------|
| Proband | 6 | 87 | * | 126 | 421 | -8 | II,III,aVF, V3-6 |
| | 8 | 77 | * | 128 | 396 | -21 | II,III,aVF, V2-6 |
| Sister | 6 | 86 | 130 | 86 | 404 | -25 | II,III,aVF, V3-6 |
| | 11 | 85 | 142 | 88 | 416 | -49 | II,III,aVF, V3-6 |
| Mother | 16 | 63 | 248 | 152 | 471 | -25 | II,III,aVF, V3-6 |

*: advanced AV block

V- Etude #4: ETUDE DU GÈNE *TRPM4*

V.1- Rappels sur *TRPM4*

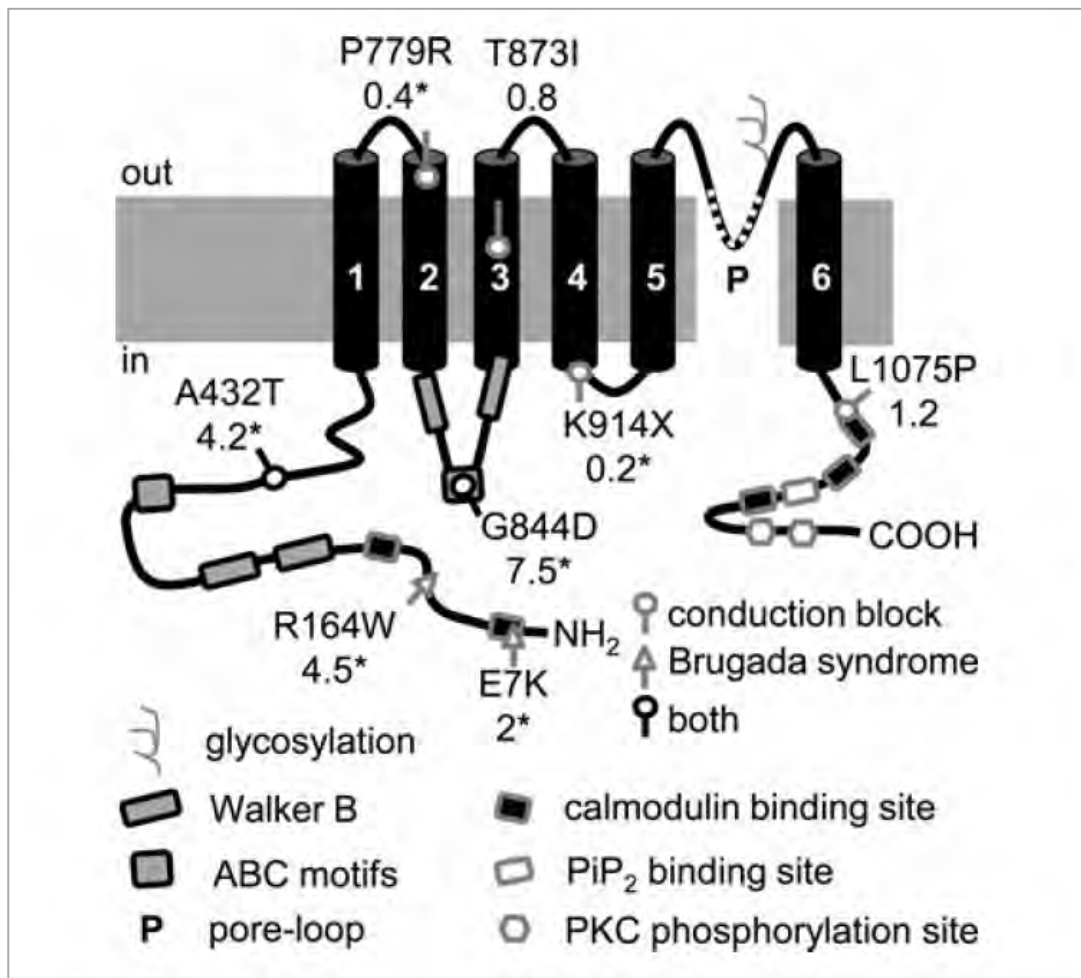
Le gène *TRPM4* (Transient receptor potential channel melastatin 4) code pour un canal cationique non sélectif activé par le calcium intracellulaire (Figures 3-8 et 3-9). Son expression est ubiquitaire. Cependant dans le coeur, on observe une répartition différentielle de ce canal selon le territoire considéré, *TRPM4* étant particulièrement exprimé dans le noeud sinusal, le massif atrial et le système de conduction cardiaque.

Des études récentes ont mis en évidence des mutations du gène *TRPM4* chez l'homme dans le syndrome de Brugada [Liu *et al*, 2013] et les troubles de conduction atrioventriculaire et/ou intraventriculaire [Kruse *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010; Stallmeyer *et al*, 2012] (Tableau 3-3). *TRPM4* a également été impliqué sur des modèles murins dans la régulation du rythme sinusal [Hof *et al*, 2013; Little *et al*, 2013] et l'hypertrophie myocardique [Demion *et al*, 2014; Kecskes *et al*, 2015].

Le mécanisme des mutations *TRPM4* associées aux troubles de conduction correspond à un effet gain-de-fonction par dérégulation de la desumoylation (mécanisme de modification protéique posttranslationnelle) du canal TRPM4, qui a pour conséquence d'altérer l'endocytose du canal muté et donc d'augmenter la concentration de ce canal TRPM4 à la surface de la cellule, sans modifier ses propriétés fonctionnelles [Kruse *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010].

A ce jour, 18 variants alléliques de *TRPM4* ont été associés à des troubles de conduction, suggérant que ce gène est un gène de susceptibilité important pour les anomalies de la conduction cardiaque chez l'homme [Kruse *et al*, 2014]. Le phénotype des troubles conductifs associés à des mutations de *TRPM4* est très proche de celui associé à des mutations de *SCN5A*, si bien que ces deux canaux pourraient s'influencer mutuellement, faire partie de la même voie physiopathologique impliquée dans la genèse et la propagation de l'influx électrique [Abriel *et al*, 2012] ou cette constatation pourrait traduire le fait que l'activité principale du canal TRPM4 est de donner lieu à un courant sodique entrant [Kruse *et al*, 2014]. Le mécanisme d'action des variants *TRPM4* décrits est complexe et encore obscur. Il a été proposé que les variants *TRPM4* agissent comme modificateurs dans le contexte d'un substrat génétique complexe [Stallmeyer *et al*, 2012].

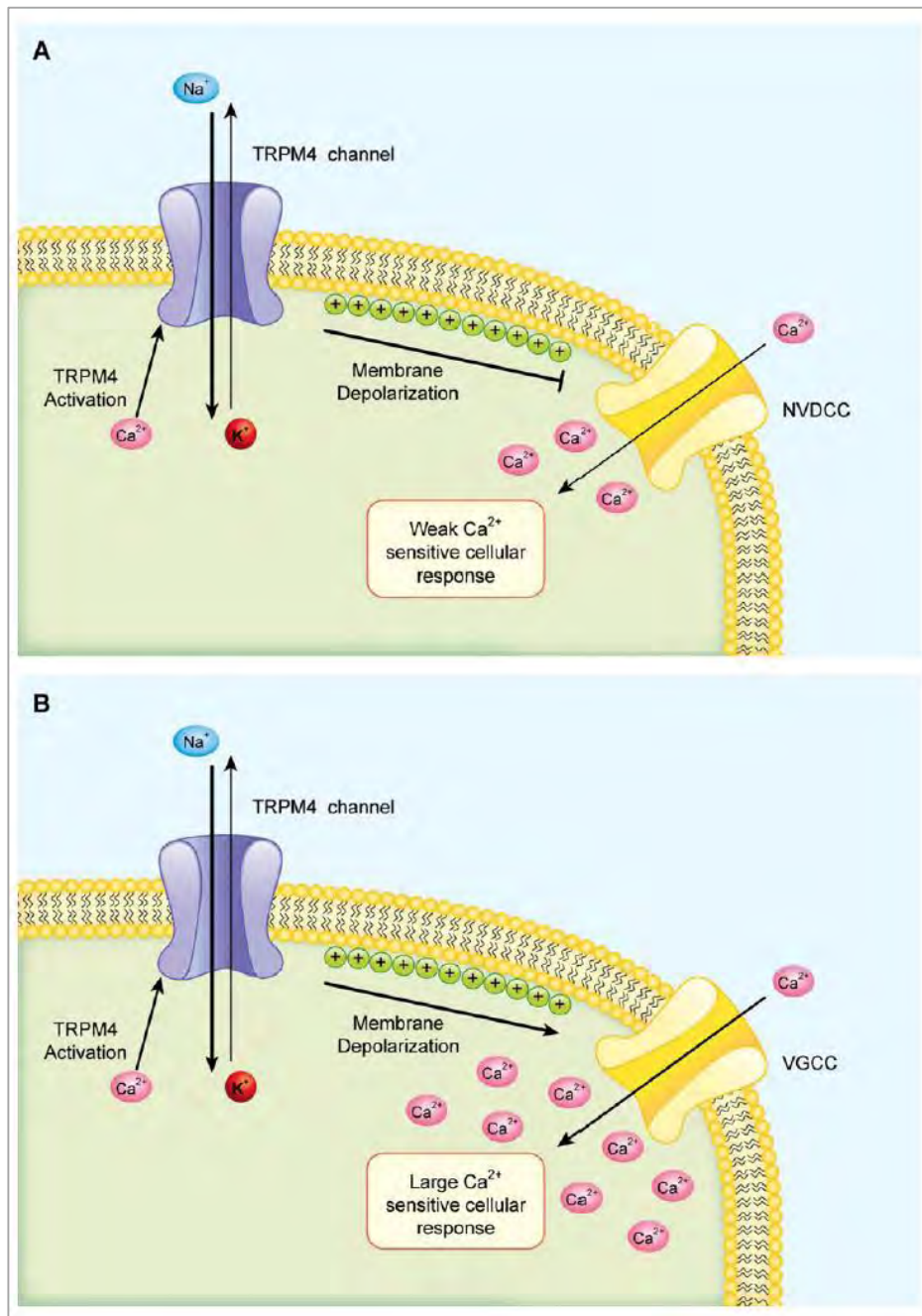
Figure 3-8: Représentation schématique du canal TRPM4 et localisation des mutations



TRPM4 est un canal cationique non sélectif formé de six segments transmembranaires (TM1 à TM6). Seules les mutations ayant un effet fonctionnel documenté sont représentées. Les étoiles colorées correspondent aux mutations identifiées et à leurs phénotypes respectifs. Les chiffres sous les mutations représentent le ratio de quantité de courant entre mutants et wild-type (astérisque: différence significative).

Adapté de [Guinamard et al, 2015]

Figure 3-9: Effet du canal TRPM4 sur les canaux calciques non-voltage-dépendants et sur les canaux calciques voltage-dépendants.



Suite à l'activation du canal TRPM4 par le calcium intracellulaire, la membrane plasmique est dépolarisée. A: Suite à la dépolarisation membranaire, la perméabilité pour le calcium des canaux calciques non-voltage-dépendants (NVDCC) est réduite et moins de calcium entre dans la cellule, induisant une moindre réponse cellulaire liée au calcium. B: A l'inverse, les canaux calciques voltage-dépendants (VGCC) sont activés suite à la dépolarisation membranaire, induisant une entrée de calcium dans la cellule et une franche réponse cellulaire liée au calcium.

Adapté de [Abriel et al, 2012]

Tableau 3-3: Mutations décrites dans TRPM4 et troubles de conduction associés

| Mutation | Changement protéique | Trouble de conduction | Phénotype | Reference |
|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------|--------------------------------|
| c.19G>A | p.E7K | BAV3 et BBD | PCCD | Kruse <i>et al</i> , 2009 |
| c.393G>C | p.Q131H | BBD | ICCD | Stallmeyer <i>et al</i> , 2012 |
| c.430C>T | p.R144W | BBD | BrS | Liu <i>et al</i> , 2013 |
| c.490C>T | p.R164W | BAV et BBD | ICCD | Liu <i>et al</i> , 2010 |
| c.878A>G | p.Q293R | BAV | ICCD | Stallmeyer <i>et al</i> , 2012 |
| c.1294G>A | p.A432T | BAV et BBD | ICCD | Liu <i>et al</i> , 2010 |
| c.1744G>A | p.G582S | BBD | ICCD | Stallmeyer <i>et al</i> , 2012 |
| c.2317T>A | p.F773I | BBD | BrS | Liu <i>et al</i> , 2013 |
| c.2336C>G | p.P779R | BBD | BrS | Liu <i>et al</i> , 2013 |
| c.2368T>G | p.Y790H | BAV | ICCD | Stallmeyer <i>et al</i> , 2012 |
| c.2531G>A | p.G844D | BAV et BBD | ICCD | Liu <i>et al</i> , 2010 |
| c.2561A>G | p.Q854R | BAV et BBD | BrS | Liu <i>et al</i> , 2013 |
| c.2618C>T | p.T873I | BAV et BBD | BrS | Liu <i>et al</i> , 2013 |
| c.2740A>T | p.K914X | BBD | BrS | Liu <i>et al</i> , 2013 |
| c.2741A>G | p.K914R | BAV | ICCD | Stallmeyer <i>et al</i> , 2012 |
| c.2908C>T | p.P970S | BBD | ICCD | Stallmeyer <i>et al</i> , 2012 |
| c.3224T>C | p.L1075P | BBD | BrS | Liu <i>et al</i> , 2013 |
| c.3611C>T | p.P1204L | BBD | BrS | Liu <i>et al</i> , 2013 |

BAV: bloc atrioventriculaire; BBD: bloc de branche droite; PCCD: troubles de conduction progressifs héréditaires; ICCD: trouble de conduction isolé; BrS: syndrome de Brugada.

V.2- Problématique

Le dépistage ECG de parents d'enfants porteurs d'un BAV d'allure sporadique et idiopathique nous a permis de mettre en évidence une forte héritabilité de cette forme pédiatrique de troubles de conduction, sous-tendant l'hypothèse d'une origine génétique [Baruteau *et al*, 2012]. A ce jour, trois principaux gènes ont été impliqués dans les troubles de conduction héréditaires de l'enfant: *NKX2.5* qui code pour l'homéodomaine Nkx2.5, *SCN5A* qui code pour le canal sodique voltage-dépendant Nav1.5, et *SCN1B* qui code pour la sous-unité beta-1 régulatrice du canal sodique [Schott *et al*, 1998; Schott *et al*, 1999; Watanabe *et al*, 2008]. Mais de récentes études ont identifié 18 variants alléliques du gène *TRPM4* (transient receptor potential channel melastatin 4) dans des formes héréditaires de troubles de la conduction ou de syndrome de Brugada [Kruse *et al*, 2009; Liu *et al*, 2010; Stallmeyer *et al*, 2012; Liu *et al*, 2012] (Tableau 3-3). *TRPM4* est donc un nouveau gène de susceptibilité pour les troubles conductifs de l'enfant.

V.3- Objectif

L'objectif de ce travail était d'étudier et de caractériser des variants du gène *TRPM4* impliqués dans la pathogénèse du BAV congénital et de l'enfance.

V.4- Méthodologie

Une population de 91 enfants issus de notre cohorte multicentrique de propositus porteurs d'un BAV isolé et non-immun diagnostiqué in utero ou dans l'enfance (étude #1) et leurs parents issus du dépistage familial (étude #2) ont été considérés dans ce travail. La méthodologie de l'étude clinique (constitution de la cohorte, modalité de recueil des données, modalité d'analyse des ECG) est décrite dans ces études.

Les caractéristiques cliniques des patients de cette étude sont décrites dans le Tableau 3-4. Une approche gène candidat a conduit au séquençage direct des gènes *SCN5A*, *SCN1B*, *NKX2.5* et *TRPM4*. Les études de fonction des variants identifiés ont été réalisées par Ninda Syam et l'équipe de Hugues Abriel au Department of Clinical Research, University of Bern, Switzerland. La méthodologie de ce travail est détaillée dans l'article #4.

Implication personnelle. Mon implication personnelle dans cette étude a concerné:

a/ son versant clinique essentiellement: j'ai constitué la cohorte de patients, coordonné le dépistage parental, interprété l'intégralité des tracés ECG, vérifié le phénotype clinique et ECG des patients (91 propositus et leurs parents) inclus dans ce travail.

b/ dans une moindre mesure: le séquençage des gènes *SCN5A*, *SCN1B* et *NKX2.5* sur un échantillon de 48 cas index. Le séquençage de ces 3 gènes sur le reste de la série et le séquençage de *TRPM4* a été réalisé par Stéphanie Chatel et Estelle Baron à l'institut du thorax.

Tableau 3-4: Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude #4

| | Total | Pas de variants <i>TRPM4</i> | Variants <i>TRPM4</i> |
|---|------------|------------------------------|-----------------------|
| Caractéristiques démographiques | | | |
| Nombre de propositus | 91 | 77 | 14 |
| Age médian au diagnostic, mois | 24 | 24 | 12 |
| BAV congénital, n (%) | 15 (16.5) | 10 (13.0) | 5 (35.7) |
| BAV de l'enfance, n (%) | 76 (83.5) | 67 (87.0) | 9 (64.3) |
| Description ECG | | | |
| Fréquence cardiaque, bpm | 56.0±16.4 | 56.0±16.0 | 54.0±19.5 |
| BAV complet, n (%) | 67 (73.6) | 52 (67.8) | 11 (78.6) |
| Trouble de conduction intraV, n (%) | 14 (15.4) | 9 (11.7) | 5 (35.7) |
| Durée du complexe QRS, ms | 80.0±28.8 | 79.0±28.5 | 88.0±31.1 |
| Durée de l'intervalle QTc, ms | 433.1±67.1 | 427.0±45.3 | 469.0±143.7 |
| Stimulateur cardiaque | | | |
| Implantation, n (%) | 73 (80.2) | 60 (77.9) | 13 (92.8) |
| Age médian à l'implantation, mois | 54 | 54 | 24 |
| Temps median entre diagnostic et primo-implantation, mois | 9.5 | 12.0 | 0.0 |

Moy.: moyenne; *SD:* écart-type; *intraV:* intraventriculaire; *QTc:* intervalle QT corrigé.

V.5- Principaux résultats

L'ensemble des résultats est détaillé dans l'article « **TRPM4 variants in congenital atrioventricular block** » (*Soumis*) présenté à la fin de cette section.

Les principaux résultats sont résumés ici. Tous les exons de quatre gènes candidats (*NKX2.5*, *SCN5A*, *SCN1B* et *TRPM4*) ont été séquencés dans une cohorte de 91 propositus (15 BAV congénitaux et 76 BAV de l'enfance) porteurs d'un BAV isolé et non-immun.

Parmi les trois gènes déjà décrits comme responsables de troubles de conduction chez l'enfant, trois variants ont été identifiés:

a/ la mutation hétérozygote A119S dans le gène *NKX2.5*, identifiée chez un garçon de 5 ans porteur d'un BAV complet à complexes QRS fins, chez qui un stimulateur cardiaque double chambre a été implanté par voie endocavitaire à l'âge de 11 ans à titre prophylactique devant des pauses cardiaques prolongées d'une durée supérieure à 3 intervalles RR.

Cette mutation A119S – déjà décrite chez un patient présentant une hypothyroïdie severe – est située dans l'exon 2, en position 531 sur la séquence génomique (Figure 3-10). Le changement

de base nucléotidique G>T (c.355 G>T) entraîne un changement d'acide aminé dans la séquence protéique, remplaçant une alanine en une sérine en position 119 (p.Ala118Ser) dans une séquence conservée au cours de l'évolution. Ce variant était présent chez la mère du cas index et absent chez le père. L'ECG de dépistage des parents montrait une conduction atrioventriculaire et intraventriculaire normale.

b/ le variant C211Y dans le gène *SCN1B*, identifié chez un jeune garçon porteur d'un BAV complet à QRS fins diagnostiqué à l'âge de 18 mois et implémenté d'un stimulateur cardiaque à 30 mois.

c/ le variant T1806SfsX27 mis en évidence dans *SCN5A* chez une jeune fille chez qui un BAV du premier degré avait été mis en évidence à l'âge de 7 ans.

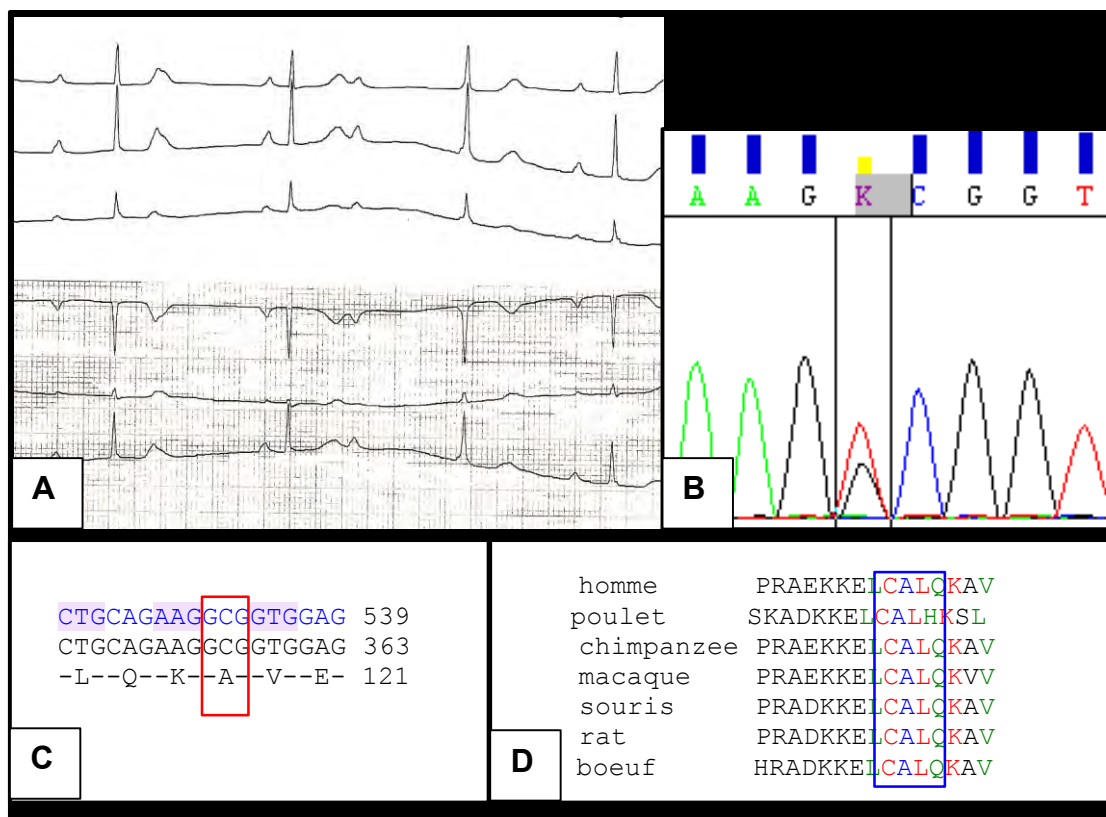
Le séquençage de *TRPM4* dans cette cohorte a retrouvé 10 variants chez 14 patients (Tableau 2-7). Trois de ces 10 variants (A432T, G528S et G844D) avaient déjà été rapportés dans des cas familiaux de troubles de conduction progressifs [Stallmeyer *et al*, 2012; Liu *et al*, 2010]. Deux variants (P1204L et K487L498del) sont connus comme étant des polymorphismes, du fait de leur fréquence dans la population générale [Kruse *et al*, 2009]. Ainsi cinq variants rares identifiés dans *TRPM4* (D198G, R252Q, T677I, G737R, V921I) n'avaient encore jamais été décrits et ont été étudiés. Le variant G582S était systématiquement associé au variant A432T chez deux propositus sans lien de parenté.

Etudié par la technique du patch clamp dans des cellules HEK293, le courant TRPM4 présente deux phases, une phase transitoire et une phase de plateau. Deux variants (A432T et A432T/G582S) induisaient une diminution de l'expression protéique au niveau de la membrane plasmique, alors que le variant G582S seul induisait une majoration de l'expression protéique comparé aux cellules sauvages. Seule l'amplitude de la phase de plateau correspondait au niveau d'expression protéique à la membrane plasmique. Des études antérieures avaient suggéré que l'altération de la SUMOylation pouvait causer un gain de fonction dû aux variant *TRPM4*. Cependant nous n'avons trouvé aucune preuve que la SUMOylation pouvait être ici impliquée. Nous avons observé une ubiquitylation de la protéine codée par *TRPM4*, mais sans modification fonctionnelle significative chez les mutants.

Plusieurs variants *TRPM4*, ayant un effet soit gain de fonction soit perte de fonction, sont associés au BAV congénital et/ou de l'enfance, lorsqu'il est isolé et non-immun. Nos résultats ne renforcent pas l'hypothèse que l'augmentation de l'expression membranaire serait due à une majoration de la SUMOylation. La diminution de l'expression de plusieurs mutants est plus probablement causée par une altération du trafic de la protéine. Il reste à éclaircir comment un effet perte de fonction et un effet gain de fonction peuvent tous deux être associés à une altération de la conduction

cardiaque. Il se peut que des mécanismes similaires à ceux de la conduction supranormale puissent être impliqués.

Figure 3-10: Variant allélique identifié dans le gène *NKX2.5*



A: ECG du propositus âgé de 5 ans et présentant un BAV complet à complexes QRS fins;

*B: Mise en évidence d'un variant hétérozygote G>T sur la séquence nucléotidique de l'exon 2 du gène *NKX2.5*;*

C: Le variant A19S est situé en position 531 sur la séquence de l'ADN génomique, en position c.355 sur la séquence du transcript et en position p.119 sur la séquence protéique;

D: Le variant A19S modifie un acide aminé dans une séquence hautement conservée au cours de l'évolution.

TRPM4 variants in childhood atrio-ventricular block

Syam and Chatel. TRPM4 variants in childhood atrio-ventricular block

Ninda Syam MSc^{1*}, Stéphanie Chatel PhD^{2*}, Valentin Sottas MSc¹, Jean-Sébastien Rougier PhD¹, Alban Baruteau MD^{2,3}, Estelle Baron², Mohamed-Yassine Amarouch PhD¹, Xavier Daumy MSc², Vincent Probst MD, PhD², Jean-Jacques Schott PhD² and Hugues Abriel MD, PhD¹

¹ Department of Clinical Research, and Swiss National Centre of Competence in Research (NCCR) TransCure, University of Bern, Switzerland

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche (UMR) 1087, l'Institut du thorax, Nantes, France.

- Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 6291, Nantes, France.

- Université de Nantes, Nantes, France.

- Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Nantes.

³ Marie Lannelongue Hospital, Department of Pediatric Cardiac Surgery – Paris Sud University, Paris, France.

*These authors contributed equally to this study

Journal Subject Codes: [132] Arrhythmias-basic studies

Correspondance to:

Dr. Jean-Jacques Schott, PhD
Institut du thorax Inserm UMR 1087/CNRS
UMR 6291
IRS-UN
Quai Moncousu, 8, 44007 Nantes France
Phone 33-2-28-08-01-51
Fax 33-2-28-08-01-30
Email: jjschott@univ-nantes.fr

Dr. Hugues Abriel, MD PhD
University of Bern, Department of Clinical
Research
Murtenstrasse, 35, 3010 Bern, Switzerland
Phone 41-3-16-32-09-28
Fax 41-3-16-32-09-46
Email: Hugues.Abriel@dkf.unibe.ch

Abstract

Background - Transient receptor potential melastatin member 4 (TRPM4) is a non-selective cation channel. *TRPM4* mutations have been linked to cardiac conduction disease and Brugada syndrome. The mechanisms underlying TRPM4-dependent conduction slowing are not fully understood.

The aim of this study was to characterize *TRPM4* genetic variants found in patients with childhood atrio-ventricular block (AVB).

Methods and Results - Ninety-one congenital or childhood AVB patients were screened for candidate genes. Five rare *TRPM4* genetic variants were investigated. When using HEK293 cells in whole-cell patch clamp configuration, the TRPM4 current displayed two phases, transient and plateau. Two variants, A432T and A432T/G582S, showed lower protein expression at the plasma membrane; while G582S, showed higher expression compared to wild-type. Only the amplitude of the plateau phase matched the protein expression at the plasma membrane. Low expressing mutants were rescued by incubating the cells at 28°C. Previous studies have suggested that altered SUMOylation may cause a gain-of-function displayed by *TRPM4* variants. We did not, however, find any evidence that SUMOylation was directly involved. We observed ubiquitylation of the TRPM4 protein, but no changes were found in the loss-of-expression mutants.

Conclusions - Several *TRPM4* variants linked to congenital AVB patients cause loss- and gain-of-function. No evidence was found that increased membrane expression may be due to increased SUMOylation. The loss-of-expression of several mutants is most likely caused by misfolding-dependent altered trafficking. How both loss- and gain-of-function may cause

conduction slowing remains to be determined, but may involve mechanisms similar to supranormal conduction.

Key words: TRPM4; atrio-ventricular block; and mutations.

Introduction

Congenital and childhood AVB [1] is characterized by a delay or interruption in the impulse transmission from the atria to the ventricles due to either anatomical or functional impairment in the conduction system that is observed at birth or at a young age. The conduction can be delayed, intermittent, or absent, and the conduction disturbances can be transient or permanent.

Implantation of a pacemaker is the main therapeutic option for congenital AVB. In young patients, congenital AVB could be due to either: a) an acquired autoimmune disease in which maternal autoantibodies against the intracellular ribonucleoproteins Ro/SSA and La/SSB cross the placenta and inhibit L-type calcium channels [2, 3] or b) genetic variants in *NKX2.5* [4, 5], *SCN5A* and *SCN1B* genes coding for the homeobox protein Nkx-2.5, the voltage-gated sodium channel Na_v1.5, and the auxiliary subunit beta1 of voltage-gated sodium channel respectively [5-7]. Recently at least 10 genetic variants in the transient receptor potential channel melastatin 4 gene (*TRPM4*) have been linked to different forms of cardiac conduction defect and Brugada syndrome (BrS) [8-11]. The ion channel TRPM4 is a member of the transient receptor potential channel (TRP) family, which comprises at least 28 genes in the human genome. TRPM4 is a Ca²⁺-activated non-specific cation channel, which is impermeable to Ca²⁺ and expressed in different cells of the cardiovascular system, such as arterial and venous smooth muscle cells and cardiac cells of the conduction pathways [8, 12-14]. As with all TRP channels, each monomer contains six transmembrane-spanning segments; while the channel pore is formed by a tetramer. The cellular response upon TRPM4 activation or inactivation depends on the cell type and the co-expression of membrane transporters. Its activation enables Na⁺ entry into the cell, leading to cellular membrane depolarization. TRPM4 also participates in intracellular Ca²⁺ sensing and

affects the driving force for Ca^{2+} and other ions by altering the cellular membrane electrical potential.

In a seminal study [8], the E7K *TRPM4* variant was found to be linked to progressive familial type I heart block in a large South African pedigree. Characterization of this variant demonstrated that it led to a gain-of-expression at the cell membrane as well as a gain-of-function. Further experiments suggested that increased SUMOylation of this variant might be the cause of the observed gain-of-function. The molecular details of these alterations, however, remain poorly understood. Importantly, the same group recently published preliminary evidence suggesting that *TRPM4* was not directly SUMOylated. Other *TRPM4* variants causing either gain- or loss-of-function have been found in patients with autosomal dominant cardiac conduction disease [9], different forms of cardiac conduction alterations [10] and BrS [11, 15]. While the study by Kruse *et al.* [8] clearly linked *TRPM4* to conduction block based on the genetic linkage, more recent studies have failed to demonstrate a direct relationship between the sporadic presence of the variants and the electric phenotypes. It has been proposed [10] that these *TRPM4* variants may act as modifiers in the context of a complex genetic background. Furthermore, the question of how both gain- and loss-of-function variants may lead to conduction slowing has yet to be determined [16].

In the present study, congenital AVB patients were found to carry rare genetic variants in the *TRPM4* gene. Characterization of five of these variants using HEK293 cells showed that they caused either loss- or gain-of-function. No evidence was found that the increased membrane expression may be due to the increased SUMOylation of *TRPM4*. The loss-of-expression and function of several mutants is most likely caused by misfolding-dependent altered trafficking.

Material and Methods

The study involving humans conforms to the guiding principles of the Declaration of Helsinki. Human subjects have given informed consent of a study that has been approved by the Institutional Committee on Human Research at the authors' institution.

Samples

A total of 91 unrelated patients and their parents were collected from a multicenter retrospective study from 1980 to 2009 carried out in 13 French tertiary hospitals [17]. Patients were included in the study if they had AV conduction disturbance, with negative maternal anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies and without associated structural cardiac malformation. Patients born before 1980 were excluded due to the major progress in prenatal diagnosis and neonatal management of AVB, as well as in pacing technologies. Both incomplete and complete AVB were considered. Patients with traumatic or post-operative heart block were excluded, as well as those with myocarditis, neuromuscular disorders, metabolic diseases, congenital structural heart disease likely to account for AVB and long QT syndrome. Mothers of included patients were all screened for maternal antibodies to soluble nuclear antigens 48-KDa SSB/La, 52-KDa SSA/Ro and 60-KDa SSA/Ro using quantitative radio ligand assays. In case of missing data or negative maternal antibodies diagnosed with a less sensitive technique, parents were contacted and re-screened with radio ligand assays. Written informed consent was obtained from all participants or their guardians. For each patient, standard 12-lead electrocardiogram (ECG) were collected at time of diagnosis and at time of pacemaker implantation or at last follow-up if not implanted. ECGs were analyzed by two blinded medical investigators and intervals durations were

measured using dedicated software DatInf® Measure. The earliest documentation of a conduction abnormality of a patient was used as the time of diagnosis of atrio-ventricular block. Type of block, heart rate, PR intervals, QRS complexes and QT intervals durations were determined. QT interval measurement was adjusted to the heart rate using the Bazett formula [18]. Among these 91 children, 15 showed congenital AVB (6 were diagnosed *in utero*) and 76 had childhood AVB. The median age at diagnosis is 24 months. Different types of conduction block were diagnosed: (a) 3 cases of AVB type 1, (b) 21 cases of AVB type 2 (23%) (8 Mobitz type 1 and 13 Mobitz type 2), and (c) 67 cases of complete AVB (73.6%). The majority (84.6%) of QRS complex durations were not increased, while intra-ventricular conduction abnormalities were observed in 14 children (15.4%) distributed in 7 blocks of right bundle branch (RBB) (3 complete and 4 incomplete), 5 left bundle branch block (LBBB) (3 complete and 2 left anterior hemiblock), 1 alternation between RBB and LBBB and 1 case of undetermined complete block. Implantation of a pacemaker was required in 73 children (80.2%) during a median follow up of 9.5 months.

Mutation screening

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by using NucleoSpin® Blood XL kit (Macherey-Nagel, Germany) as described by the manufacturer. *NKX2.5*, *SCN5A*, *SCN1B* and ten coding exons of *TRPM4* (ENSG00000130529, ENST00000252826) were screened by direct DNA sequencing and 15 coding exons of *TRPM4* were screened by high-resolution melting (HRM) curve analysis in all patients. The primers were designed to flank the coding regions. PCR and HRM were performed in a single run on a Light Cycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Switzerland). The HRM analysis was performed using Gene Scanning Software

Version 1.5.0 (Roche Instrument Centre, Switzerland), which allows clustering the samples into groups on the basis of difference plot obtained by analyzing the differences in melting curve shapes. All the samples studied were clustered at the default sensitivity setting (0.5). Samples with an aberrant melting profile were assigned for validation sequencing to identify or exclude sequence variants. Forward and reverse sequence reactions were performed with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, California, USA) using the same primers. The sequence products were analyzed on a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™, California, USA).

Molecular cloning

TRPM4 variants selected for molecular cloning were: p.D198G, p.A432T, p.G582S, p.T677I, and p.V921I. Constructions are called respectively: D198G, A432T, G582S, T677I, V921I and double variant (p.A432T/p.G582S) is called A432T/G582S. The cDNA of *TRPM4* was obtained in 2 overlapping fragments from human kidney RNA (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) by reverse transcription with Mu-MLV Reverse transcriptase (Eurogentec France SASU, Angers, France). The complete *TRPM4* cDNA was cloned in pcDNA4/TO vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). It was provided by A. Guse, (University Hospital Hamburg-Eppendorf) and P. Bouvagnet, Laboratoire Cardiogenetique, Hospices Civils de Lyon, Groupe Hospitalier Est, Bron, France. *TRPM4* p.E7K mutant (called *TRPM4* E7K) was provided by P. Bouvagnet. Primers for reverse transcription and PCR are available upon request. Mutant *TRPM4*-cDNAs were obtained by in vitro mutagenesis using the QuickChange XLII site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Mutagenesis primer sequences are available upon request. Mutant cDNA clones were systematically sequenced before used in further experiments.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney (HEK293) cells were cultured with DMEM medium supplemented with 4 mM Glutamine, 10% FBS and 20 ug/ml gentamycin. They were transiently transfected with 240 ng of either HA-TRPM4 WT, variants (D198G, A432T, G582S, A432T/G582S, T677I and V921I) or empty vector (pcDNA4TO) in a P100 dish (BD Falcon, Durham, North Carolina, USA) mixed with 30 μ l of JetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, France) and 250 μ l of 150 mM NaCl. The cells were incubated for 48 hours at 37°C with 5% CO₂. The amount of cDNA used here is proportionately increased to the one used for electrophysiological studies. For electrophysiological studies, T25 cm² flasks of HEK293 cells were transiently co-transfected using X-tremeGENE 9 DNA transfection mix reagent (Roche Diagnostics, IN, USA) with 80 ng of WT or variant TRPM4 channels. All transfections included 200 ng of cDNA encoding CD8 antigen as a reporter gene. Anti-CD8 beads (Dyna[®], Oslo, Norway) were used to identify transfected cells, and only CD8-displaying cells were analyzed. Cells were used 48 hours after transfection.

Real time quantitative PCR

RNA isolation was performed with Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany) as described by the manufacturer. Using cDNAs of transfected HEK293 cells we performed quantitative expression analysis with 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems[™], California, USA). The PCR amplification was performed with TaqMan[®] gene expression assay Hs01026070_m1 for human TRPM4. For control, we studied expression of co-transfected human CD8 gene with TaqMan[®] gene expression assay Hs00233520_m1. For each

sample, triplicate determinations were performed in a 96 wells optical plate using 80 ng cDNA, 1 μ l of 20X TaqMan® Gene Expression Assay, 10 μ l of 2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix no AmpErase® UNG, and 5 μ l of water in each 20 μ l reaction Plates were heated for 20 s at 95°C, and then 40 cycles of 1 s at 95°C and 20 s at 60°C were applied. Relative TRPM4 expression (Δ CT) was calculated by subtracting the signal threshold cycle (CT) of the control (CD8) from the CT value of TRPM4. Subsequently, $\Delta\Delta$ CT values were obtained for each mutant by subtracting the Δ CT of the TRPM4 WT from the Δ CT of each mutant. Results were then linearized by calculating $2^{-\text{exp}\Delta\Delta\text{CT}}$.

Cell surface biotinylation assay

Following 48 hours of incubation, transiently transfected HEK293 cells were treated with EZ-link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) 0.5 mg/ml in cold 1X PBS for 15 minutes at 4°C. Subsequently, the cells were washed twice with 200 mM glycine in cold 1X PBS and twice with cold 1X PBS to inactivate and remove the excess biotin, respectively. The cells were then lysed with 1X lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4; 150 mM NaCl; 1.5 mM MgCl₂; 1 mM EGTA pH 8.0; 10% Glycerol; 1% Triton X-100; 1X Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany)) for 1 hour at 4°C. Cell lysates were centrifuged at 16,000 g; 4°C for 15 minutes. Two milligram of the supernatant was incubated with 50 μ l Streptavidin Sepharose High Performance beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for 2 hours at 4°C, and the remaining supernatant was kept as the input. The beads were subsequently washed five times with 1X lysis buffer before elution with 50 μ l of 2X NuPAGE sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) plus 100 mM DTT at 37°C for 30

minutes. These biotinylated fractions were analyzed as TRPM4 expressed at the cell surface. The input fractions, analyzed as total expression of TRPM4, were resuspended with 4X NuPAGE Sample Buffer plus 100 mM DTT to give a concentration of 1 mg/ml and incubated at 37°C for 30 minutes.

Immunoprecipitation

Transiently transfected HEK293 cells in P100 plates were harvested after 48 hours incubation and lysed with 1X cold Ubi lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA pH 8.0, 10% Glycerol, 1X EDTA-free Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany), 2 mM N-Ethylmaleimide/NEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 10 mM iodoacetamide/IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)) containing 1% Triton X-100 for 1 hour at 4°C. Cell lysates were then centrifuged at 16,000 g; 4°C for 15 minutes. Two milligrams of the supernatant (lysate) was incubated at 4°C for 24 hours with 10 µg of anti-RanGAP1 A302-027A (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) or 20 µg of anti-HA MMS-101R (Covance, Princeton, New Jersey, USA) to immunoprecipitate RanGAP1 and HA-tagged TRPM4, respectively. One volume of 1X cold Ubi lysis buffer without Triton X-100 (to obtain a final concentration of 0.5% Triton X-100) was also added in the mix. On the next day, the lysate-antibody mix was transferred to a microcentrifuge tube containing 50 µg (1:1 beads to lysis buffer ratio) of Protein G Sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) which were previously washed three times with 1X cold Ubi lysis buffer containing 0.5% Triton X-100. After adding fresh 1X EDTA-free Complete Protease Inhibitor Cocktail, the mix was incubated overnight at 4°C. The beads were subsequently washed five times (4°C; 3000 rpm) with 1X cold Ubi buffer containing 0.3% Triton X-100 before elution with 50 µl of 2X NuPAGE sample

buffer plus 100 mM DTT at 37°C for 30 minutes. These samples are designated as immunoprecipitation (IP) fractions. The input fractions were resuspended with 4X NuPAGE Sample Buffer plus 100 mM DTT to give a concentration of 1 mg/ml and incubated at 37°C for 30 minutes. All lysis and incubation steps, except elution in sample buffer, were performed in absence of light.

Low temperature rescue experiments

HEK293 cells were transiently transfected individually TRPM4 WT or TRPM4 variants (A432T, A432TG582S). After the first 24 hours incubation at 37°C (95% O₂ and 5%CO₂) one set of transfected HEK293 cells was kept in the same incubator, while another set was shifted to a 28°C incubator supplied with 95% O₂ and 5% CO₂ for 24 hours. The following day, cell surface biotinylation assay (as described above) was performed on the two sets of HEK293 cells.

Generation of GST and GST-S5A and pull-down experiments

Glycerol stocks of *E. coli* DH5 α transformed with pGEX-4T3 (GST alone) and pGEX-S5A were added to 1 liter LB medium containing ampicillin (0.1 μ g/ μ l) and grown to an OD₆₀₀ of 0.600. The bacterial cultures were then induced with 1mM IPTG for 2.5 hours at 29°C. Cells were harvested by centrifugation (4600 rpm, 4°C, 15 min in Sorvall Legend RT+ benchtop centrifuge), resuspended in 25 ml 1X bacterial lysis buffer (0.5 M Tris pH 7.5, 2.5M NaCl, 10% Igepal, and 1X Complete Protease Inhibitor Cocktail), added with 0.2 mg/ml lysozyme and then mixed by gently inverting the tube several times until it appeared viscous. The mix was then neutralized by adding 10 mM MgSO₄ and sonicated 3 times for 10 seconds each at 100% power (with 10 seconds break in between) to disrupt DNA. To obtain protein lysate, the mix was

transferred to Sorvall tube and centrifuged in ss-43 rotor for 10 min at 15,000 rpm at 4°C.

Protein lysate was then transferred to a falcon tube and combined with 3 ml of GSH-sepharose beads (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) previously washed with distilled water and 1X bacterial lysis buffer and rotated on a wheel at 4°C for 2 hours to facilitate binding. The mix was then washed 5 times with 15 ml 1X bacterial lysis buffer (4°C 10 min at 1000 rpm in Sorvall Legend RT+ benchtop centrifuge). After the concentration of GST fusion protein/GSH-sepharose complex was determined, it was stored in glycerol buffer at 4°C. Transiently transfected HEK293 cells in P100 plates were harvested after 48 hours incubation and lysed with 1X cold Ubi lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA pH 8.0, 10% Glycerol, 1X EDTA-free Complete Protease Inhibitor Cocktail, 2 mM NEM) containing 1% Triton X-100 for 1 hour at 4°C. Cell lysates were then centrifuged at 16,000; g 4°C for 15 minutes. One milligram of the supernatant (lysate) was incubated with 100 µg of GST or GST-S5A coupled on GSH beads at 4°C for 2 hours. The beads were subsequently washed five times (4°C; 3000 rpm in tabletop centrifuge) with the same 1X cold Ubi buffer described above except containing 0.5% Triton X-100 before elution with 50 µl of 2X NuPAGE sample buffer plus 100 mM DTT at 37°C for 30 minutes. These samples are designated as pull-down fractions. The input fractions were resuspended with 4X NuPAGE Sample Buffer plus 100 mM DTT to give a concentration of 1 mg/ml and incubated at 37°C for 30 minutes.

Western Blot experiments

Protein samples were analyzed on 9% polyacrylamide gels, transferred with the TurboBlot dry blot system (Biorad, Hercules, CA, USA) and detected with anti-TRPM4 (generated by Pineda, Berlin, Germany), anti-RanGAP1 A302-026A (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA),

anti-SUMO1 S8070 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), anti-SUMO2/3 ab3742 (Abcam, Cambridge, UK), anti-Na⁺/K⁺ ATPase α 1 ab7671 (Abcam, Cambridge, UK) and anti α -actin A2066 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) antibodies using SNAP i.d. (Millipore, Billerica, MA, USA). The anti-TRPM4 antibody was generated by Pineda (Berlin, Germany) using the following peptide sequence: NH₂-CRDKRESDSERLKRTSQKV-CONH₂. A fraction of the antisera, which was subsequently used in this study, was then affinity purified.

Cellular Electrophysiology

For patch-clamp experiments in whole-cell configuration, intracellular solution contained (in mM): 100 CsAsp, 20 CsCl, 4 Na₂ATP, 1 MgCl₂, 10 EGTA, and 10 HEPES. The pH was adjusted to 7.20 with CsOH, and the free Ca²⁺ concentration at 100 μ M with CaCl₂ using WEBMAXCLITE program (<http://www.stanford.edu/cpatton/downloads.htm>). Na₂ATP has been added to the intracellular solution to be closer as much as possible to physiological cytosolic solution and to provide phosphate residue for phosphorylation processes. Extracellular solution contained (in mM): 156 NaCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 6 CsCl, 10 glucose and 10 HEPES. The pH was adjusted to 7.40 with NaOH. Patch-clamp recordings were carried-out in the whole-cell configuration at room temperature. TRPM4 currents were investigated using a ramp protocol. The holding potential was -60 mV. The 400 ms increasing ramp from -100 to +100 mV ends with a 300 ms step at +100 mV then 300 ms at -100mV. A new ramp was performed every 2 seconds. Current densities were obtained by dividing the peak current recorded at -100 mV by the cell capacitance.

Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm S.E.M. The unpaired, two-tailed Student's t-test was used to compare the means, with $p < 0.05$ considered as significant. For the experiments, the wild-type condition is used as the reference for the normalization and the quantification.

Results

Genetic screening in patients with congenital AVB

All exons of the *NKX2.5*, *SCN5A*, *SCN1B* and *TRPM4* genes were directly sequenced or screened using HRM in a cohort of 91 pediatric patients (Table 1) with congenital (n=15) or childhood AVB (n=76) (Figure 1). The genes already identified in cardiac conduction diseases were screened initially, i.e. *NKX2.5*, *SCN5A* and *SCN1B* (Table 2). One non-synonymous variant was identified in *NKX2.5* (A119S) (Table 2). This variant was detected in a boy with complete AVB, which was diagnosed when he was 5 years old and a pacemaker was implanted at 11. This A119S mutation has been previously described in a patient with severe hypothyroidism. One non-synonymous variant was identified in *SCN1B* (C211Y) in a young boy with complete AVB diagnosed at 18 months of age and a pacemaker was implanted at 30 months of age. One frame shift variant was identified in *SCN5A* (T1806SfsX27) in a girl with first degree AVB diagnosed at 7 years of age. This child, with a follow-up of 4 years, was never implanted with a pacemaker (Tables 2).

TRPM4 was screened in this cohort (Table 2) as there have been four recent studies which have reported variants in *TRPM4* in patients with cardiac conduction disease and BrS [8-11]. We identified ten *TRPM4* variants in 14 patients, three of which have already been reported in familial cases of progressive cardiac conduction disease (A432T, G582S and G844D) [9, 10] (Table 2). The G582S variant was only found to be isolated with A432T variants in two patients belonging to two unrelated families (Table 2). Two of the 10 *TRPM4* variants have been previously classified as polymorphisms (P1204L and K487L498del) [8] due to their frequencies in control populations, whereas five non-synonymous variants have never been previously described (D198G, R252Q, T677I, G737R, V921I) (Table 2).

Pathogenicity assessment of *TRPM4* variants

Allele frequency was evaluated in a cohort of controls. The results are shown in table 2. Five variants with an allele frequency $\leq 0.1\%$ were classified as polymorphisms and were excluded from functional analysis (R252Q, Y487_L498del, G737R, G844D and P1204L) (Table 2). Five rare variants with a frequency $\leq 0.1\%$ (D198G, A432T, G582S, T677I, and V921I), found in conserved regions of *TRPM4* (Figure 2), were subjected to biochemical and functional investigations.

The double variant: A432T/G582S

The *TRPM4* mutant A432T has been previously shown to generate a gain-of-function [9]. In the present study, we identified two unrelated patients with this variant (Figure 1 and 3). In contrast to the former study [9], these patients also had a second variant, G582S (Figure 1), on the same haplotype. Functional studies were simultaneously performed on A432T, G582S and A432T/G582S, in order to evaluate the impact of the individual variants on *TRPM4* function. These two patients are the patients with the *NKX2.5* variant and the *SCN5A* variant, as described above (Table 2).

TRPM4 variants show different protein expression levels

We assessed whether the *TRPM4* variants have any effect on protein expression when expressed transiently in HEK293 cells. We performed cell surface biotinylation experiments in order to determine if they affect *TRPM4* expression at the cell membrane. As previously reported [19], we observed that WT and *TRPM4* variants were expressed in fully and core glycosylated forms

(Figure 4A). We expressed the E7K variant to serve as a control. The E7K variant was previously reported in a family with a cardiac conduction defect [8], and was shown to lead to increased expression levels in HEK293 cells [8]. As illustrated in figures 4A and 4B, we also observed increased expression at the cell membrane ($184 \pm 26\%$ of WT). Two variants, A432T and A432T/G582S, showed decreased expression ($28.8 \pm 4.5\%$ and $16.5 \pm 6.9\%$ of WT, respectively). The variant G582S showed increased expression ($176.5 \pm 15\%$ of WT), while the others, D198G, T677I, and V921I, showed no significant changes in expression (Figures 4A and 4B). We performed RT-PCR experiments in order to determine if these differences may have been due to variable mRNA levels. No significant differences were observed (Figure 5).

Plateau phase of TRPM4 current matches with the expression level

As recently reported using the patch clamp technique in whole cell configuration with HEK293 cells [20], TRPM4 currents recorded over time show two distinct phases (Figure 6A). There is a transient phase of about 1.5 minutes that appears quickly after the rupture of the membrane patch, and a plateau phase which appears 4-8 minutes later (Figure 6A). To investigate the functional consequences of the TRPM4 variants, we measured the transient and plateau current densities using a ramp protocol (Figure 6B). In contrast to the transient phase, the amplitudes of the TRPM4 current densities of the individual variants at the plateau phase matched the surface expression levels (Figures 4B and 6C). The plateau phase of the G582S and E7K variants showed an increase of current densities, while that of A432T was decreased (Figure 6B and 6C).

No evidence for SUMOylation of TRPM4

In the initial report linking *TRPM4* to cardiac conduction defects [8], it was proposed that the gain-of-function demonstrated by the E7K variant, which was observed as increased protein expression and current density, was caused by an augmentation of channel SUMOylation. One of the variants in the present study, G582S, showed increased expression at the plasma membrane (Figure 4B) and an increased plateau phase current density (Figure 6C), similar to that of E7K. We performed immunoprecipitation experiments and subsequent Western blots using anti-SUMO1 and, anti-SUMO2/3 antibodies to investigate its SUMOylation status. The Ran GTPase-activating protein 1 (RanGAP1) was used as a positive control, as it is a well-known protein that is SUMOylated with SUMO1, 2 and 3 [21]. As illustrated in Figure 7A, both RanGAP1 (left panel) and TRPM4 (right panel) were immunoprecipitated with the mutants displaying increased expression level. RanGAP1 showed a doublet, corresponding to its SUMOylated form (~90 KDa) and non-SUMOylated form (~70 KDa)[22]. The immunoprecipitated RanGAP1 and TRPM4 were then blotted with anti-SUMO1 and anti-SUMO2/3. As shown in figure 7B, RanGAP1 showed clear signals for anti-SUMO1 (upper panel) and anti-SUMO2/3 (lower panel) at ~90 KDa, while TRPM4 WT and both of the variants did not, even with longer membrane exposure time (upper and lower panel) (Figure 7B). Based on these results, we came to the conclusion that TRPM4 is not directly SUMOylated with SUMO1, 2 or 3.

Since Ubc9 is the E3 ligase responsible for SUMOylation [8, 9], we tested whether this enzyme was able to increase the current density of WT TRPM4 as previously shown by Kruse *et al.*[8]. As seen in figure 7C, the co-expression of Ubc9 increased the TRPM4 current density by three-fold. However, since a similar increase was observed with the catalytic inactive mutant (Ubc9*) of the E3 ligase, we concluded that this effect was not dependent on the SUMOylation activity of

the protein. Altogether, we propose that SUMOylation of TRPM4 is unlikely linked to the increased expression and the gain-of-function of the TRPM4 G582S variant.

TRPM4 variants are rescued by incubation at low temperature

Two *TRPM4* variants, A432T and A432T/G582S, showed reduced protein expression at the plasma membrane (Figure 4B), a phenomenon that has not been previously reported. Since decreased expression may be a result of protein misfolding, we tested whether lowering the incubation temperature, a procedure known to rescue misfolded membrane proteins, could increase the expression of these variants. As illustrated in figure 8A, lowering the incubation temperature of cells expressing these variants to 28°C for 24 hours, partially rescued the expression of the two variants. There was no effect on the WT channels at the total level (A432T 78±3% and A432T/G582S 69±5% of WT) nor at the cell surface level (A432T 72±8% and A432T/G582S 65±7% of WT). This partial rescue was also observed at the functional level (Figure 8). At the plateau phase, there was a significant increase in the current density of A432T (at 28°C 599±104 pA/pF n=6 vs. at 37°C 230±27 pA/pF n=6; p<0.05); while the WT showed no significant change (at 28°C 639±101 pA/pF n=4 vs. at 37°C 553±74 pA/pF n=6; p>0.05) (Figure 8B). This correlation between protein expression and activity was not observed for the transient phase (Figure 8B).

A fraction of TRPM4 protein is ubiquitylated

As presented in figure 8, protein misfolding seems to be involved in decreased protein level of selected TRPM4 variants. It may be postulated that the ubiquitylation-proteasome system might also play a role in this phenomenon. To see whether TRPM4 can be ubiquitylated, we performed

GST pull-down experiment using GST-S5a, a GST-tagged proteasome subunit which recognizes ubiquitylated proteins. With this GST-S5a, we were able to pull-down bulk ubiquitylated proteins which were otherwise absent when pulled down with GST only (Figure 9A). As presented in figure 9A, the pull-down fractions showed bands that correspond to TRPM4 when revealed with antibody against TRPM4. However, quantification of input and pull down fractions did not show any significant difference between the two fractions for the WT and mutant TRPM4 channels (Figure 9B).

Discussion

The main findings of the present study are: (1) two of the 5 rare variants in the gene encoding the TRPM4 channel found in individuals with congenital and childhood AVB led to either gain- or loss-of-expression at the cellular membrane of HEK293 cells; (2) the observed plateau phase of the TRPM4-mediated current was consistent the cell surface expression of the channel; (3) no evidence for a direct or indirect role of SUMOylation in the gain-of-expression of *TRPM4* variants was observed; and (4) the loss-of-expression of *TRPM4* variants is likely to be due to protein misfolding, as a reduced incubation temperature was able to partially rescue expression and function.

Roles of TRPM4 in cardiac function

The localization and role of the TRPM4 channel in the heart is still not completely understood. The fact that the pathogenic *TRPM4* variant E7K, among others, leads to conduction disorders [8], and that immunoreactivity was observed in Purkinje fibers of the bovine heart [9], strongly suggest that the TRPM4 channel is expressed and plays an important role in the cardiac conduction pathway. Furthermore, several studies [9, 23] have provided evidence for the expression and function of TRPM4 in the atrial myocardium and mouse sino-atrial node cells [24]. Mathar *et al.* [14] recently recorded TRPM4 currents from isolated ventricular myocytes using *Trpm4* knock-out (KO) mice. These Ca^{2+} activated currents were found to prolong the late phase of the mouse action potential [14]. Interestingly, the silencing of TRPM4 increased the beta-adrenergic-dependent inotropic response of the ventricles. The ECG characteristics of *Trpm4* KO mice are controversial. Mathar *et al.* [14] did not observe any difference in the standard ECG parameters; while Demion *et al.* reported in a not yet published study (abstract) prolonged PR and QRS durations, reduced conduction times above and below the His-bundle, as well as episodes of intermittent AVB. This discrepancy may be due to the different genetic background of the two different KO mouse lines.

To date four studies [8-11] have reported rare *TRPM4* variants in patients and families with various types of cardiac conduction disorders and BrS. The present study further supports the role of this channel in cardiac conduction, particularly in atrio-ventricular conduction. We, therefore, propose that this gene be added to the list of candidates to be screened in patients with conduction disease and BrS.

Both gain- and loss-of-function is observed

The mechanism by which these rare *TRPM4* variants may reduce impulse propagation in the conduction pathway was not directly addressed in this study. The observation that, as in BrS [11], these variants lead to either gain- or loss-of-function is puzzling. This may indicate the role of a mechanism analogous to the supernormal excitability and conduction phenomenon [25] that has been described in AV conduction [26]. Since TRPM4 generates a net inward depolarizing current, assuming a tonic activity under resting conditions, its increase would depolarize the resting membrane potential, while its reduction would hyperpolarize it. As a consequence, the availability of the excitable Na⁺ and Ca²⁺ channels would depend on TRPM4 activity. Thus both TRPM4-dependent hyperpolarization and depolarization of the resting membrane potential could reduce excitability and conduction. However, no changes in the resting membrane potential of ventricular cardiomyocytes were reported in the study of Mathar *et al.*[14] suggesting that this model should be further investigated using cardiac tissues from WT and Trpm4-KO mice, with particular attention to its roles in the conduction pathway.

Pathogenic mechanisms of the gain-of-function

Similar to the E7K *TRPM4* variant [8], increased membrane expression and activity was observed with the G582S variant. We investigated the hypothesis that TRPM4 could be SUMOylated and that the variant had increased SUMOylation, as shown by Kruse *et al.*[8]. Despite using conclusive positive controls, we did not observe direct SUMOylation of either the WT or G582S TRPM4 channels. While we did observe a stimulatory effect on WT TRPM4 with the co-expression of the SUMO-conjugating enzyme Ubc9, similar to Kruse *et al.*[8], this increase was also observed when a catalytic inactive mutant of Ubc9 was used. These findings suggest that the role of SUMOylation in the mechanism of gain-of-expression and function of

TRPM4 variants should be reconsidered. The direct SUMOylation of *TRPM4* has also been recently questioned in the thesis study of Wu. Y. Further studies are required to tackle this important question.

Pathogenic mechanisms of loss-of-expression

In the present study the variant A432T alone or in conjunction with G582S, as found in two AVB patients, led to a reduction in cell surface expression and function. As the expression and function was partially rescued by reducing the incubation temperature, we conclude that these variants are likely subject to endoplasmic reticulum-dependent degradation due to their misfolding, as observed for many mutated membrane proteins [27]. This point could have therapeutic implications. As is the case with mutations of the CFTR channel in cystic fibrosis [28], it might be possible to treat such patients with pharmacological chaperone molecules [29].

Limitations of the study

One of the main limitations of this study is that no direct causality between the *TRPM4* variants and congenital AVB could be demonstrated. The small pedigree size along with the sporadic nature of the presence of the variants with the phenotype precludes any statistical associations. In addition two variants identified did not lead to any defects in our conditions. Future genetic studies with larger cohorts of patients with different types of conduction disorders will help to answer the precise role of *TRPM4* in these phenotypes. In addition, caution must be taken when extrapolating the results of heterologous expression studies, as performed in this study, to the *in vivo* situation. Further studies using knock-out and knock-in mouse models expressing similar

variants are required to better ascertain the proposed molecular and cellular pathological mechanisms.

Conclusions

In conclusion, this study further supports a role of *TRPM4* genetic variants in genetically-determined cardiac conduction disorders such as congenital and childhood AVB. Future studies addressing the location, physiological and pathophysiological roles of this channel in cardiac function are clearly necessary.

Acknowledgments

We thank Dr. A. Felley and the members of the Hugues Abriel's group for their help and useful comments on this manuscript. The authors would like to thank the contribution of pediatric cardiologists (listed below), as well as the NHLBI GO Exome Sequencing Project and its ongoing studies which produced and provided exome variant calls for comparison: the Lung GO Sequencing Project (HL-102923), the WHI Sequencing Project (HL-102924), the Broad GO Sequencing Project (HL-102925), the Seattle GO Sequencing Project (HL-102926) and the Heart GO Sequencing Project (HL-103010). The following pediatric cardiologists that provided patients are acknowledged: Albin Behaghel, Philippe Mabo, Elisabeth Villain, Jean-Benoit Thambo, Francois Marcon, Veronique Gournay, Francis Rouault, Alain Chantepie, Sophie Guillaumont, Francois Godart, Caroline Bonnet, Alain Fraisse, Jean-Marc Schleich, Jean-Rene Lusson, Yves Dulac, Christophe Leclercq, Jean-Claude Daubert.

Source of Funding

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies grant 14305, and ANR-08-GENO-006-01, project R08147DS, the Swiss National Science Foundation to Hugues Abriel (310030B_14706035693), and the TransCure NCCR network, the Berne University Research Foundation, PHRC PROG/11/33 - RNI to Vincent Probst and the Leducq Foundation (CVD-05; Alliance Against Sudden Cardiac Death) to Jean-Jacques Schott.

Disclosures

None

Author contributions

Conception and design of the experiments: NS¹, SC², VS¹, JSR¹, AB^{2,3}, EB², MYA¹, XD², VP², JJS², and HA¹.

Collection, analysis and interpretation of data: NS¹, SC², VS¹, JSR¹, AB^{2,3}, EB², MYA¹, XD², VP², JJS², and HA¹.

Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: NS¹, SC², VS¹, JSR¹, AB^{2,3}, EB², MYA¹, XD², VP², JJS², and HA¹.

¹ Department of Clinical Research, and Swiss National Centre of Competence in Research (NCCR) TransCure, University of Bern, Switzerland

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche (UMR) 1087, l'Institut du thorax, Nantes, France.

- Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 6291, Nantes, France.

- Université de Nantes, Nantes, France.

- Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Nantes.

³ Marie Lannelongue Hospital, Department of Pediatric Cardiac Surgery – Paris Sud University, Paris, France.

All authors approved the final version of the manuscript and all authorships are listed.

References

1. A.E. Baruteau, A. Behaghel, S. Fouchard, P. Mabo, J.J. Schott, C. Dina, S. Chatel, E. Villain, J.B. Thambo, F. Marcon, V. Gournay, F. Rouault, A. Chantepie, S. Guillaumont, F. Godart, R.P. Martins, B. Delasalle, C. Bonnet, A. Fraisse, J.M. Schleich, J.R. Lusson, Y. Dulac, J.C. Daubert, H. Le Marec, V. Probst, Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood nonimmune isolated atrioventricular block, *Circulation*, 126 2012 1469-1477.
2. G.Q. Xiao, K. Hu, M. Boutjdir, Direct inhibition of expressed cardiac l- and t-type calcium channels by igg from mothers whose children have congenital heart block, *Circulation*, 103 2001 1599-1604.
3. G.Q. Xiao, Y. Qu, K. Hu, M. Boutjdir, Down-regulation of L-type calcium channel in pups born to 52 kDa SSA/Ro immunized rabbits, *FASEB J*, 15 2001 1539-1545.
4. D. Korb, P.Y. Tng, V.M. Milenkovic, N. Reichhart, O. Strauss, O. Ritter, T. Fischer, P.M. Benz, K. Schuh, Identification of PDZ Domain Containing Proteins Interacting with 1.2 and PMCA4b, *ISRN Cell Biology*, 2013 2013 16.
5. O.W. Prall, D.A. Elliott, R.P. Harvey, Developmental paradigms in heart disease: insights from tinman, *Ann Med*, 34 2002 148-156.
6. J.M. Lupoglazoff, T. Cheav, G. Baroudi, M. Berthet, I. Denjoy, B. Cauchemez, F. Extramiana, M. Chahine, P. Guicheney, Homozygous SCN5A mutation in long-QT syndrome with functional two-to- one atrioventricular block, *Circ.Res.*, 89 2001 E16-E21.
7. H. Watanabe, T.T. Koopmann, S. Le Scouarnec, T. Yang, C.R. Ingram, J.J. Schott, S. Demolombe, V. Probst, F. Anselme, D. Escande, A.C. Wiesfeld, A. Pfeufer, S. Kaab, H.E. Wichmann, C. Hasdemir, Y. Aizawa, A.A. Wilde, D.M. Roden, C.R. Bezzina, Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans, *J Clin Invest*, 118 2008 2260-2268.
8. M. Kruse, E. Schulze-Bahr, V. Corfield, A. Beckmann, B. Stallmeyer, G. Kurtbay, I. Ohmert, P. Brink, O. Pongs, Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I, *J Clin Invest*, 119 2009 2737-2744.
9. H. Liu, L. El Zein, M. Kruse, R. Guinamard, A. Beckmann, A. Bozio, G. Kurtbay, A. Megarbane, I. Ohmert, G. Blaysat, E. Villain, O. Pongs, P. Bouvagnet, Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease, *Circ Cardiovasc Genet*, 3 2010 374-385.
10. B. Stallmeyer, S. Zumhagen, I. Denjoy, G. Duthoit, J.L. Hebert, X. Ferrer, S. Maugenre, W. Schmitz, U. Kirchhefer, E. Schulze-Bahr, P. Guicheney, Mutational spectrum in the Ca(2+) -activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances, *Hum Mutat*, 33 2012 109-117.
11. H. Liu, S. Chatel, C. Simard, N. Syam, L. Salle, V. Probst, J. Morel, J. Millat, M. Lopez, H. Abriel, J. Schott, R. Guinamard, P. Bouvagnet, Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 Brugada syndrome cases with 12 DNA variants in the TRPM4 channel., submitted, 2012.
12. A.L. Gonzales, Z.I. Garcia, G.C. Amberg, S. Earley, Pharmacological inhibition of TRPM4 hyperpolarizes vascular smooth muscle, *Am.J Physiol Cell Physiol*, 299 2010 C1195-C1202.
13. J.M. Simard, K.T. Kahle, V. Gerzanich, Molecular mechanisms of microvascular failure in central nervous system injury--synergistic roles of NKCC1 and SUR1/TRPM4, *J Neurosurg.*, 113 2010 622-629.
14. I. Mathar, M. Kecskes, G. Van der Mieren, G. Jacobs, J.E. Camacho Londono, S. Uhl, V. Flockerzi, T. Voets, M. Freichel, B. Nilius, P. Herijgers, R. Vennekens, Increased beta-Adrenergic Inotropy in Ventricular Myocardium From *Trpm4*^{-/-} Mice, *Circ Res*, 114 2014 283-294.
15. G. Duthoit, V. Fressart, F. Hidden-Lucet, F. Simon, D. Kattygnarath, P. Charron, C. Himbert, P. Aouate, P. Guicheney, Y. Lecarpentier, R. Frank, J.L. Hebert, Brugada ECG pattern: a physiopathological prospective study based on clinical, electrophysiological, angiographic, and genetic findings, *Frontiers in physiology*, 3 2012 474.
16. H. Abriel, N. Syam, V. Sottas, M.Y. Amarouch, J.S. Rougier, TRPM4 channels in the cardiovascular system: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Biochemical pharmacology*, 84 2012 873-881.
17. A.E. Baruteau, S. Fouchard, A. Behaghel, P. Mabo, E. Villain, J.B. Thambo, F. Marcon, V. Gournay, F. Rouault, A. Chantepie, S. Guillaumont, F. Godart, C. Bonnet, A. Fraisse, J.M. Schleich, J.R. Lusson, Y. Dulac, C. Leclercq, J.C. Daubert, J.J. Schott, H. Le Marec, V. Probst, Characteristics and long-term outcome of non-immune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicentre study, *Eur Heart J*, 33 2012 622-629.
18. H. Bazett, An analysis of the time-relations of electrocardiograms., *Heart*, 7 1920 353-370.
19. N. Syam, J.S. Rougier, H. Abriel, Glycosylation of TRPM4 and TRPM5 channels: molecular determinants and functional aspects, *Front Cell Neurosci*, 8 2014 52.

20. M.Y. Amarouch, N. Syam, H. Abriel, Biochemical, single-channel, whole-cell patch clamp, and pharmacological analyses of endogenous TRPM4 channels in HEK293 cells, *Neurosci Lett*, 541 2013 105-110.
21. A. Flotho, A. Werner, The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex: a multisubunit E3 ligase at the intersection of sumoylation and the RanGTPase cycle, *Nucleus*, 3 2012 429-432.
22. R. Mahajan, L. Gerace, F. Melchior, Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association, *J Cell Biol*, 140 1998 259-270.
23. R. Guinamard, A. Chatelier, M. Demion, D. Potreau, S. Patri, M. Rahmati, P. Bois, Functional characterization of a Ca(2+)-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes, *J Physiol*, 558 2004 75-83.
24. M. Demion, P. Bois, P. Launay, R. Guinamard, TRPM4, a Ca²⁺-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells, *Cardiovasc.Res*, 73 2007 531-538.
25. J.F. Spear, E.N. Moore, Supernormal excitability and conduction in the His-Purkinje system of the dog, *Circ Res*, 35 1974 782-792.
26. A.N. Damato, A.L. Wit, S.H. Lau, Observations on the mechanism of one type of so-called supernormal A-V conduction, *Am Heart J*, 82 1971 725-730.
27. W.J. Welch, Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding, *Seminars in cell & developmental biology*, 15 2004 31-38.
28. M.D. Amaral, Targeting CFTR: how to treat cystic fibrosis by CFTR-repairing therapies, *Current drug targets*, 12 2011 683-693.
29. S. Naik, N. Zhang, P. Gao, M.T. Fisher, On the design of broad based screening assays to identify potential pharmacological chaperones of protein misfolding diseases, *Curr Top Med Chem*, 12 2012 2504-2522.

Table 1. Clinical and electrocardiographic characterizations of congenital and childhood AVB patients.

| | Total | Without <i>TRPM4</i> variants | With <i>TRPM4</i> variants |
|--|------------|-------------------------------|----------------------------|
| General characterizations | | | |
| Number of child | 91 | 77 | 14 |
| Average age of diagnosis (month) | 43.9±48.0 | 45.0±48.9 | 37.3±44.3 |
| Median age of diagnosis (month) | 24 | 24 | 12 |
| Congenital AVB (%) | 16.5 | 13.0 | 35.7 |
| Childhood AVB (%) | 83.5 | 87.0 | 64.3 |
| ECG characterizations | | | |
| Complete AVB (%) | 73.6 | 67.8 | 78.6 |
| Intraventricular conduction disorder (%) | 15.4 | 11.7 | 35.7 |
| Heart beat (bpm) | 56.0±16.4 | 56.0±16.0 | 54.0±19.5 |
| QRS duration (ms) | 80.0±28.8 | 79.0±28.5 | 88.0±31.1 |
| QT interval corrected (ms) | 433.1±67.1 | 427.0±45.3 | 469.0±143.7 |
| Pacemaker implant | | | |
| Pacemaker implant (%) | 80.2 | 77.9 | 92.8 |
| Average age of implant (month) | 69.2±61.6 | 72.6±62.0 | 53.9±59.6 |
| Median age of implant (month) | 54 | 54 | 24 |
| Median time between diagnosis and implantation (month) | 9.5 | 12.0 | 0.0 |

Table 2. Patient data with *TRPM4* variants.

| N° | ID | Patient | | TRPM4 variants | | | Mutant allele frequency | Variant frequency in control population | Variant frequency in exome variant server | Variant frequency in 1000 Genomes | Other variants | | | |
|----|-------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------|----------|-------------------------|---|---|-----------------------------------|----------------|------------|--------|---------|
| | | Age and rhythm at diagnosis | Complete AVB | Age and rhythm at implantation | Complete AVB | Exon | | | | | Nucleotide | Amino acid | Europe | NIKE2.5 |
| 1 | 29558 | 10.5 years | Complete AVB | 13 years | Complete AVB | 05 | c.593A>G | p.Asp198Gly | 0.000 (0) | 0.0000 | absent | No | No | No |
| 2 | 24399 | 6 month | AVB1 AVB2 type 1 | 9 years | Complete AVB | 06 | c.755G>A | p.Arg252His | 0.008 (8) | 0.0000 | 0.0063 | No | No | No |
| 3 | 29463 | 5 years | Complete AVB | 11 years | Complete AVB | 11 13 | c.1294G>A c.1744G>A | p.Ala432Thr p.Gly582Ser | 0.000 (0) 0.000 (0) | 0.0013 | 0.0010 | Yes (1) | No | No |
| 4 | 29562 | 7 years | 1 st degree AVB | No pacemaker | - | 11 13 | c.1294G>A c.1744G>A | p.Ala432Thr p.Gly582Ser | 0.000 (0) 0.000 (0) | 0.0013 | 0.0010 | No | No | Yes (2) |
| 5 | 29434 | 6 years | Complete AVB | 9 years | Complete AVB | 11 | c.1458_149 3del36 | p.Lys487_Leu 498del | 0.007 (4) | 0.0000 | 0.0098 | No | No | No |
| 6 | 31737 | 4 month | Complete AVB | 5 month | Complete AVB | 15 | c.2030C>T | p.Thr677Ile | 0.000 (0) | 0.0000 | absent | No | No | No |
| 7 | 31755 | In utero 33 WG | Complete AVB | 3 days | Complete AVB | 16 | c.2209G>A | p.Gly737Arg | 0.001 (1) | 0.0040 | 0.0017 | No | No | No |
| 8 | 29445 | In utero 36 WG | Complete AVB | 1 day | Complete AVB | 17 | c.2531G>A | p.Gly844Asp | 0.002 (4) | 0.0013 | 0.0016 | No | No | No |
| 9 | 31668 | At birth | Complete AVB | 3 days | Complete AVB | 17 | c.2531G>A | p.Gly844Asp | 0.002 (4) | 0.0013 | 0.0016 | No | No | No |
| 10 | 31697 | 8.5 years | Complete AVB | 8.5 years | Complete AVB | 17 | c.2531G>A | p.Gly844Asp | 0.002 (4) | 0.0013 | 0.0016 | No | No | No |
| 11 | 29523 | At birth | Complete AVB | 2 days | Complete AVB | 17 | c.2531G>A | p.Gly844Asp | 0.002 (4) | 0.0013 | 0.0016 | No | No | No |
| 12 | 31704 | In utero 38 WG | Complete AVB | 1 day | Complete AVB | 17 | c.2531G>A | p.Gly844Asp | 0.002 (4) | 0.0013 | 0.0016 | No | No | No |
| 13 | 29665 | 18 month | AVB1 AVB 2/1 | 2 years | Complete AVB | 18 | c.2761G>A | p.Val921Ile | 0.000 (0) | 0.0000 | 0.0000 | No | No | No |
| 14 | 31653 | 5 years | Complete AVB | 5.5 years | Complete AVB | 24 | c.3611C>T | p.Pro1204Leu | 0.005 (6) | 0.0013 | 0.0033 | No | No | No |

(1) c.355G>T, p.A119S

(2) c.5415_5418del1415 p.Thr1806SerfsX27

WG: week of gestation; AVB: atrio-ventricular block.

Figures and Figure Legends

Figure 1. Families with AVB. (A) Pedigrees of families with members harboring *TRPM4* variants. (B) Illustration of the *TRPM4* channel showing the location of the five congenital atrio-ventricular block variants described in this study. The box represents the occurrence of two variants in the same proband.

Figure 2. Human, mouse, and rat *TRPM4* sequence alignments and localization of variants described in this study.

Figure 3. Electrocardiogram of patients harboring *TRPM4* variants. (A) Electrocardiogram of a 14 year old girl showing severe bradycardia due to complete atrio-ventricular block, with narrow QRS complexes (heart rate = 37 beats/min, QRS complex = 69 ms). (B) Electrocardiogram in a 45 year old man showing atrio-ventricular block type 1 (PR interval = 240 ms) associated with an incomplete left bundle branch block (RS pattern in right precordial leads, RS pattern in left precordial leads, QRS complex = 110 ms, QRS axis = -15°). (C) Electrocardiogram in a 7 year old girl showing atrio-ventricular block type 1 (PR interval = 280 ms) associated with incomplete right bundle branch block (RSR' pattern in right precordial leads, QRS complex = 94 ms, QRS axis = 135°). (D) Electrocardiogram in a 47 year old man showing atrio-ventricular block type 1 (PR interval = 220 ms), associated with incomplete left bundle branch block (RS pattern in right precordial leads, RS pattern in left precordial leads, QRS complex = 100 ms, QRS axis = -35°). (E) Electrocardiogram in a 7 year old girl showing bradycardia due to complete atrio-ventricular

block with narrow QRS complex (heart rate 40 beats/min, QRS complex = 80 ms). (F) Holter electrocardiogram in a 6 month old boy showing severe bradycardia due to complete atrio-ventricular block with narrow QRS complexes (heart rate = 55 beats/min, QRS complex = 65 ms). (G) Holter electrocardiogram in a 2 year old boy showing severe bradycardia due to 2/1 atrio-ventricular block with narrow QRS complexes (heart rate = 40 beats/min, QRS = 80 ms).

Figure 4. Expression of TRPM4 WT and AVB variants. (A) Western blots showing the expression of TRPM4 at the total (left panel) and surface levels (right panel) with black and white arrowheads representing fully glycosylated and core-glycosylated forms of TRPM4, respectively. (B) Quantification of the Western blots is shown as relative intensity of protein bands for both fully- and core-glycosylated forms of TRPM4 in each fraction. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$.

Figure 5. Quantification of mRNA expression in HEK293 cells transiently transfected with TRPM4 variants using RT PCR.

Figure 6. Whole cell patch clamp recording of WT and TRPM4 variants. (A) Time course recording of TRPM4 current. (B) Individual current traces of each WT and TRPM4 variants recorded as transient and plateau phases. (C) Quantification of current density of WT and AVB variants for both phases. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$.

Figure 7. Role of SUMOylation. Immunoprecipitation with anti-RanGAP1 and anti-HA. (A) Western blots on the upper panel showing immunoprecipitation of RanGAP1 and TRPM4, (B)

while the lower panels showing their SUMOylation status. All samples were run on the same gel and blotted multiple times on the same membrane with different antibodies. The lanes were rearranged for clarity purposes. (C) Normalized current density of WT TRPM4 co-expressed with either Ubc9 or the catalytically inactive mutant Ubc9*. *P<0.05, **P<0.01.

Figure 8. Rescue experiments of WT and TRPM4 variants. (A) Western blot and quantification showing expression of WT and TRPM4 variants at the total and surface levels at 37°C and 28°C. (B) Current density of WT and A432T at 37°C and 28°C recorded as transient and plateau phases. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005.

Figure 9. Ubiquitylation of TRPM4. (A) GST pull down experiment using GST tagged S5a (S), a subunit proteasome which recognizes ubiquitylated proteins, and GST alone (G) to pull down TRPM4 from HEK293 cells transiently transfected with WT TRPM4, A432T and A432T/G582S individually. The input fraction is shown on the left and the pull down fraction is on the right. (B) Quantification of each fraction and comparison of WT to variant ratios between fractions. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005.

SUPPLEMENTARY DATA to

TRPM4 variants in childhood atrio-ventricular block

Syam and Chatel. TRPM4 variants in childhood atrio-ventricular block

Ninda Syam MSc^{1*}, Stéphanie Chatel PhD^{2*}, Valentin Sottas MSc¹, Jean-Sébastien Rougier PhD¹, Alban Baruteau MD^{2,3}, Estelle Baron², Mohamed-Yassine Amarouch PhD¹, Xavier Daumy MSc², Vincent Probst MD, PhD², Jean-Jacques Schott PhD²
and Hugues Abriel MD, PhD¹

¹ Department of Clinical Research, and Swiss National Centre of Competence in Research (NCCR) TransCure, University of Bern, Switzerland

² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche (UMR) 1087, l'Institut du thorax, Nantes, France.

- Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 6291, Nantes, France.

- Université de Nantes, Nantes, France.

- Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Nantes.

³ Marie Lannelongue Hospital, Department of Pediatric Cardiac Surgery – Paris Sud University, Paris, France.

*These authors contributed equally to this study

Journal Subject Codes: [132] Arrhythmias-basic studies

Correspondance to:

Dr. Jean-Jacques Schott, PhD
Institut du thorax Inserm UMR 1087/CNRS
UMR 6291
IRS-UN
Quai Moncousu, 8, 44007 Nantes France
Phone 33-2-28-08-01-51
Fax 33-2-28-08-01-30
Email: jjschott@univ-nantes.fr

or to:

Dr. Hugues Abriel, MD PhD
University of Bern, Department of Clinical
Research
Murtenstrasse, 35, 3010 Bern, Switzerland
Phone 41-3-16-32-09-28
Fax 41-3-16-32-09-46
Email: Hugues.Abriel@dkf.unibe.ch

Supplementary material and methods

Samples

A total of 91 unrelated patients and their parents were collected from a multicenter retrospective study from 1980 to 2009 carried out in 13 French tertiary hospitals [1]. Patients were included in the study if they had AV conduction disturbance, with negative maternal anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies and without associated structural cardiac malformation. Patients born before 1980 were excluded due to the major progress in prenatal diagnosis and neonatal management of AVB, as well as in pacing technologies. Both incomplete and complete AVB were considered. Patients with traumatic or post-operative heart block were excluded, as well as those with myocarditis, neuromuscular disorders, metabolic diseases, congenital structural heart disease likely to account for AVB and long QT syndrome. Mothers of included patients were all screened for maternal antibodies to soluble nuclear antigens 48-KDa SSB/La, 52-KDa SSA/Ro and 60-KDa SSA/Ro using quantitative radio ligand assays. In case of missing data or negative maternal antibodies diagnosed with a less sensitive technique, parents were contacted and re-screened with radio ligand assays. Written informed consent was obtained from all participants or their guardians. For each patient, standard 12-lead electrocardiogram (ECG) were collected at time of diagnosis and at time of pacemaker implantation or at last follow-up if not implanted. ECGs were analyzed by two blinded medical investigators and intervals durations were measured using dedicated software DatInf® Measure. The earliest documentation of a conduction abnormality of a patient was used as the time of diagnosis of atrio-ventricular block. Type of block, heart rate, PR intervals, QRS complexes and QT intervals durations were determined. QT interval measurement was adjusted to the heart rate using the Bazett formula [2].

Among these 91 children, 15 showed congenital AVB (6 were diagnosed *in utero*) and 76 had childhood AVB. The median age at diagnosis is 24 months. Different types of conduction block were diagnosed: (a) 3 cases of AVB type 1, (b) 21 cases of AVB type 2 (23%) (8 Mobitz type 1 and 13 Mobitz type 2), and (c) 67 cases of complete AVB (73.6%). The majority (84.6%) of QRS complex durations were not increased, while intra-ventricular conduction abnormalities were observed in 14 children (15.4%) distributed in 7 blocks of right bundle branch (RBB) (3 complete and 4 incomplete), 5 left bundle branch block (LBBB) (3 complete and 2 left anterior hemiblock), 1 alternation between RBB and LBBB and 1 case of undetermined complete block. Implantation of a pacemaker was required in 73 children (80.2%) during a median follow up of 9.5 months.

Mutation screening

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by using NucleoSpin® Blood XL kit (Macherey-Nagel, Germany) as described by the manufacturer. *NKX2.5*, *SCN5A*, *SCN1B* and ten coding exons of *TRPM4* (ENSG00000130529, ENST00000252826) were screened by direct DNA sequencing and 15 coding exons of *TRPM4* were screened by high-resolution melting (HRM) curve analysis in all patients. The primers were designed to flank the coding regions. PCR and HRM were performed in a single run on a Light Cycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Switzerland). The HRM analysis was performed using Gene Scanning Software Version 1.5.0 (Roche Instrument Centre, Switzerland), which allows clustering the samples into groups on the basis of difference plot obtained by analyzing the differences in melting curve shapes. All the samples studied were clustered at the default sensitivity setting (0.5). Samples with an aberrant melting profile were assigned for validation sequencing to identify or exclude

sequence variants. Forward and reverse sequence reactions were performed with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, California, USA) using the same primers. The sequence products were analyzed on a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™, California, USA).

Molecular cloning

TRPM4 variants selected for molecular cloning were: p.D198G, p.A432T, p.G582S, p.T677I, and p.V921I. Constructions are called respectively: D198G, A432T, G582S, T677I, V921I and double variant (p.A432T/p.G582S) is called A432T/G582S. The cDNA of *TRPM4* was obtained in 2 overlapping fragments from human kidney RNA (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) by reverse transcription with Mu-MLV Reverse transcriptase (Eurogentec France SASU, Angers, France). The complete *TRPM4* cDNA was cloned in pcDNA4/TO vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). It was provided by A. Guse, (University Hospital Hamburg-Eppendorf) and P. Bouvagnet, Laboratoire Cardiogenetique, Hospices Civils de Lyon, Groupe Hospitalier Est, Bron, France. *TRPM4* p.E7K mutant (called *TRPM4* E7K) was provided by P. Bouvagnet. Primers for reverse transcription and PCR are available upon request. Mutant *TRPM4*-cDNAs were obtained by in vitro mutagenesis using the QuickChange XLII site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Mutagenesis primer sequences are available upon request. Mutant cDNA clones were systematically sequenced before used in further experiments.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney (HEK293) cells were cultured with DMEM medium supplemented with 4 mM Glutamine, 10% FBS and 20 ug/ml gentamycin. They were transiently transfected

with 240 ng of either HA-TRPM4 WT, variants (D198G, A432T, G582S, A432T/G582S, T677I and V921I) or empty vector (pcDNA4TO) in a P100 dish (BD Falcon, Durham, North Carolina, USA) mixed with 30 μ l of JetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, France) and 250 μ l of 150 mM NaCl. The cells were incubated for 48 hours at 37°C with 5% CO₂. The amount of cDNA used here is proportionately increased to the one used for electrophysiological studies. For electrophysiological studies, T25 cm² flasks of HEK293 cells were transiently co-transfected using X-tremeGENE 9 DNA transfection mix reagent (Roche Diagnostics, IN, USA) with 80 ng of WT or variant TRPM4 channels. All transfections included 200 ng of cDNA encoding CD8 antigen as a reporter gene. Anti-CD8 beads (Dyna[®], Oslo, Norway) were used to identify transfected cells, and only CD8-displaying cells were analyzed. Cells were used 48 hours after transfection.

Real time quantitative PCR

RNA isolation was performed with Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany) as described by the manufacturer. Using cDNAs of transfected HEK293 cells we performed quantitative expression analysis with 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems[™], California, USA). The PCR amplification was performed with TaqMan[®] gene expression assay Hs01026070_m1 for human TRPM4. For control, we studied expression of co-transfected human CD8 gene with TaqMan[®] gene expression assay Hs00233520_m1. For each sample, triplicate determinations were performed in a 96 wells optical plate using 80 ng cDNA, 1 μ l of 20X TaqMan[®] Gene Expression Assay, 10 μ l of 2X TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix no AmpErase[®] UNG, and 5 μ l of water in each 20 μ l reaction Plates were heated for 20 s at 95°C, and then 40 cycles of 1 s at 95°C and 20 s at 60°C were applied. Relative TRPM4

expression (Δ CT) was calculated by subtracting the signal threshold cycle (CT) of the control (CD8) from the CT value of TRPM4. Subsequently, $\Delta\Delta$ CT values were obtained for each mutant by subtracting the Δ CT of the TRPM4 WT from the Δ CT of each mutant. Results were then linearized by calculating $2^{-\text{exp}\Delta\Delta\text{CT}}$.

Cell surface biotinylation assay

Following 48 hours of incubation, transiently transfected HEK293 cells were treated with EZ-linkTM Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) 0.5 mg/ml in cold 1X PBS for 15 minutes at 4°C. Subsequently, the cells were washed twice with 200 mM glycine in cold 1X PBS and twice with cold 1X PBS to inactivate and remove the excess biotin, respectively. The cells were then lysed with 1X lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4; 150 mM NaCl; 1.5 mM MgCl₂; 1 mM EGTA pH 8.0; 10% Glycerol; 1% Triton X-100; 1X Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany)) for 1 hour at 4°C. Cell lysates were centrifuged at 16,000 g; 4°C for 15 minutes. Two milligram of the supernatant was incubated with 50 μ l Streptavidin Sepharose High Performance beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for 2 hours at 4°C, and the remaining supernatant was kept as the input. The beads were subsequently washed five times with 1X lysis buffer before elution with 50 μ l of 2X NuPAGE sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) plus 100 mM DTT at 37°C for 30 minutes. These biotinylated fractions were analyzed as TRPM4 expressed at the cell surface. The input fractions, analyzed as total expression of TRPM4, were resuspended with 4X NuPAGE Sample Buffer plus 100 mM DTT to give a concentration of 1 mg/ml and incubated at 37°C for 30 minutes.

Immunoprecipitation

Transiently transfected HEK293 cells in P100 plates were harvested after 48 hours incubation and lysed with 1X cold Ubi lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA pH 8.0, 10% Glycerol, 1X EDTA-free Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany), 2 mM N-Ethylmaleimide/NEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 10 mM iodoacetamide/IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)) containing 1% Triton X-100 for 1 hour at 4°C. Cell lysates were then centrifuged at 16,000 g; 4°C for 15 minutes. Two milligrams of the supernatant (lysate) was incubated at 4°C for 24 hours with 10 µg of anti-RanGAP1 A302-027A (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) or 20 µg of anti-HA MMS-101R (Covance, Princeton, New Jersey, USA) to immunoprecipitate RanGAP1 and HA-tagged TRPM4, respectively. One volume of 1X cold Ubi lysis buffer without Triton X-100 (to obtain a final concentration of 0.5% Triton X-100) was also added in the mix. On the next day, the lysate-antibody mix was transferred to a microcentrifuge tube containing 50 µg (1:1 beads to lysis buffer ratio) of Protein G Sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) which were previously washed three times with 1X cold Ubi lysis buffer containing 0.5% Triton X-100. After adding fresh 1X EDTA-free Complete Protease Inhibitor Cocktail, the mix was incubated overnight at 4°C. The beads were subsequently washed five times (4°C; 3000 rpm) with 1X cold Ubi buffer containing 0.3% Triton X-100 before elution with 50 µl of 2X NuPAGE sample buffer plus 100 mM DTT at 37°C for 30 minutes. These samples are designated as immunoprecipitation (IP) fractions. The input fractions were resuspended with 4X NuPAGE Sample Buffer plus 100 mM DTT to give a concentration of 1 mg/ml and incubated at 37°C for

30 minutes. All lysis and incubation steps, except elution in sample buffer, were performed in absence of light.

Low temperature rescue experiments

HEK293 cells were transiently transfected individually TRPM4 WT or TRPM4 variants (A432T, A432TG582S). After the first 24 hours incubation at 37°C (95% O₂ and 5%CO₂) one set of transfected HEK293 cells was kept in the same incubator, while another set was shifted to a 28°C incubator supplied with 95% O₂ and 5% CO₂ for 24 hours. The following day, cell surface biotinylation assay (as described above) was performed on the two sets of HEK293 cells.

Generation of GST and GST-S5A and pull-down experiments

Glycerol stocks of *E. coli* DH5 α transformed with pGEX-4T3 (GST alone) and pGEX-S5A were added to 1 liter LB medium containing ampicillin (0.1 μ g/ μ l) and grown to an OD₆₀₀ of 0.600. The bacterial cultures were then induced with 1mM IPTG for 2.5 hours at 29°C. Cells were harvested by centrifugation (4600 rpm, 4°C, 15 min in Sorvall Legend RT+ benchtop centrifuge), resuspended in 25 ml 1X bacterial lysis buffer (0.5 M Tris pH 7.5, 2.5M NaCl, 10% Igepal, and 1X Complete Protease Inhibitor Cocktail), added with 0.2 mg/ml lysozyme and then mixed by gently inverting the tube several times until it appeared viscous. The mix was then neutralized by adding 10 mM MgSO₄ and sonicated 3 times for 10 seconds each at 100% power (with 10 seconds break in between) to disrupt DNA. To obtain protein lysate, the mix was transferred to Sorvall tube and centrifuged in ss-43 rotor for 10 min at 15,000 rpm at 4°C. Protein lysate was then transferred to a falcon tube and combined with 3 ml of GSH-sepharose beads (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) previously washed with distilled water and

1X bacterial lysis buffer and rotated on a wheel at 4°C for 2 hours to facilitate binding. The mix was then washed 5 times with 15 ml 1X bacterial lysis buffer (4°C 10 min at 1000 rpm in Sorvall Legend RT+ benchtop centrifuge). After the concentration of GST fusion protein/GSH-sepharose complex was determined, it was stored in glycerol buffer at -80°C. Transiently transfected HEK293 cells in P100 plates were harvested after 48 hours incubation and lysed with 1X cold Ubi lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA pH 8.0, 10% Glycerol, 1X EDTA-free Complete Protease Inhibitor Cocktail, 2 mM NEM) containing 1% Triton X-100 for 1 hour at 4°C. Cell lysates were then centrifuged at 16,000; g 4°C for 15 minutes. One milligram of the supernatant (lysate) was incubated with 100 µg of GST or GST-S5A coupled on GSH beads at 4°C for 2 hours. The beads were subsequently washed five times (4°C; 3000 rpm in tabletop centrifuge) with the same 1X cold Ubi buffer described above except containing 0.5% Triton X-100 before elution with 50 µl of 2X NuPAGE sample buffer plus 100 mM DTT at 37°C for 30 minutes. These samples are designated as pull-down fractions. The input fractions were resuspended with 4X NuPAGE Sample Buffer plus 100 mM DTT to give a concentration of 1 mg/ml and incubated at 37°C for 30 minutes.

Western Blot experiments

Protein samples were analyzed on 9% polyacrylamide gels, transferred with the TurboBlot dry blot system (Biorad, Hercules, CA, USA) and detected with anti-TRPM4 (generated by Pineda, Berlin, Germany), anti-RanGAP1 A302-026A (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA), anti-SUMO1 S8070 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), anti-SUMO2/3 ab3742 (Abcam, Cambridge, UK), anti-Na⁺/K⁺ ATPase α 1 ab7671 (Abcam, Cambridge, UK) and anti α -actin A2066 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) antibodies using SNAP i.d. (Millipore,

Billerica, MA, USA). The anti-TRPM4 antibody was generated by Pineda (Berlin, Germany) using the following peptide sequence: NH₂-CRDKRESDSERLKRTSQKV-CONH₂. A fraction of the antisera, which was subsequently used in this study, was then affinity purified.

Cellular Electrophysiology

For patch-clamp experiments in whole-cell configuration, intracellular solution contained (in mM): 100 CsAsp, 20 CsCl, 4 Na₂ATP, 1 MgCl₂, 10 EGTA, and 10 HEPES. The pH was adjusted to 7.20 with CsOH, and the free Ca²⁺ concentration at 100 μM with CaCl₂ using WEBMAXCLITE program (<http://www.stanford.edu/cpatton/downloads.htm>). Na₂ATP has been added to the intracellular solution to be closer as much as possible to physiological cytosolic solution and to provide phosphate residue for phosphorylation processes. Extracellular solution contained (in mM): 156 NaCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 6 CsCl, 10 glucose and 10 HEPES. The pH was adjusted to 7.40 with NaOH. Patch-clamp recordings were carried-out in the whole-cell configuration at room temperature. TRPM4 currents were investigated using a ramp protocol. The holding potential was -60 mV. The 400 ms increasing ramp from -100 to +100 mV ends with a 300 ms step at +100 mV then 300 ms at -100mV. A new ramp was performed every 2 seconds. Current densities were obtained by dividing the peak current recorded at -100 mV by the cell capacitance.

Figures and Legends of the Supplementary Figures

Supplementary figure 1. Human, mouse, and rat TRPM4 sequence alignments and localization of variants described in this study.

Supplementary figure 2. Quantification of mRNA expression in HEK293 cells transiently transfected with TRPM4 variants using RT PCR.

Supplementary references

- [1] A.E. Baruteau, S. Fouchard, A. Behaghel, P. Mabo, E. Villain, J.B. Thambo, F. Marcon, V. Gournay, F. Rouault, A. Chantepie, S. Guillaumont, F. Godart, C. Bonnet, A. Fraisse, J.M. Schleich, J.R. Lussion, Y. Dulac, C. Leclercq, J.C. Daubert, J.J. Schott, H. Le Marec, V. Probst, Characteristics and long-term outcome of non-immune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicentre study, *Eur Heart J*, 33 (2012) 622-629.
- [2] H. Bazett, An analysis of the time-relations of electrocardiograms., *Heart*, 7 (1920) 353-370.

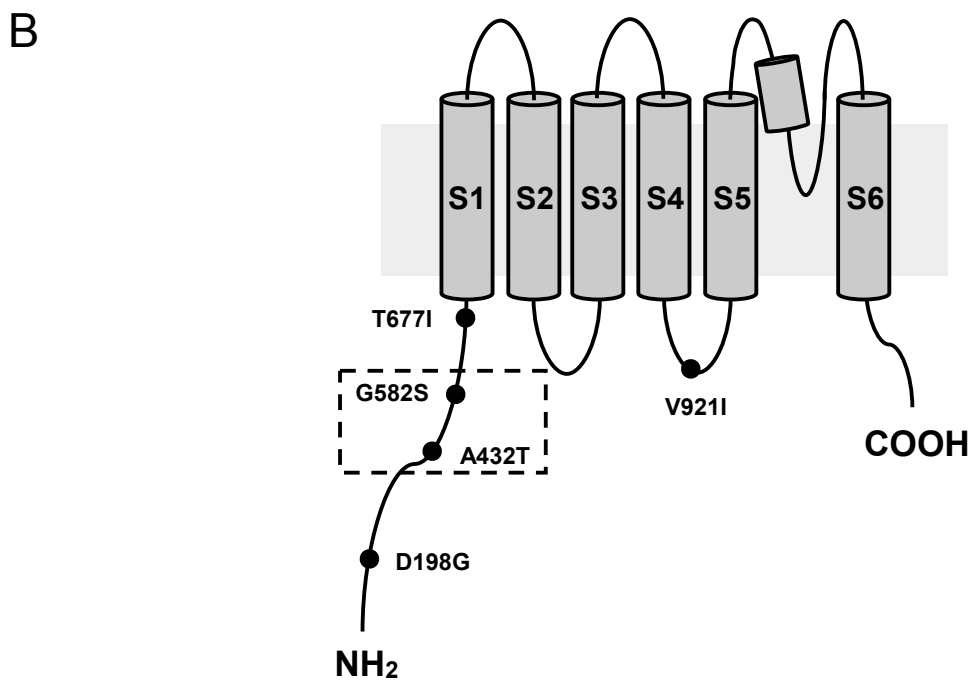
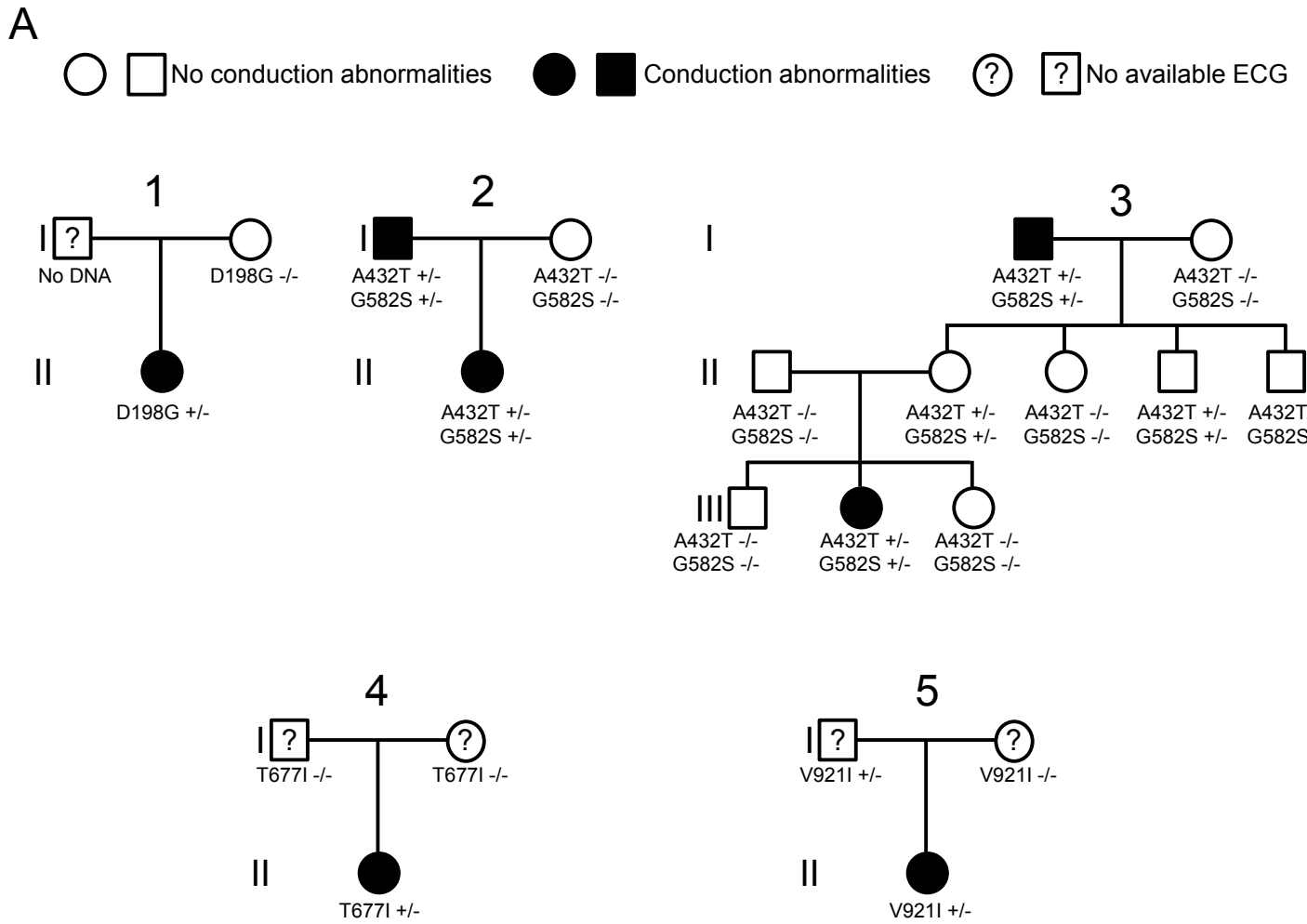


Figure 1, Syam *et al.*

TRPM4 D198G

| | | | |
|-----|--|--------|-------|
| 180 | GTKVVAMGVAPWGVVRNFDMLINPKGSFPARYRWRGDPEDGVQFPLDYNYSAPFLVDDGT | Q8TD43 | HUMAN |
| 181 | SSKVVAMGVAPWGVVRNFDMLINPKGSFPARYRWRGDPEDGVEFPLDYNYSAPFLVDDGT | Q7TN37 | MOUSE |
| 181 | GSKVVAMGVAPWGVVRNFDMLINPKGSFPARYRWRGDPEDGVEFPLDYNYSAPFLVDDGT | Q9ESQ5 | RAT |

TRPM4 A432T

| | | | |
|-----|--|--------|-------|
| 420 | WRSFHLEASLMDALLNDRPEFVRLLI SHGLSLGHFLT PMRLAQLYSAAPSNSLIRNLLDQ | Q8TD43 | HUMAN |
| 421 | WRSFHLEASLMDALLNDRPEFVRLLI SHGLSLGHFLT PVRLAQLYSAVSPNSLIRNLLDQ | Q7TN37 | MOUSE |
| 421 | WRSFHLEASLMDALLNDRPEFVRLLI SHGLSLGHFLT PVRLAQLYSAVSPNSLIRNLLDQ | Q9ESQ5 | RAT |

TRPM4 G582S

| | | | |
|-----|---|--------|-------|
| 540 | LSDKATSPLSLDAGLGQAPWSDLLWALLLNRAQMAMYFWEMGSNAVSSALGACLLLRVM | Q8TD43 | HUMAN |
| 540 | LMDWANKQPSTDASFEQAPWSDLLI WALLLNRAQMAIYFWEKGSNSVASALGACLLLRVM | Q7TN37 | MOUSE |
| 540 | LMDWANMQ--QDASFEQAPWSDLLI WALLLNRAQMAIYFWEKGSNSVASALGACLLLRVM | Q9ESQ5 | RAT |

TRPM4 T677I

| | | | |
|-----|--|--------|-------|
| 660 | QADARAFFAQDGVQSLITDKWWGDMASTTPIWALVLAFFCPPLIYTRLITFRKSEEEPTQ | Q8TD43 | HUMAN |
| 660 | QADARAFFAQDGVQSLITDKWWGEMDSTTPIWALLLAFFCPPLIYTNLIVFRKSEEEPTQ | Q7TN37 | MOUSE |
| 658 | QADARAFFAQDGVQSLITDKWWGEMDSTNPIWALLLTFFCPLIYTNLILFRKSEEEPTQ | Q9ESQ5 | RAT |

TRPM4 V921I

| | | | |
|-----|--|--------|-------|
| 898 | DFMVFTVRLRHIFTVNKQLGPKIVIVSKMMKDVFVFLFVWVWVAYGVATEGLLRPRDS | Q8TD43 | HUMAN |
| 894 | DFMIFTLRLRHIFTVNKQLGPKIVIVSKMMKDVFVFLFVWVWVAYGVATEGILRPQDR | Q7TN37 | MOUSE |
| 892 | DFMIFTLRLRHIFTVNKQLGPKIVIVSKMMKDVFVFLFVWVWVAYGVATEGILRPQDR | Q9ESQ5 | RAT |

Figure 2, Syam *et al.*

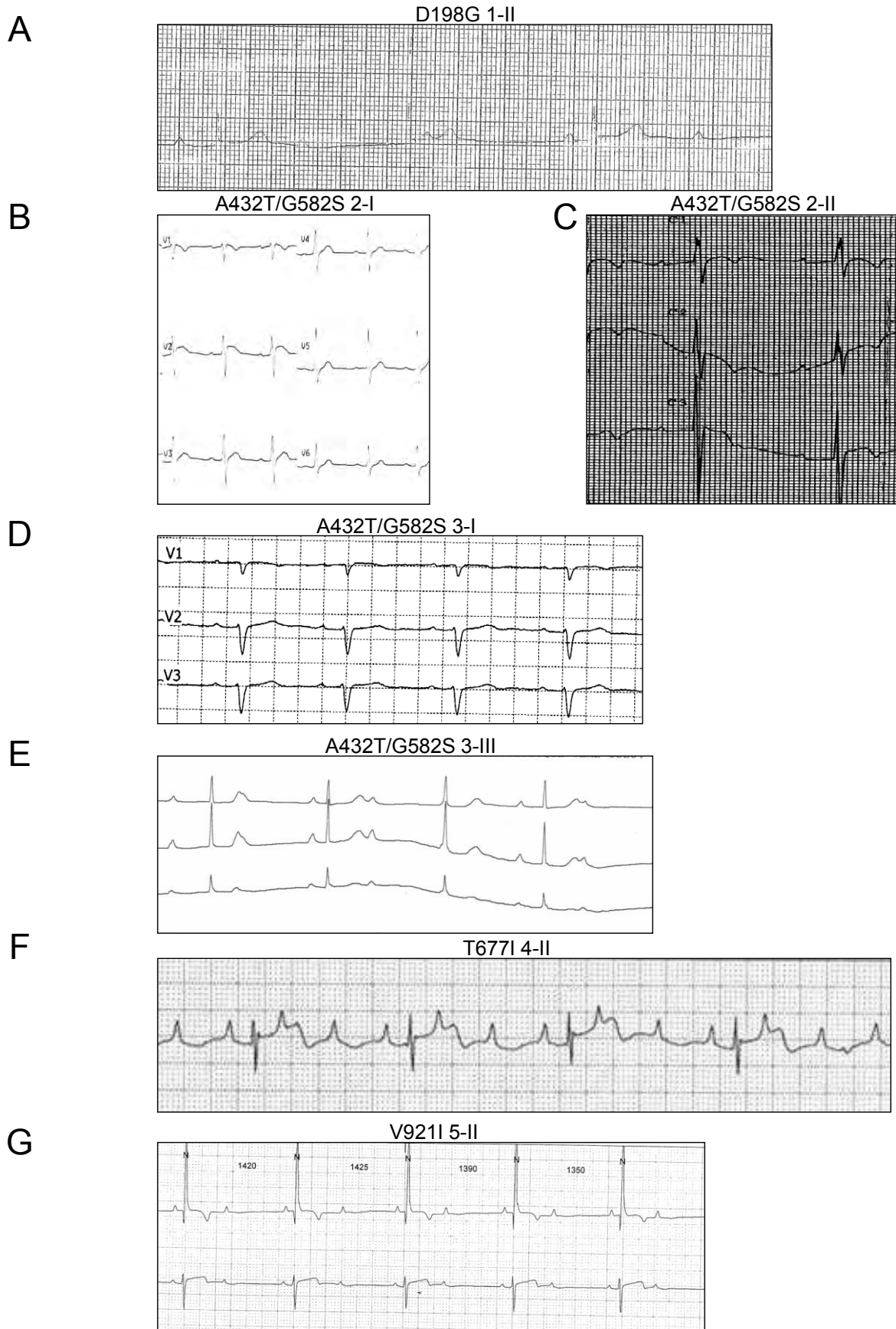


Figure 3, Syam *et al.*

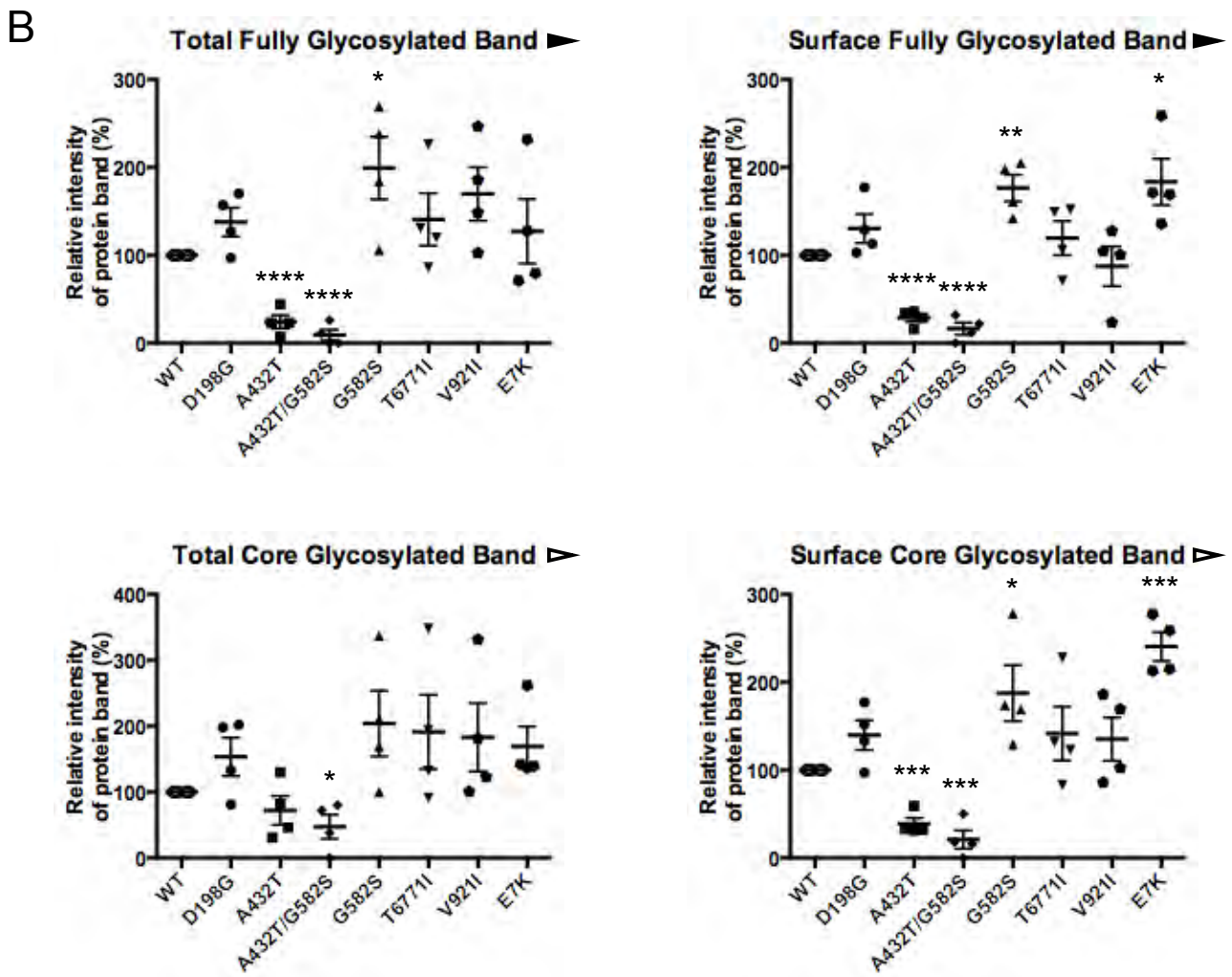
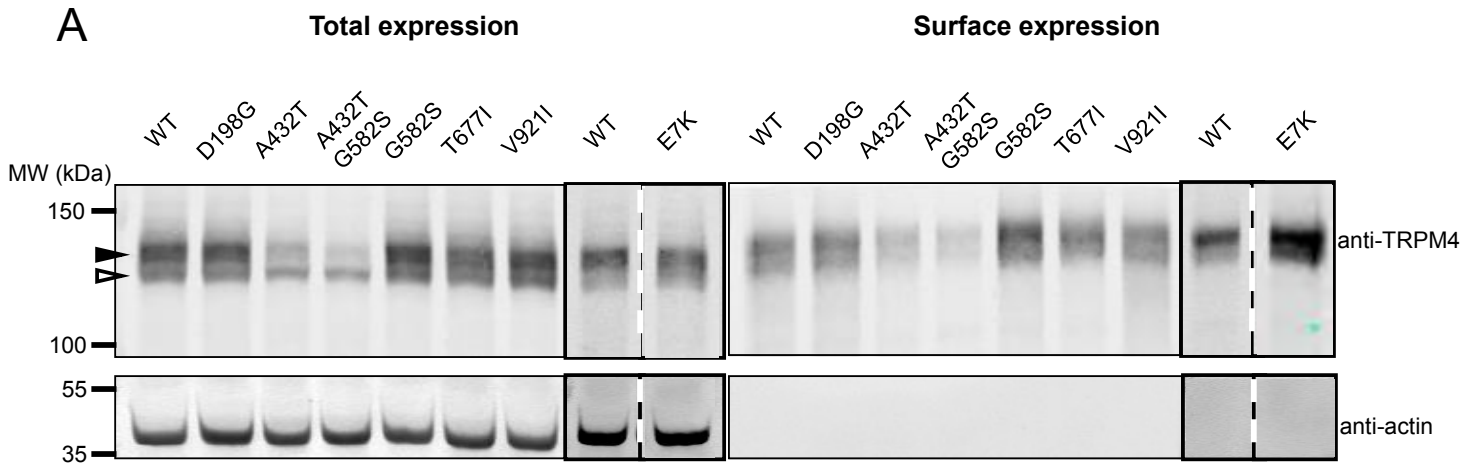


Figure 4, Syam *et al.*

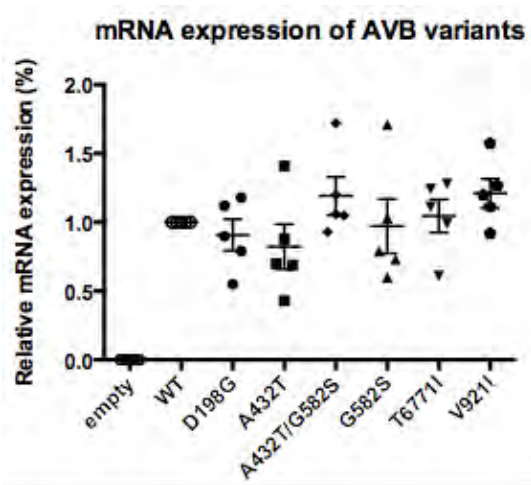


Figure 5, Syam *et al.*

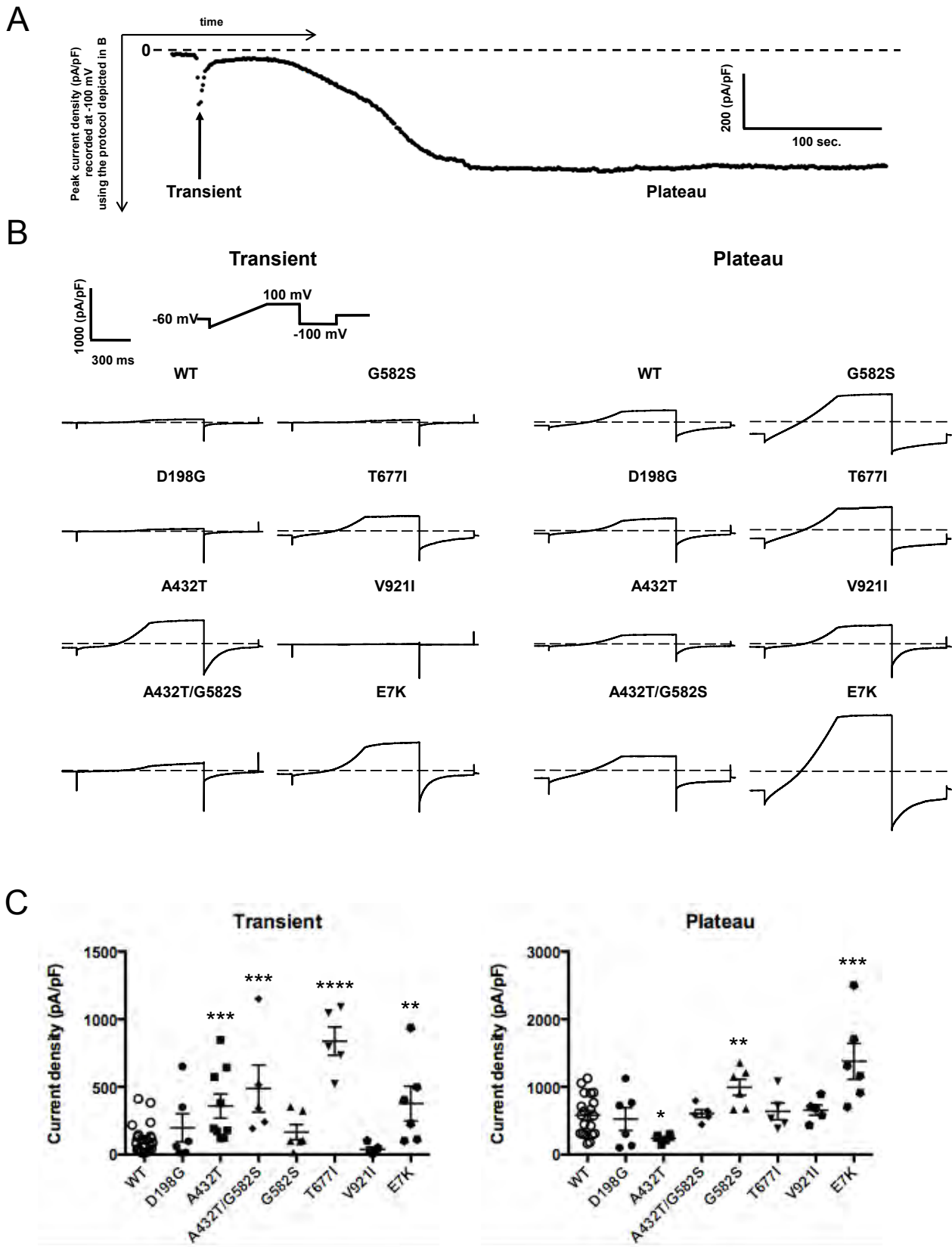


Figure 6, Syam *et al.*

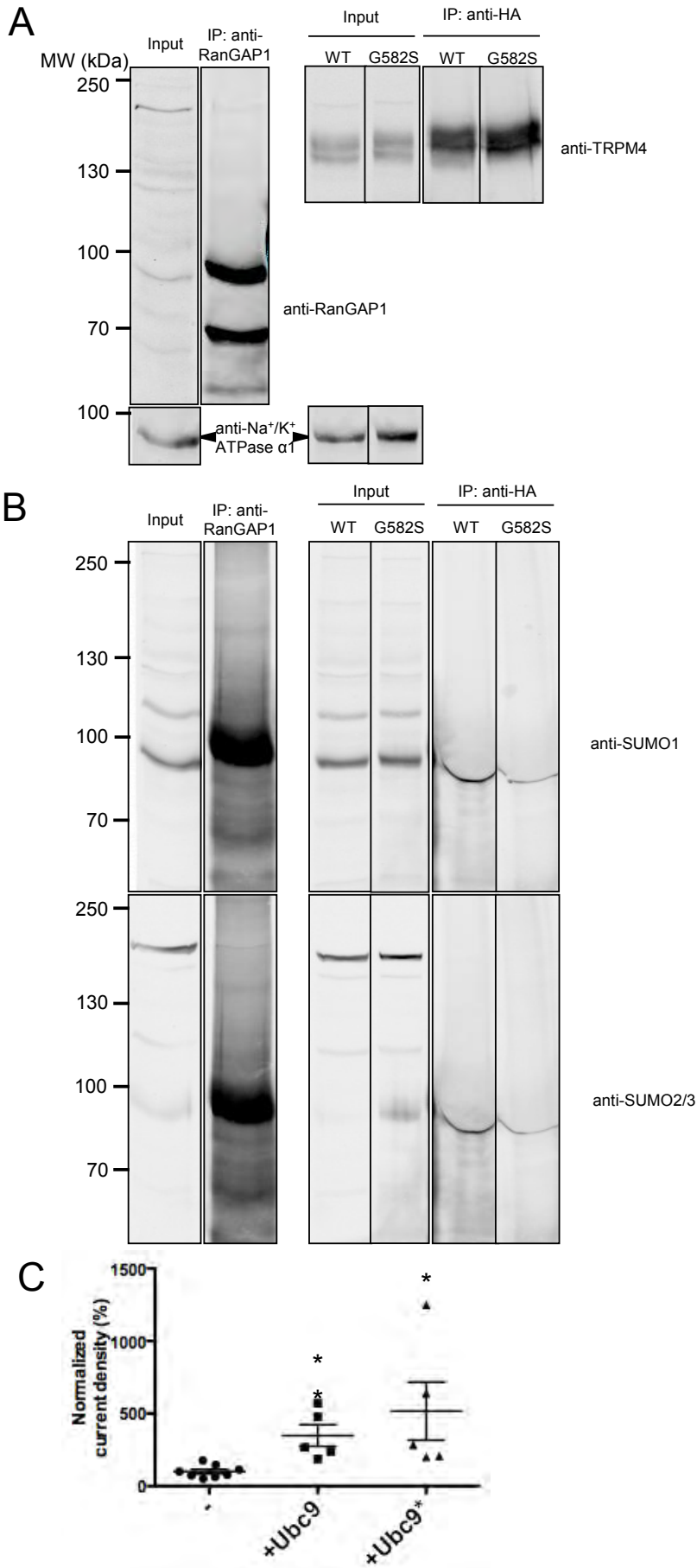


Figure 7, Syam *et al.*

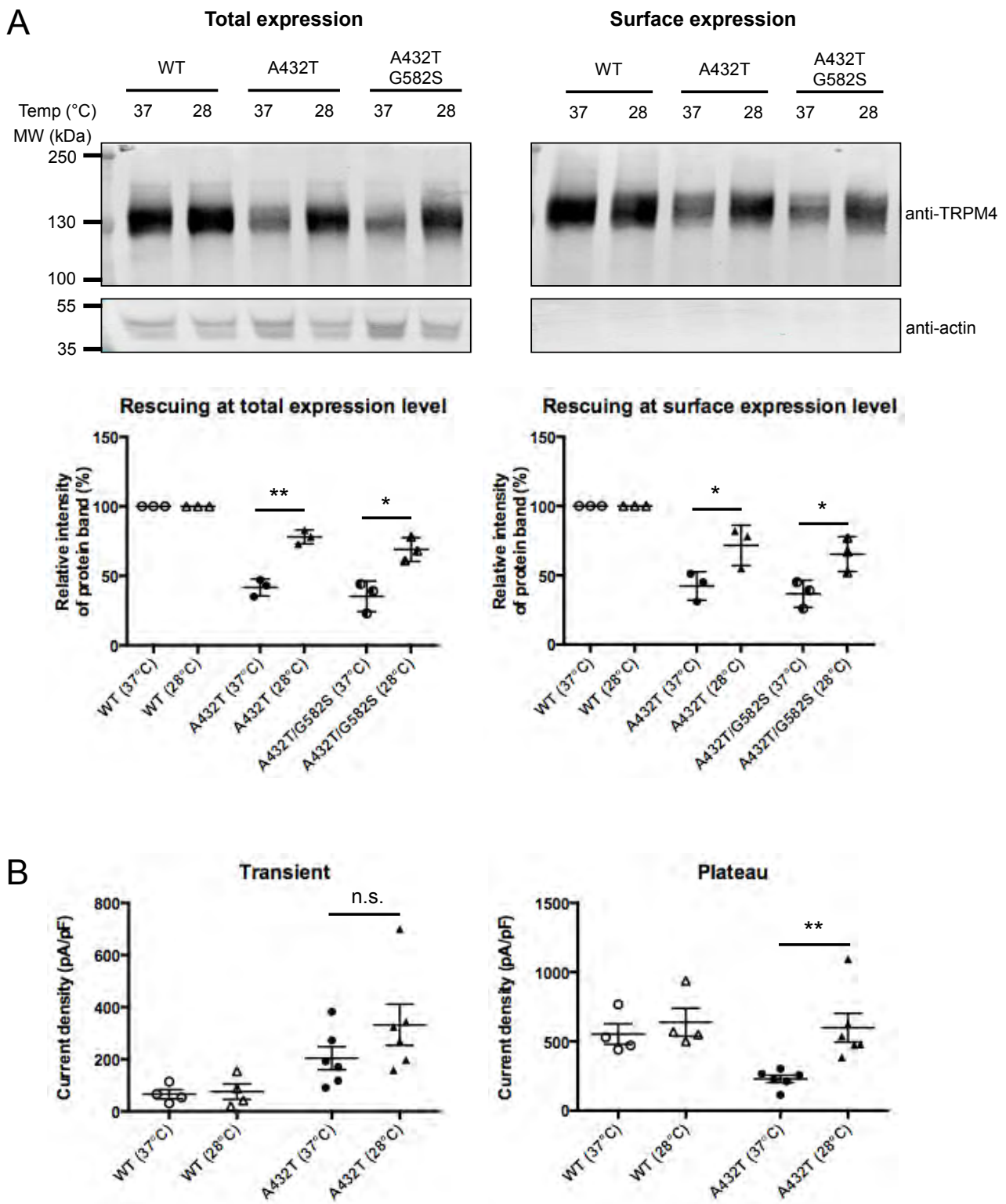


Figure 8, Syam *et al.*

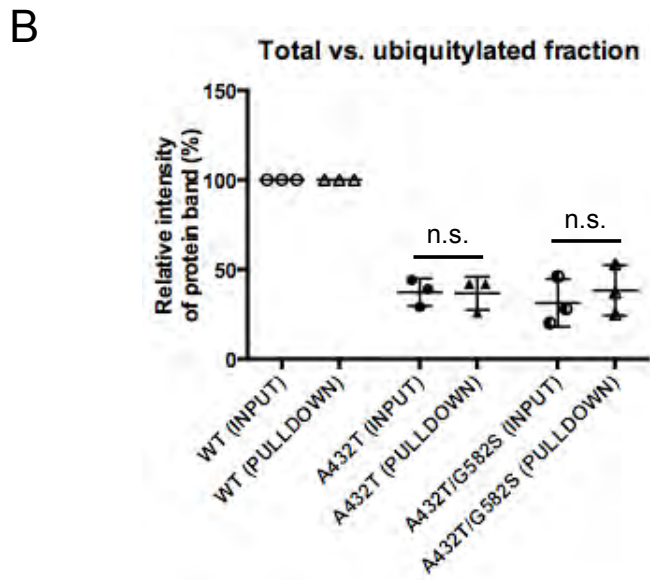
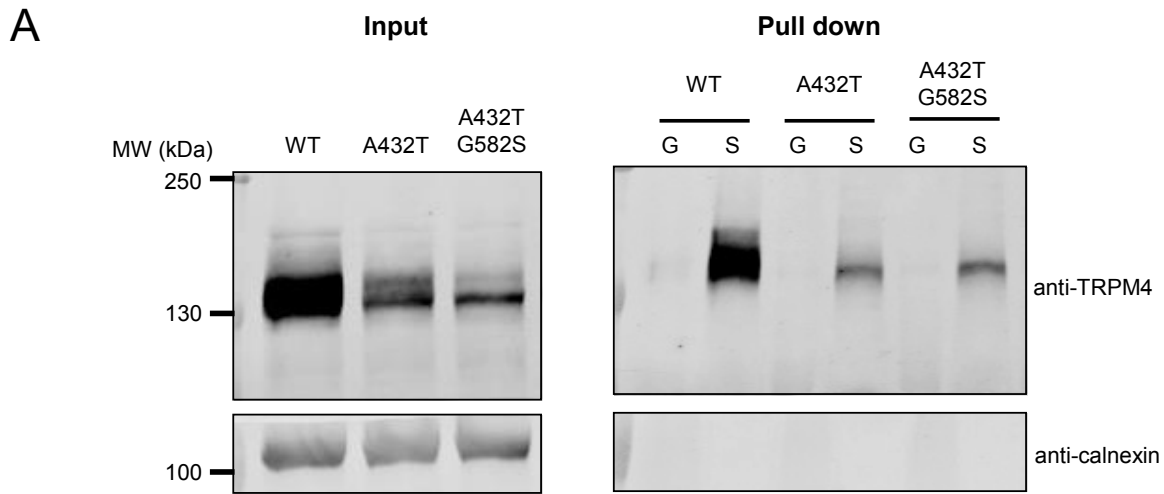


Figure 9, Syam *et al.*

VI- Etude #5: RECHERCHE DE VARIANTS RARES PAR L'ANALYSE DE TRIOS

VI.1- Problématique et objectifs

Ce travail est issu des résultats du dépistage ECG parental d'enfants porteurs d'un BAV isolé et non-immun (étude #2). Nous avons en effet montré que, bien que le BAV soit d'apparence sporadique et idiopathique, les parents de ces enfants présentaient significativement plus de troubles de conduction infra-cliniques que des sujets sains contrôles appariés sur l'âge et le genre [Baruteau *et al*, 2012]. De façon surprenante, le phénotype ECG des parents et de leurs enfants était différent, les parents présentant volontiers des anomalies étagées et moins sévères de la conduction cardiaque (principalement représentées par un BAV du premier degré, un bloc de branche droit \pm une déviation axiale gauche) alors que la majorité des enfants étaient en BAV complet au moment du diagnostic. Notre hypothèse suppose donc l'existence de deux variants mineurs, un chez chacun des deux parents, dont l'enfant atteint hériterait et la combinaison de ces deux variants lui conférerait un phénotype plus sévère, expliquant une altération plus sévère de la conduction cardiaque. Ce mode de transmission est en faveur d'un modèle de transmission de type oligogénique ou polygénique.

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

Par l'analyse de trios familiaux constitués d'un enfant atteint et de ses deux parents, nous avons cherché à mettre en évidence la responsabilité de variants alléliques rares – soit de variants *de novo*, soit de variants hétérozygotes composites – dans la survenue d'un BAV isolé et non-immun diagnostiqué *in utero* ou dans l'enfance.

VI.2- Méthodologie

Parmi les 141 enfants propositus porteurs d'un BAV isolé et non-immun recrutés dans l'étude #1 et les 130 parents recrutés dans l'étude #2, 15 trios familiaux constitués d'un propositus et de ses deux parents ont été sélectionnés.

La sélection de ces trios a été faite selon 3 critères:

a/ les deux parents étaient sains, c'est-à-dire asymptomatiques et avec un ECG de dépistage montrant une conduction atrioventriculaire et intraventriculaire normale (ou considérée comme étant dans les limites de la normale, tel qu'un bloc de branche droit incomplet isolé);

b/ il n'y avait pas d'histoire familiale de troubles de conduction, de syncope, d'implantation d'un stimulateur cardiaque ou de mort subite;

c/ l'ADN du propositus et de ses deux parents était disponible dans la DNA-thèque constituée au sein de la Biocollection Cardiogénétique de l'Université de Nantes (étude #2).

Les 15 propositus considérés dans nos trios (9 garçons, sex ratio: 0.6) présentaient un BAV congénital (3 patients) ou un BAV de l'enfance (12 patients). Les caractéristiques cliniques et ECG sont résumées dans le Tableau 3-5. Conformément aux critères d'inclusion, les 30 parents étaient sains, présentant une conduction atrioventriculaire et intraventriculaire normale, à l'exception d'un bloc de branche droit incomplet isolé.

Tableau 3-5: Caractéristiques cliniques des 15 propositus

| Patient Integralis ADN | Age diag. | Age PM | Conduct. AV | Conduct. intra-V | Progression BAV partiel | FC bpm | PR ms | QRS ms | Axe deg | QTc ms |
|------------------------------|---------------------|--------|-------------------|---------------------|----------------------------|-----------|----------|-----------|------------|-----------|
| 36612 CD11143 | 1.5 | 2 | BAV3 | normale | na | 47 | na | 78 | 95 | 389 |
| 29460 CD03838 | 15 | 22 | BAV1 + BAV2 M1 | normale | Oui BAV3+BBDC | 60 | na | 158 | 80 | 494 |
| 29497 CD03859 | 2 | 2.5 | BAV3 | normale | na | 75 | na | 70 | 40 | 459 |
| 31755 CD03902 | <i>In utero</i> | 0 | BAV3 | BBGC | na | 39 | na | 125 | -60 | 760 |
| 29523 CD05294 | <i>In utero</i> | 0 | BAV3 | BBDC | na | 56 | na | 122 | 140 | 325 |
| 29529 CD05334 | 5 | 5 | BAV3 | normale | na | 49 | na | 60 | 70 | 429 |
| 29474 CD04384 | 2 | na | BAV3 | normale | na | 60 | na | 63 | 80 | 456 |
| 29485 CD03661 | <i>In utero</i> | 0.04 | BAV3 | normale | na | 48 | na | 70 | 35 | 420 |
| 34656 CD03666 | 4 | na | BAV3 | normale | na | 50 | na | 55 | 55 | 394 |
| 31697 CD05916 | 8.5 | 8.5 | BAV3 | BBDC | na | 40 | na | 123 | 145 | 340 |
| 29496 CD03848 | 7 | na | BAV1 + BAV2 M1 | normale | non | 51 | 237 | 73 | 35 | 488 |
| 33531 CD08330 | 3 | na | BAV1 | normale | non | 66 | 392 | 64 | 60 | 415 |
| 24400 R1384 | 3 | 4.5 | BAV3 | normale | na | 50 | na | 65 | -40 | 420 |
| 34675 CD05367 | 0.6 | 1.5 | BAV 2/1 | normale | Oui BAV3 QRSfins | 60 | na | 75 | 60 | 397 |
| 31728 CD06155 | 3.5 | 4 | BAV3 | normale | na | 43 | na | 70 | 30 | 438 |

Conduct. AV: conduction atrioventriculaire; Conduct. intra-V: conduction intraventriculaire; BAV: bloc atrioventriculaire; BAV2 M1: BAV2 Mobitz 1; BBDC: bloc de branche droit complet; BBGC: bloc de branche gauche complet; Age diag.: age au diagnostic du trouble de conduction; Age PM: age a la primo-implantation d'un stimulateur cardiaque; na: non applicable; QTc: QT corrige selon la formule de Bazett.

Les ages sont exprimes en années. Les patients #29474, #34656, #29496 et #33531 ne sont pas implantés d'un stimulateur cardiaque.

Implication personnelle. Mon implication personnelle s'est simplement résumée au recueil des données cliniques, à l'interprétation des ECG et à la vérification des phénotypes des propositus et des parents.

L'ensemble de ce travail d'analyse des trios a été fait par Xavier Daumy dans le cadre de sa thèse réalisée au sein de l'équipe « variabilité génétique et mort subite », dirigée par Richard Redon à l'institut du thorax (équipe 4: Variabilité génétique et mort subite), INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291 à l'Université de Nantes. C'est donc son propre travail qui est rapporté ici.

VI.3- Recherche de variants *de novo*.

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

Dans cette étude, nous avons cherché à identifier des variants prédits délétères par VEP et/ou SnpEff, d'une fréquence inférieure à 1% dans la population européenne. Les analyses ont été réalisées suivant la procédure "Workflow Knime" décrite par Xavier Daumy dans sa thèse. Pour mettre en application cette hypothèse, nous avons constitué deux pools: un pool des 15 patients BAVc atteints et un pool des 30 parents sains et nous avons cherché les variants présents dans le premier pool et absent du second. Le cas d'un variant partagé par un patient atteint et un membre du pool parents sains autre que son père ou sa mère ne nous intéresse pas dans la mesure où dans ce cas, le parent étant sain, ce variant pourrait être considéré comme non rare et non causal.

Au total, 143 variants ont pu être identifiés (138 variants différents dont 5 variants présents chez deux patients) comme potentiellement *de novo* suite à l'analyse des fichiers VCF. Ces variants ont tous été analysés individuellement par visualisation des alignements à l'aide de l'outil IGV (« *Integrative Genome Viewer* ») et tous les faux-positifs flagrants et tous ceux qui n'intervenaient pas dans un transcrit codant de la base de NCBI ('*RefSeq Genes*') ont été éliminés de l'analyse. Parmi les 96 variants restants, 19 ont été validés *de novo* par séquençage capillaire (Tableau 3-6), dont 14 faux-sens, 3 variants intervenant dans des sites d'épissage, 1 variant impliquant le gain d'un codon-stop prématuré et 1 délétion de 8 bases induisant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon-stop prématuré. Outre ces variants *de novo*, 62 autres variants ont été testés par séquençage capillaire (dont 51 hérités d'un des deux parents, souvent mal couvert, et 11 faux-positifs dus à des biais d'expérimentation et/ou erreurs informatiques de détection secondaires à une mauvaise couverture de la région) et 15 variants n'ont pas pu l'être, notamment parce que 13 d'entre eux interviennent dans des régions répétées identifiées du

génomique répertoriées dans les bases de données 'Segmental Duplication', 'Human Chained Self Alignments' et/ou 'RepeatMasker' (Tableau 3-7) [Bailey *et al*, 2001; Chiaromonte *et al*, 2002; Smit *et al*, 1996].

Tableau 3-6: Tableau récapitulatif des 19 variants *de novo* identifiés

| Tri o | Gène | Nucléotide | Acide Aminé | Conséque nc e | Prédictions SIFT/PPH-2 |
|----------|----------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------------|---|
| 0 | <i>NSUN6</i> | c.956 C>T | p.R319Q | Faux-sens | délétère(0.01) probablement dommageable(0.997) |
| 1 | <i>GCN1L1</i> | G>T | | Site d'épissage (intronique) | |
| 2 | <i>SHBG</i> | c.74G>A | p.R25H | Faux-sens | toléré(1) bénin(0) |
| 2 | <i>CNTROB</i> | c.137G>A | p.R46Q | Faux-sens | toléré(0.09) bénin(0.057) |
| 3 | <i>USH2A</i> | c.82T>A | p.I28L | Faux-sens | toléré(0.61) bénin(0.002) |
| 3 | <i>SOS2</i> | c.58G>C | p.R20G | Faux-sens | délétère(0) bénin(0.005) |
| 4 | <i>GPR107</i> | c.1396C>A | p.L466I | Faux-sens | toléré(1) bénin(0) |
| 6 | <i>PTGER3</i> | C>A | | Site d'épissage (intronique) | |
| 7 | <i>TTC21B</i> | c.3641 T>C | p.D1214G | Faux-sens | délétère(0) probablement dommageable(0.982) |
| 7 | <i>C7orf61</i> | c.209 A>G | p.L70S | Faux-sens | toléré(0.06) peut-être dommageable(0.621) |
| 8 | <i>TEX29</i> | G>C | | Site d'épissage (5'-UTR) | |
| 9 | <i>LPHN2</i> | c.296 A>G | p.N99S | Faux-sens | toléré(0.05) bénin(0.227) |
| 9 | <i>RHOBTB1</i> | c.1259 G>A | p.T420M | Faux-sens | délétère(0) probablement dommageable(0.933) |
| 10 | <i>RYR2</i> | c.10361 G>A | p.R3454H | Faux-sens | délétère(0) probablement dommageable(0.988) |
| 11 | <i>ZNF683</i> | c.1219_1226 delCTGCACT G | p.Q407CfsX 461 | Frameshift & protéine tronquée | |
| 11 | <i>ZNF22</i> | c.85 C>T | p.Q29X | Gain d'un codon-stop | |
| 11 | <i>GJC1</i> | c.224 C>T | p.R75H | Faux-sens | délétère(0) probablement dommageable(1) |
| 11 | <i>ATAD2B</i> | c.4212 C>G | p.L1404F | Faux-sens | délétère(0) probablement dommageable(0.995) |
| 14 | <i>DOPEY2</i> | c.6697 C>T | p.R2233C | Faux-sens | délétère(0.03) peut-être dommageable(0.585) |

Tableau 3-7: Validation des variants d'intérêt chez les 15 enfants atteints de BAVc

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

VI.4- Recherche de variants hétérozygotes composites.

Une seconde hypothèse a été proposée dans notre étude: l'hypothèse d'hétérozygotie composite (hétérozygotie composite au sens strict, c'est-à-dire que l'enfant hérite de deux variants hétérozygotes différents, chacun d'un de ses parents, et récessivité, c'est-à-dire que l'enfant homozygote hérite deux fois du même variant hétérozygote).

Pour cette seconde hypothèse, dans la mesure où nous nous intéressons à des variants plus fréquents, l'utilisation de pools n'est pas une solution adaptée; les trios ont donc été analysés un par un. Ainsi, 2630 variants ont pu être identifiés dans l'ensemble des 15 trios, soit 175,3 par trio en moyenne (Tableau 3-8). Il y a bien sûr beaucoup plus de variants par trio par rapport à l'hypothèse *de novo*, les variants *de novo* étant très rares, et il est impossible de tous les valider par séquençage capillaire. Une sélection a donc été réalisée pour n'en valider, au moins dans un premier temps, qu'une partie.

Cette sélection, non exhaustive, a consisté à ne conserver que les variants intervenant dans des gènes potentiellement impliqués (gènes candidats, gènes à expression cardiaque, gènes codant pour des canaux ioniques, des sous-unités de collagène, des protéines d'adhésion et/ou de communication cellulaire...). Soixante-six (2,5 %) de ces variants ont donc été validés par inspection visuelle à l'aide de l'outil IGV (« *Integrative Genome Viewer* ») et les validations capillaires sont encore en cours. Quarante variants (60,6 %) ont été testés en séquençage

capillaires et tous (100 %) ont été validés, aucun ne s'est révélé être un faux-positif. L'ensemble des 66 variants sélectionnés sont listés dans le Tableau 3-9. Ils interviennent dans 16 gènes: *CACNA1I*, *CMYA5*, *COL15A1*, *COL16A1*, *COL18A1*, *COL2A1*, *COL5A3*, *COL6A5*, *DST*, *FAT1*, *FBN3*, *ITGA2*, *NOTCH1*, *SCN7A*, *TRPM1* et *TRPM4*.

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

Tableau 3-8: Récapitulatif du nombre de variants identifiés à l'aide de l'hypothèse d'hétérozygotie composite

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

Tableau 3-9 – Récapitulatif des 66 variants validés par inspection visuelle grâce à l’outil IGV

| Trio | Gene | Autres trios | Nucléotide | Conséquence | Acide Aminé | Hérité de | SIFT | PPH-2 |
|------|---------|--------------|------------|----------------------|-------------|-----------|----------------|---------------------------------|
| 0 | COL6A5 | | c.1742 C>T | Faux-sens | A581V | père | | probablement dommageable(0.999) |
| 0 | COL6A5 | | c.2414 A>G | Faux-sens | H805R | mère | | bénin(0.029) |
| 0 | TRPM1 | 2 | c.4611 A>T | Faux-sens | H1537Q | mère | toléré(0.49) | bénin(0) |
| 0 | TRPM1 | | c.4300 C>T | Faux-sens | V1434I | père | toléré(0.55) | bénin(0) |
| 0 | TRPM1 | 2 | c.4240 C>A | Gain d’un codon-stop | E1414X | mère | | |
| 0 | TRPM1 | | c.3958 C>T | Faux-sens | E1320K | père | délétère(0.02) | possiblement dommageable(0.729) |
| 1 | ITGA2 | | c.1600 G>A | Faux-sens | E534K | mère | toléré(1) | bénin(0) |
| 1 | ITGA2 | | c.2678 T>C | Faux-sens | I893T | père | délétère(0) | possiblement dommageable(0.73) |
| 2 | COL15A1 | 9, 14 | c.1518 A>C | Faux-sens | E506D | père | | bénin(0.015) |
| 2 | COL15A1 | 4, 12 | c.3994 G>A | Faux-sens | V1332I | mère | | possiblement dommageable(0.538) |
| 2 | TRPM1 | 0 | c.4611 A>T | Faux-sens | H1537Q | père | toléré(0.49) | bénin(0) |
| 2 | TRPM1 | | c.4252 G>T | Faux-sens | P1418T | mère | toléré(0.38) | bénin(0.019) |
| 2 | TRPM1 | 0 | c.4240 C>A | Gain d’un codon-stop | E1414X | père | | |
| 3 | TRPM4 | | c.301 G>A | Faux-sens | A101T | père | toléré(0.76) | bénin(0.002) |
| 3 | TRPM4 | | c.2209 G>A | Faux-sens | G737R | mère | toléré(0.33) | possiblement dommageable(0.765) |
| 4 | COL15A1 | 9, 12 | c.1336 G>A | Faux-sens | G446R | père | | bénin(0.001) |
| 4 | COL15A1 | 2, 12 | c.3994 G>A | Faux-sens | V1332I | mère | | possiblement dommageable(0.538) |
| 4 | COL16A1 | | c.1958 C>T | Faux-sens | G653D | mère | - | inconnu(0) |
| 4 | COL16A1 | | c.250 C>T | Faux-sens | V84M | père | - | inconnu(0) |
| 4 | FBN3 | | c.7620 A>C | Faux-sens | H2540Q | père | délétère(0.04) | probablement dommageable(0.989) |
| 4 | FBN3 | | c.3365 C>A | Faux-sens | G1122V | père | délétère(0.03) | bénin(0.032) |
| 4 | FBN3 | | c.1418 C>T | Faux-sens | R473Q | mère | toléré(0.5) | bénin(0.004) |
| 4 | FBN3 | | c.1113 C>T | Faux-sens | M371 | mère | toléré(0.4) | bénin(0.002) |
| 4 | FBN3 | | c.751 A>G | Faux-sens | C251R | mère | délétère(0) | probablement dommageable(0.999) |
| 5 | COL18A1 | | c.538 G>A | Faux-sens | A180T | mère | toléré(0.86) | inconnu(0) |
| 5 | COL18A1 | 7 | c.4318 G>A | Faux-sens | D1440N | père | délétère(0.01) | possiblement dommageable(0.668) |
| 5 | SCN7A | | c.4901 C>T | Faux-sens | R1634H | père | délétère(0.03) | bénin(0.224) |
| 5 | SCN7A | | c.3110 A>C | Faux-sens | V1037G | mère | délétère(0) | probablement dommageable(0.968) |
| 6 | FBN3 | | c.143 C>T | Faux-sens | R48Q | père | délétère(0.01) | probablement dommageable(0.992) |
| 6 | FBN3 | | c.2033 G>A | Faux-sens | T678M | mère | toléré(0.22) | bénin(0.028) |
| 6 | NOTCH1 | | c.4129 G>A | Faux-sens | P1377S | père | toléré(0.41) | bénin(0.002) |
| 6 | NOTCH1 | | c.3836 C>T | Faux-sens | R1279H | mère | toléré(0.16) | bénin(0.033) |
| 7 | COL18A1 | | c.2657 C>G | Faux-sens | P886R | mère | délétère(0) | probablement dommageable(0.945) |
| 7 | COL18A1 | | c.3835 G>A | Faux-sens | D1279N | père | toléré(0.25) | possiblement dommageable(0.803) |
| 7 | COL18A1 | 5 | c.4318 G>A | Faux-sens | D1440N | père | délétère(0.01) | possiblement dommageable(0.668) |
| 8 | COL5A3 | | c.3584 A>G | Faux-sens | V1195A | père | délétère(0.04) | possiblement |

| | | | | | | | | |
|----|---------|-------|----------------|--------------------------------|--------|------|----------------|------------------------------------|
| | | | | | | | | dommageable(0.883) |
| 8 | COL5A3 | | c.3365 C>T | Faux-sens | R1122H | mère | délétère(0.01) | possiblement dommageable(0.56) |
| 8 | FAT1 | | c.12653 T>C | Faux-sens | D4218G | père | toléré(0.29) | possiblement dommageable(0.571) |
| 8 | FAT1 | | c.8152 T>C | Faux-sens | I2718V | mère | toléré(0.71) | bénin(0.052) |
| 8 | FAT1 | | c.385 C>G | Faux-sens | V129L | mère | toléré(1) | bénin(0) |
| 9 | CACNA1I | | c.4538 C>T | Faux-sens & site d'épissage | T1513M | père | toléré(0.22) | bénin(0.012) |
| 9 | CACNA1I | | c.4603 G>T | Faux-sens | V1535L | mère | toléré(0.19) | possiblement dommageable(0.622) |
| 9 | COL15A1 | 4, 12 | c.1336 G>A | Faux-sens | G446R | mère | | bénin(0.001) |
| 9 | COL15A1 | 2, 14 | c.1518 A>C | Faux-sens | E506D | père | | bénin(0.015) |
| 10 | COL2A1 | | c.3991 C>T | Faux-sens | V1331I | mère | toléré(1) | inconnu(0) |
| 10 | COL2A1 | 14 | c.426 T>A | Faux-sens | E142D | père | toléré(0.66) | inconnu(0) |
| 10 | DST | | c.11161 C>T | Faux-sens | D3721N | mère | délétère(0.03) | probablement dommageable(0.988) |
| 10 | DST | | c.10788 G>C | Faux-sens | S3596R | mère | délétère(0) | probablement dommageable(0.988) |
| 10 | DST | | c.5780 T>C | Faux-sens | H1927R | père | toléré(0.07) | possiblement dommageable(0.795) |
| 12 | COL15A1 | 4, 9 | c.1336 G>A | Faux-sens | G446R | mère | | bénin(0.001) |
| 12 | COL15A1 | | c.3140 G>A | Faux-sens | G1047D | mère | | bénin(0.005) |
| 12 | COL15A1 | 2,4 | c.3994 G>A | Faux-sens | V1332I | père | | possiblement dommageable(0.538) |
| 14 | CMYA5 | | c.191 A>G | Faux-sens | Y64C | mère | toléré(1) | bénin(0) |
| 14 | CMYA5 | | c.1046 G>A | Faux-sens | G349D | mère | toléré(1) | bénin(0) |
| 14 | CMYA5 | | c.1772 G>A | Faux-sens | G591D | mère | toléré(1) | bénin(0) |
| 14 | CMYA5 | | c.1951 A>C | Faux-sens | S651R | mère | toléré(0.78) | bénin(0) |
| 14 | CMYA5 | | c.3017 T>C | Faux-sens | V1006A | mère | toléré(0.26) | bénin(0) |
| 14 | CMYA5 | | c.4700 C>A | Faux-sens | A1567E | mère | toléré(0.48) | possiblement dommageable(0.628) |
| 14 | CMYA5 | | c.4795 T>G | Faux-sens | S1599A | mère | toléré(0.17) | bénin(0.121) |
| 14 | CMYA5 | | c.5161 A>G | Faux-sens | I1721V | mère | toléré(1) | bénin(0) |
| 14 | CMYA5 | | c.5758 A>G | Faux-sens | S1920G | mère | toléré(1) | bénin(0) |
| 14 | CMYA5 | | c.6784 G>C | Faux-sens | V2262L | mère | toléré(1) | bénin(0) |
| 14 | CMYA5 | | c.8718 A>C | Faux-sens | K2906N | mère | délétère(0.03) | bénin(0.103) |
| 14 | CMYA5 | | c.245 G>A | Faux-sens | G82E | père | délétère(0) | probablement dommageable(0.938) |
| 14 | COL15A1 | 2, 9 | c.1518 A>C | Faux-sens | E506D | mère | | bénin(0.015) |
| 14 | COL15A1 | | c.2959 G>A | Faux-sens | G987R | père | | probablement dommageable(0.998) |

VII- DISCUSSION

Des études cliniques puis moléculaires déjà anciennes ont conduit à considérer le trouble familial progressif de la conduction (OMIM 113900) comme une pathologie héréditaire. Morquio et Osler, respectivement en 1901 et 1903, rapportaient pour la première fois la survenue de troubles de la conduction cardiaque chez des individus d'une même famille [Morquio *et al*, 1901; Osler *et al*, 1903]. Un substrat génétique a ensuite été longtemps suggéré, d'autres auteurs publiant des noyaux familiaux de troubles conductifs isolés ségrégeant sur deux (ou plus de deux) générations [Fulton *et al*, 1910; Wendkos *et al*, 1947; Lynch *et al*, 1973]. En 1965, Gazes *et al*. rapportent la ségrégation de syncopes d'Adams-Stokes et de BAV de haut grade dans une même famille sur quatre générations, suggérant un mode de transmission héréditaire de type autosomique dominant [Gazes *et al*, 1965]. Parallèlement, dans les années 1960, Lev et Lenègre ont montré la relation entre syncope d'Adams-Stokes, troubles de conduction de haut grade et fibrose des voies de conduction, faisant ainsi le lien entre les données cliniques, électrocardiographiques et histopathologiques [Lenègre *et al*, 1955; Lenègre *et al*, 1963; Lenègre *et al*, 1964; Lev *et al*, 1964; Lev *et al*, 1971]. Le trouble progressif de la conduction cardiaque – ou maladie de Lev-Lenègre – se définit comme une altération progressive de la conduction dans le faisceau de His, se traduisant par un élargissement des QRS, un bloc de branche droit et/ou un bloc de branche gauche, pouvant évoluer vers le bloc complet, des syncopes et la mort subite. Ces anomalies de conduction sont dues à une dégénérescence fibro-scléreuse des voies de conduction, affectant le tronc du faisceau de His et ses branches [Lenègre *et al*, 1964] et éventuellement également le noeud atrioventriculaire [Lev *et al*, 1971].

En 1999, Schott *et al*. ont identifié la première mutation génétique associée à une maladie de Lev-Lenègre familiale. Il s'agissait d'une mutation du gène *SCN5A* qui code pour la sous-unité alpha du canal sodique cardiaque voltage-dépendant [Schott *et al*. 1999]. Parmi les 65 apparentés, 15 présentaient des troubles de conduction de degré variable sur cœur structurellement sain: un bloc de branche droit chez 5 d'entre eux, un bloc de branche gauche chez 2, un hémibloc antérieur ou postérieur gauche chez 3, un allongement de l'intervalle PR chez 8. Cinq d'entre eux avaient été appareillés d'un stimulateur cardiaque du fait d'un bloc complet ou de syncopes. Indépendamment de l'âge des sujets, le suivi à long terme a montré une détérioration de la conduction avec l'âge. L'analyse fonctionnelle a montré qu'aucun courant sodique entrant transitoire n'était généré en réponse à la dépolarisation, traduisant une mutation avec un effet perte de fonction [Probst *et al*, 2003]. A la suite de ce travail *princeps*, d'autres équipes ont rapporté de nouvelles mutations dans *SCN5A* [Tan *et al*, 2001; Wang *et al*, 2002; Bezzina *et al*, 2003] puis dans d'autres gènes tels que

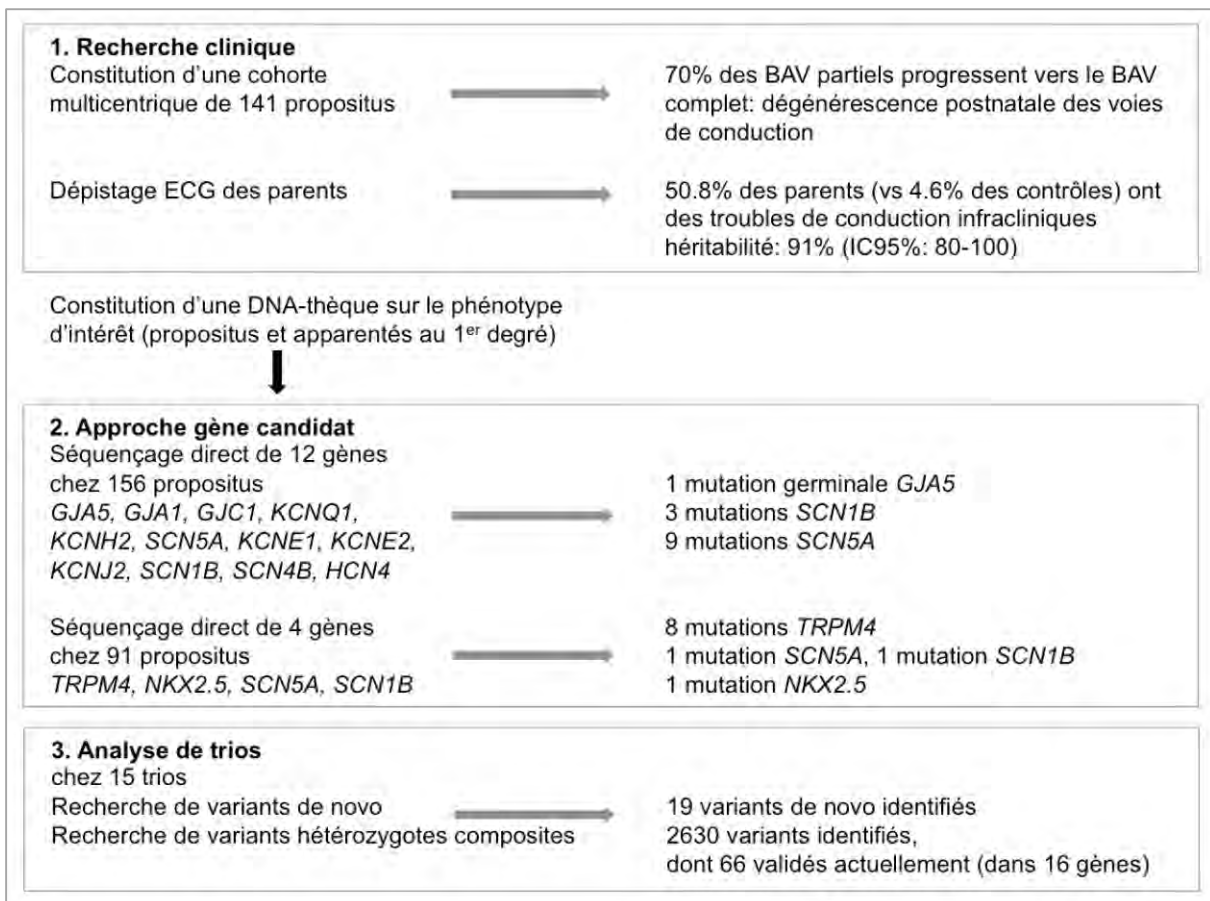
SCN1B [Watanabe *et al*, 2008] ou *TRPM4* [Kruse *et al*, 2009], élargissant notre compréhension des bases génétiques et moléculaires des troubles de conduction héréditaires.

Plus récemment, une approche d'épidémiologie génétique a apporté de nouveaux arguments forts pour confirmer l'origine génétique de la maladie de Lev-Lenègre familiale chez l'adulte [Gourraud *et al*, 2012]. Ce travail était fondé sur l'hypothèse que dans une région où la population est géographiquement stable, les descendants d'un ancêtre atteint d'une maladie génétique restent vivre dans la même région durant plusieurs générations, si bien qu'une différence significative dans la répartition géographique de la maladie peut apparaître au cours du temps. En utilisant les numéros de sécurité sociale, les auteurs ont pu déterminer la commune de naissance de plus de 6600 patients implantés d'un stimulateur cardiaque dans l'ouest de la France. En cartographiant la fréquence d'implantation de stimulateurs cardiaques pour troubles isolés dégénératifs de la conduction cardiaque, ils ont observé une grande hétérogénéité dans la fréquence de répartition de cette pathologie, allant de 0.21% à 2.28% selon les communes. Cette approche a conduit à l'identification de cinq grandes familles de troubles de conduction, apportant de nouveaux arguments forts pour une origine génétique de cette pathologie.

Pour autant, même si un petit nombre de gènes a déjà pu être associé aux troubles de conduction sur coeur sain et qu'il est désormais clair que les troubles de conduction dégénératifs – lorsqu'ils surviennent dans un cadre familial – ne sont pas seulement associés à un processus physiologique de vieillissement des voies de conduction, le substrat physiopathologique conduisant à un bloc atrioventriculaire et/ou intraventriculaire apparaît complexe et encore imparfaitement compris. De nombreux gènes sont impliqués dans le développement ou les mécanismes électrophysiologiques sous-tendant l'activité des voies de conduction et il est hautement probable que seule une petite fraction des mutations et des gènes responsables des anomalies de conduction ait été identifiée à ce jour. Il est de plus probable que les troubles de conduction héréditaires aient une origine multifactorielle, associant des facteurs génétiques à des facteurs environnementaux. Aujourd'hui, la recherche de mutations chez un patient ayant des anomalies de conduction nécessite au préalable un fort index de suspicion clinique. A l'avenir, si nous parvenons à identifier la majorité des mécanismes moléculaires associés aux troubles de conduction héréditaires, le dépistage génétique pourrait faire partie de l'évaluation initiale des patients présentant un BAV et/ou un bloc de branche. L'identification précoce d'apparentés à risque pourrait également permettre de leur proposer un suivi médical adapté et une stratégie individualisée. Cependant il est possible qu'une certaine proportion des formes héréditaires de troubles conductifs ne réponde pas à un modèle de transmission monogénique mais soit due à un modèle plus complexe, de type oligogénique ou polygénique, rendant alors cette perspective plus aléatoire.

Les projets de recherche de ce chapitre 3 avaient pour but d'essayer de progresser dans la compréhension du mode de transmission et des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie du BAV isolé et non-immun lorsqu'il est diagnostiqué *in utero* ou au cours de l'enfance. Notre stratégie de recherche a compris successivement une phase de recherche clinique, une approche gène candidat et l'analyse de trios familiaux à la recherche de variants rares (Figure 3-11).

Figure 3-11: Stratégie de recherche et principaux résultats dans l'exploration du BAV pédiatrique isolé et non-immun



Notre phase de recherche clinique a permis, par une étude rétrospective multicentrique, de colliger la plus grande cohorte d'enfants porteurs d'un BAV "idiopathique" publiée à ce jour (141 propositus, 130 parents, 130 sujets contrôles appariés) et de clarifier les points suivants:

(a): le pronostic à long-terme de cette forme de BAV est favorable, sous réserve du respect des recommandations internationales pour l'implantation d'un stimulateur cardiaque chez l'enfant [Brignole *et al*, 2013; Epstein *et al*, 2013]. Après un suivi moyen de 11.6 ± 6.7 années (1-32 années), aucun patient de notre série n'est décédé ou n'a présenté une cardiomyopathie dilatée avec dysfonction systolique du ventricule gauche. Or le BAV congénital isolé – fortement associé à la présence d'auto-anticorps maternels – connaît un taux élevé de mortalité [Eliasson *et al*, 2015; Bordachar *et al*, 2014; Lopes *et al*, 2008; Villain *et al*, 2006]. Dans une série de 29 BAV foetaux, dont 90% étaient immunologiques, la mortalité à long-terme était de 43% [Jaeggi *et al*, 2002]. Dans notre série *a contrario*, le devenir à long terme n'était influencé ni par l'âge au diagnostic, ni par le degré du BAV au moment du diagnostic ou la présence de symptômes. La présentation clinique et le devenir à long terme des 26 BAV congénitaux non-immuns – y compris les 12 BAV foetaux – étaient similaires à ceux des 115 BAV de l'enfance. Nos résultats suggèrent que le pronostic est étroitement lié au statut immun maternel et non à l'âge au moment du diagnostic, puisque le devenir à long terme des enfants porteurs d'un BAV non-immun est favorable, y compris lorsque celui-ci est diagnostiqué *in utero*. Un certain nombre de cas de BAV isolé et non-immun diagnostiqué *in utero* ou dans l'enfance pourrait donc correspondre à une entité clinique distincte, ayant une physiopathologie propre et un pronostic spécifique;

(b): le caractère progressif de cette forme de BAV. Dans une étude monocentrique préalable, Villain *et al*. avaient suggéré qu'une progression d'un BAV incomplet vers le bloc complet était plus fréquemment observée lorsque le BAV était non-immunologique [Villain *et al*, 2006]. Dans notre série de BAV non-immuns, plus des deux-tiers des BAV incomplets ont progressé vers le bloc complet dans un délai moyen court inférieur à 3 ans, indépendamment de l'âge au moment du diagnostic. Cette progression du trouble conducteur est le témoin d'un mécanisme physiopathologique sous-jacent autonome, qui incite à proposer une surveillance ECG étroite et régulière des enfants présentant un BAV du premier ou du second degré. Cette observation suggère fortement l'existence d'un processus de dégénérescence postnatale des voies de conduction. Notre hypothèse était que cette détérioration postnatale de la conduction cardiaque était d'origine génétique.

(c): le dépistage ECG réalisé chez des parents asymptomatiques d'enfants porteurs d'un BAV idiopathique d'apparence sporadique, a mis en évidence chez ces parents une forte prévalence

d'anomalies de la conduction cardiaque caractérisées par un allongement de la durée de l'onde P, de l'intervalle PR et du complexe QRS; une forte proportion de troubles conductifs caractérisés, principalement représentés par un BAV du premier degré, un bloc de branche droit complet ou incomplet et une déviation axiale gauche; une très forte hérédité du trouble conductif, estimée à 91% dans cette population.

Ces premiers résultats incitent à proposer la réalisation d'une enquête familiale et d'un ECG de dépistage aux apparentés au premier degré de tout nouveau-né ou enfant atteint d'un BAV isolé et non-immun sans cause documentée, et d'envisager le diagnostic de trouble de conduction héréditaire, même si celui-ci est d'allure sporadique et que l'histoire familiale n'est pas informative.

BAV pédiatrique: hérédité monogénique ou oligo/poly -génique? Si la mise en évidence d'une forte hérédité dans cette population a renforcé notre hypothèse de travail et ouvert la voie aux études de génétique et de biologie moléculaire, elle pose aussi de nouvelles questions, et en premier lieu celle du mode de transmission. Les pedigrees familiaux de troubles de conduction héréditaires publiés à ce jour montraient une transmission de type autosomique dominante, suggérant un effet majeur des mutations responsables du trouble conductif [Gazes *et al*, 1965; Schott *et al*, 1999; Tan *et al*, 2001; Watanabe *et al*, 2008; Kruse *et al*, 2009]. Nos résultats issus du dépistage ECG parental rendent ce mode de transmission peu probable dans notre cohorte. En effet, bien que les parents dont les ECG montraient une conduction atrioventriculaire et intraventriculaire normale puissent être des porteurs sains d'un variant allélique à pénétrance incomplète, les deux parents présentaient des troubles conductifs infra-cliniques (phénotype atteint) dans seulement près de 30% des cas. De plus, de façon surprenante, le phénotype ECG des parents apparaissait moins sévère que celui de leur enfant, avec souvent une atteinte diffuse et étagée de la conduction cardiaque mais sans bloc complet – à l'exception d'un cas. La majorité des enfants présentaient un BAV complet avec un rythme d'échappement à complexe QRS fin, et seuls 12% des enfants présentaient des troubles de conduction intraventriculaire associés. A l'inverse, les parents présentaient essentiellement des troubles de la conduction intraventriculaire, consistant le plus souvent en un bloc de branche droit et une déviation axiale gauche, éventuellement associés à un BAV du premier degré. Seuls 5% des parents présentaient un allongement de l'espace PR sans évidence d'anomalie associée de la conduction de siège infra-hisien. Cette différence de phénotype ECG entre parents et enfants traduit probablement le fait que la physiopathologie du BAV héréditaire de l'enfant est sous-tendue par une interaction complexe entre plusieurs gènes. Dans la mesure où la plupart des cardiomyopathies et des canalopathies cardiaques héréditaires connaissent une grande hétérogénéité génétique et clinique, une pénétrance incomplète et une expressivité variable, on peut s'attendre à ce que le BAV héréditaire de l'enfant connaisse cette même complexité. De plus, l'intervention de gènes

modificateurs d'une part, et de variants de novo ou d'hétérozygotie composite d'autre part est possible et pourrait expliquer respectivement le caractère progressif de ces BAV et la différence du phénotype entre parents et enfants.

Tableau 3-10: Gènes candidats considérés dans le BAV pédiatrique isolé et non-immun

| Gène | Taille du gène (nb d'exons, kb) | Locus | Protéine | Fonction de la protéine | MIM number |
|--------|---------------------------------|-----------------|----------|---|------------|
| SCN5A | 28 exons | 3p22.2 | Nav1.5 | Canal sodique voltage dépendant (sous-unité alpha) | 600163 |
| SCN1B | 5 exons | 19q13.12 | Scn1b | Canal sodique voltage dépendant (sous-unité beta) | 600235 |
| SCN4B | 5 exons | 11q23.3 | Scn4b | Canal sodique voltage dépendant (sous-unité beta) | 608256 |
| SCN10A | 27 exons | 3p22.2 | Nav1.8 | Canal sodique voltage dépendant (sous-unité alpha) | 604427 |
| TRPM4 | 25 exons | 19q13.33 | Trpm4 | Canal cationique non sélectif activé par Ca ²⁺ intracellulaire | 606936 |
| KCNQ1 | 16 exons | 11p15.5-p15.4 | KVLQT1 | Canal potassique voltage dépendant | 607542 |
| KCNH2 | 15 exons | 7q36.1 | HERG | Canal potassique voltage dépendant | 152427 |
| KCNE1 | 3 exons | 21q22.11-q22.12 | minK | Canal potassique voltage dépendant | 176261 |
| KCNE2 | 2 exons | 21q22.11 | Kcne2 | Canal potassique voltage dépendant | 603796 |
| KCNJ2 | 2 exons | 17q24.3 | Kir2.1 | Canal potassique | 600681 |
| KCNK17 | 5 exons | 6p21.2 | TASK-4 | Canal potassique | 607370 |
| HCN4 | 8 exons | 15q24.1 | HCN4 | Canal potassique | 605206 |
| GJA1 | 2 exons | 6q22.31 | Cx43 | Jonction communicante | 121014 |
| GJA5 | 3 exons | 1q21.2 | Cx40 | Jonction communicante | 121013 |
| GJC1 | 1 exon | 17q21.31 | Cx45 | Jonction communicante | 608655 |
| NKX2.5 | 2 exons | 5q35.1 | Nkx2.5 | Facteur de transcription à boîte homéotique | 600584 |

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (www.omim.org)

Portée par les données de nos études cliniques, notre démarche s'est donc attachée à rechercher des mutations dans 16 gènes candidats (Tableau 2-13), puis des variants rares par l'analyse de trios familiaux. Sur la base de nos résultats, nous avons formulé l'hypothèse que les parents sont porteurs d'un ou de plusieurs variants alléliques ayant un effet modéré, expliquant un phénotype parental moins sévère. Une fois hérités des deux parents, les variants auraient un effet plus fort

chez l'enfant, expliquant une altération plus sévère de la conduction cardiaque. Ce mode de transmission est en faveur d'un modèle de type oligogénique ou polygénique.

Dix-neuf variants *de novo* ont pu être identifiés. Parmi eux, deux apparaissent particulièrement intéressants : *RYR2*-p.R3454H et *GJC1*-p.R75H.

Le gène *RYR2* joue un rôle dans la signalisation calcique et dans le couplage excitation-contraction au niveau des cardiomyocytes. Localisé à la membrane du réticulum sarcoplasmique, ce canal est responsable du relargage du calcium dans le cytoplasme en réponse à une entrée de calcium dans la cellule par les canaux calciques voltage-dépendants de type L. Des mutations dans ce gène sont associées à diverses cardiopathies telles que les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques [Laitinen *et al*, 2001; Priori *et al*, 2001], le syndrome du QT long [Tester *et al*, 2005], les dysplasies arythmogènes du ventricule droit [Tiso *et al*, 2001], les dysfonctions des nœuds sinusal et atrioventriculaire, les fibrillations atriales, les paralysies atriales et les cardiomyopathies dilatées [Bhuiyan *et al*, 2007]. Le variant *RYR2*-p.R3454H intervient en dehors des trois domaines dans lesquels les variants identifiés chez des patients atteints de tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques se concentrent [Postma *et al*, 2005]. De nouvelles mutations de ce gène pourraient altérer les mécanismes de la libération de Ca^{2+} , notamment pendant la phase 2 du potentiel d'action. Ceci pourrait réguler (positivement en cas de gain de fonction ou négativement en cas de perte de fonction) l'activité de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} , dont le but est de permettre l'entrée d'ions Na^+ afin de diminuer la concentration [Ca^{2+}] au niveau du cytoplasme, et jouer sur la durée du potentiel d'action. Un gain de fonction augmenterait la concentration [Ca^{2+}] cytoplasmique, augmenterait également le courant net entrant dépolarisant et ralentirait davantage la repolarisation en impliquant des post-dépolarisations retardées (DAD, 'Delayed After Depolarization'). Au contraire, une perte de fonction pourrait induire une repolarisation précoce.

Le gène *GJC1* code lui pour la connexine 45 (Cx45) qui est principalement exprimée au niveau des jonctions nodales ainsi qu'au niveau du faisceau de His et de ses branches. Plusieurs hypothèses physiopathologiques peuvent être avancées. En effet, il a été montré que les jonctions-gap jouaient un rôle très important dans la croissance et le développement du système de conduction. La délétion des gènes des connexines non seulement affecte leur fonction cardiaque spécifique mais induit également des altérations développementales [van Veen *et al*, 2001]. Dans une étude, les souris Cx45 KO mourraient *in utero* et le cœur embryonnaire était dilaté à cause d'un défaut dans le développement vasculaire [Kruger *et al*, 2000]. Une autre étude a montré l'apparition de blocs atrioventriculaires pendant les 24 premières heures au cours desquelles ces cœurs en développement se contractent *in utero* [Kumai *et al*, 2000]. La première

hypothèse, développementale, consiste à dire qu'un variant hétérozygote dans le gène de la Cx45 pourrait donc altérer le développement cardiaque *in utero* du patient et induire des malformations du tissu de conduction se traduisant par l'apparition de BAV congénitaux. Une seconde hypothèse électrophysiologique se base sur ce qui a été décrit pour la connexine 40 codée par *GJA5* [article #6: Makita *et al*, 2012]. Un variant dans le gène de la Cx45 pourrait affecter les propriétés des canaux Cx45 en altérant leur capacité à former des jonctions-gap de faible résistance entre cellules, modulant ainsi plus ou moins la propagation des potentiels d'action entre cellules en fonction du nombre de sous-unités mutées dans chaque jonction-gap. Cette hypothèse est soutenue par une étude récente qui a montré que des souris adultes, Cx45 KO induites, présentaient une conductivité atrioventriculaire altérée [Frank *et al*, 2012]. Les deux hypothèses formulées ne s'excluent pas et se complètent même. L'hypothèse électrophysiologique expliquerait l'apparition des BAV tandis que l'hypothèse développementale expliquerait la précocité de l'apparition des TdC dans la vie des patients et donc le caractère congénital de la pathologie.

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

Au moins un variant *de novo* a été identifié et validé pour chaque trio exceptés les trios 5, 12 et 13, soulignant la nécessité d'envisager d'autres modes d'apparition de la pathologie. Dans le cadre de la recherche de variants hétérozygotes composites, la sélection des variants réalisée est totalement subjective. Des études approfondies sont nécessaires. Néanmoins, plusieurs voies peuvent également être proposées. Ainsi, on observe des patients hétérozygotes composites pour des variants intervenant dans des gènes codant des canaux ioniques, décrits (*TRPM4*) ou non (*TRPM1*, *CACNA1I*, *SCN7A*), dans des gènes intervenant dans des processus développementaux (*FBN3*, *NOTCH1*), dans des gènes jouant un rôle dans l'adhésion et la jonction intercellulaire (*DST*, *FAT1*, *NOTCH1*, *ITGA2*). On observe également des variants hétérozygotes composites dans des gènes codant pour des sous-unités de collagène (*COL15A1*, *COL16A1*, *COL18A1*, *COL2A1*, *COL5A3*, *COL6A5*). La régulation du collagène semble particulièrement importante afin de garantir une conduction normale au niveau du tissu de conduction. Une fibrose excessive est effectivement associée à des troubles de la conduction [Lenègre *et al*, 1963; Lenègre *et al*, 1964; Lev *et al*, 1964]. Des variants dans ces gènes ayant un effet gain de fonction pourraient induire des troubles de conduction. Même si les résultats ne sont encore que préliminaires, l'existence de

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

Perspectives. Une limite de notre approche est que l'utilisation de trios implique un trop faible nombre de cas pour pouvoir conclure sur la causalité de ces variants. C'est pourquoi les gènes candidats ainsi identifiés seront testés à l'aide de la technologie HaloPlex sur l'ensemble de notre cohorte de BAV congénitaux et de l'enfance colligée dans l'étude #4. Un nouveau kit contenant ces gènes est en cours de conception et des tests d'enrichissement pourront aussi être appliqués. Des études fonctionnelles seront ensuite réalisées pour les gènes candidats. Parallèlement le recrutement de nouveaux cas de BAV congénitaux et de l'enfance est essentiel afin d'agrandir la cohorte. Cela permettrait éventuellement d'envisager d'identifier par séquençage NGS de nouveaux gènes candidats et de nouveaux variants à tester en fonctionnel, de réaliser des tests statistiques d'enrichissement voire de réaliser une étude d'association génome entier (GWAS).

L'hypothèse d'hétérozygotie composite semble plausible et plusieurs articles vont dans ce sens [Bezzina *et al*, 2003; Baruteau *et al*, 2012b]. Le seuil de fréquence de 10 % choisi semble trop élevé et de nouvelles analyses avec un seuil abaissé à 5 % ont été lancées pour limiter le nombre de candidats à explorer. Cette pathologie présente une fréquence d'un cas toutes les 20 000 naissances environ [Michaelsson *et al*, 1972]. Une manière de filtrer cette liste serait de calculer le produit des fréquences de chaque couple de variants identifié. Cela permettrait d'éliminer les couples dont la fréquence de coappartition serait supérieure à ce seuil. Nous n'avons, de plus, recherché que deux variants intervenant dans le même gène. Deux variants causaux pourraient en effet intervenir dans deux gènes différents, soit sur le même chromosome, soit sur des chromosomes différents. L'analyse de l'ensemble des combinaisons possibles risque d'être fastidieuse mais nous pourrions commencer par rechercher des couples de variants hétérozygotes éloignés d'un certain nombre maximum de paires de base. Dans ces analyses, nous n'avons envisagé que les hypothèses monogénique (recherche de variant *de novo*) et digénique (recherche de variants suivant l'hypothèse d'hétérozygotie composite). L'existence de modèles épistasiques plus complexes, polygéniques n'est pas exclue et il faudra également explorer cette piste [Baruteau *et al*, 2012b].

Chez l'adulte, le dépistage génétique des patients ayant des troubles de conduction nécessite un haut degré de suspicion et la recherche systématique de mutations n'est aujourd'hui pas recommandée dans la mesure où les quelques gènes identifiés ne permettent pas une stratification du risque, à l'exception des mutations *LMNA* dans la cardiomyopathie dilatée. La recherche de mutations *NKX2.5* peut s'envisager chez les malades ayant des troubles de

conduction et une cardiopathie congénitale. Le séquençage de *SCN5A* et *TRPM4* ne peut quant à lui s'envisager que si le pedigree familial est clairement en faveur d'une transmission autosomique dominante de troubles de conduction isolés.

Chez l'enfant en définitive, nous avons mis en évidence une forte héritabilité du BAV isolé et non-immun. Les déterminants génétiques sont en cours d'exploration et encore mal compris. Le substrat physiopathologique semble complexe et possiblement multifactoriel, combinant des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. Les données du dépistage parental ne sont pas en faveur d'une transmission monogénique. Le mode de transmission semble être davantage de type oligogénique ou même polygénique et les travaux de recherche en cours visant à identifier des variants rares apporteront certainement des données très intéressantes pour comprendre la physiopathologie de cette forme rare de troubles de conduction en pédiatrie.

**CHAPITRE 4: ÉTUDE DES TROUBLES DE CONDUCTION ET DES RELATIONS
GÉNOTYPE-PHÉNOTYPE CHEZ LES ENFANTS PORTEURS D'UNE
MUTATION DU GÈNE SCN5A**

I- INTRODUCTION

Le gène *SCN5A* (3p22.2, 28 exons) code pour la sous-unité alpha du canal sodique cardiaque Nav1.5 voltage-dépendant. L'activation de Nav1.5 est responsable du courant sodique entrant dépolarisant qui initie la phase de dépolarisation initiale rapide du potentiel d'action [Remme *et al*, 2013]. Nav1.5 est fortement exprimé dans le système de conduction cardiaque et dans les régions du noeud sinusal et du noeud atrioventriculaire [Monfredi *et al*, 2010]. Ce canal sodique régit l'amplitude et la pente de la phase 0 du potentiel d'action cardiaque et influe ainsi sur la vitesse de conduction. Avec les jonctions communicantes permettant une communication intercellulaire, Nav1.5 joue un rôle majeur dans la vitesse de propagation de l'influx électrique *via* le système de conduction cardiaque [Remme *et al*, 2013]. Des mutations du gène *SCN5A* ayant un effet perte ou gain de fonction de Nav1.5 modifient les propriétés électrophysiologiques des cardiomyocytes en modulant le courant sodique I_{Na} [Veerman *et al*, 2015]. Plus de 300 mutations du gène *SCN5A* sont répertoriées, causant une dysfonction du canal sodique cardiaque responsable de troubles de conduction et d'un grand nombre d'arythmies héréditaires, avec des phénotypes modulés par une pénétrance incomplète et une expressivité variable [Abriel *et al*, 2010; Wilde *et al*, 2011]. Le spectre phénotypique est large, allant du porteur sain asymptomatique à la mort subite inaugurale par arythmie ventriculaire. Il comprend le syndrome de Brugada (MIM 601144), le syndrome du QT long congénital de type 3 (MIM 603830), la dysfonction sinusale congénitale ou maladie du noeud sinusal congénitale (MIM 608567), la paralysie atriale (MIM 108770), les troubles de conduction progressifs héréditaires ou maladie de Lev-Lenègre héréditaire (MIM 113900), la fibrillation atriale familiale (MIM 614022), la cardiomyopathie dilatée (MIM 601154), la fibrillation ventriculaire idiopathique (MIM 603829) et la susceptibilité à la mort subite du nourrisson (MIM 272120).

Si l'exploration moléculaire, génétique et clinique des canalopathies cardiaques est une thématique de recherche de nombreux groupes dans le monde, très peu d'informations sont disponibles à ce jour concernant la population pédiatrique, du fait de la très faible prévalence de ces maladies rythmiques héréditaires chez l'enfant [Priori *et al*, 2013; Crosson *et al*, 2015]. Il existe pourtant des spécificités pédiatriques de ces phénotypes [Probst *et al*, 2007; Chockalingham *et al*, 2012] et donc un réel besoin pour le clinicien de mieux caractériser le mode de présentation et l'histoire naturelle de ces pathologies chez le nourrisson, l'enfant et l'adolescent, afin de pouvoir mieux apprécier le risque rythmique et définir une prise en charge adaptée.

Après un rappel sur le canal sodique et la variabilité du spectre phénotypique associé aux mutations *SCN5A*, ce chapitre présente une étude multicentrique internationale ayant eu pour

objectif d'étudier les troubles de conduction et de mieux définir les relations génotype-phénotype chez les enfants porteurs d'une mutation *SCN5A*.

II- RAPPELS CONCERNANT LES CANALOPATHIES *SCN5A*

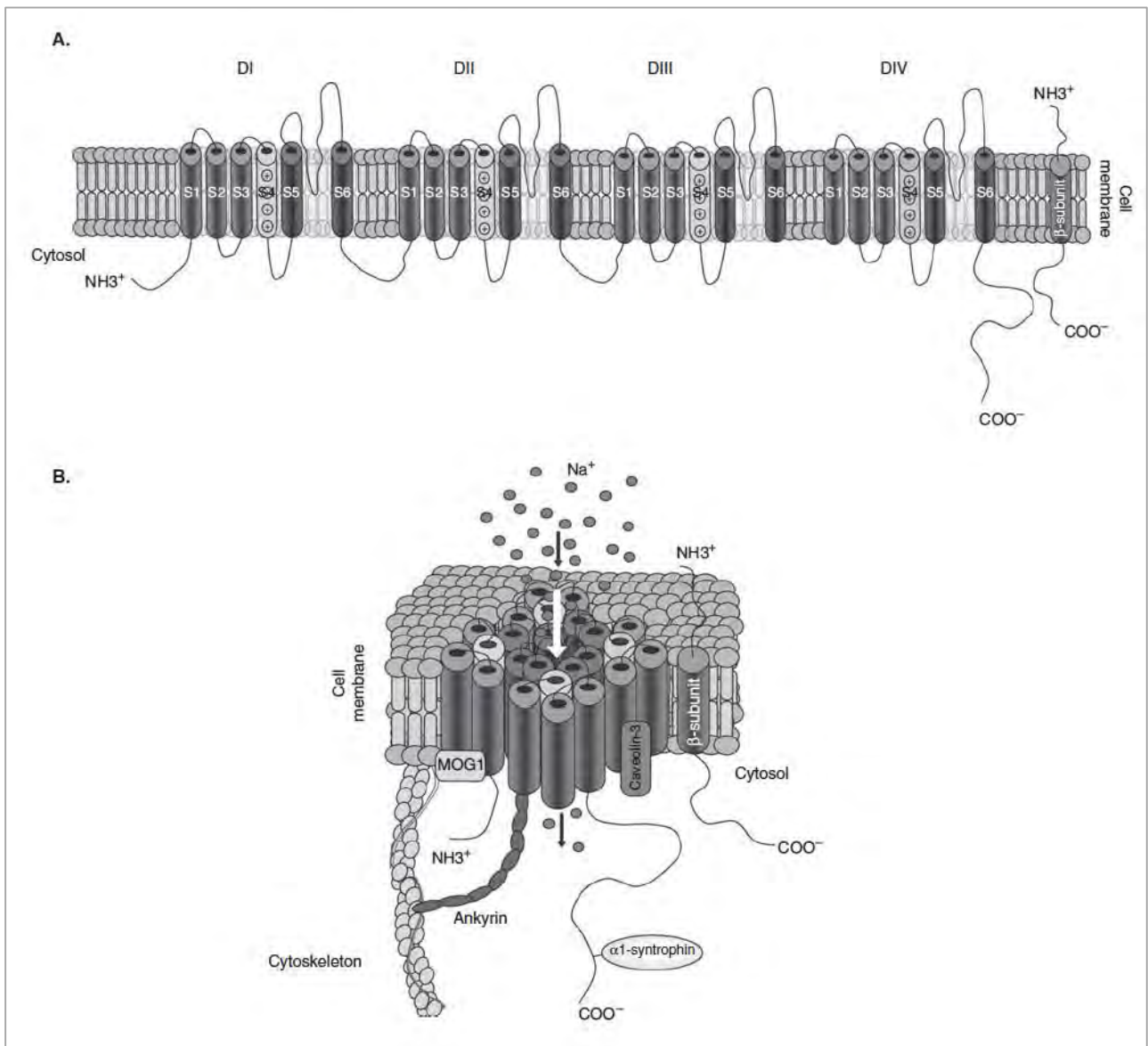
II.1- CANAL SODIQUE CARDIAQUE ET COURANT SODIQUE

Le canal sodique cardiaque voltage-dépendant Nav1.5 est une protéine canalaire transmembranaire, la sous-unité alpha (220 kDa), associée à des protéines ancillaires, les sous-unités beta (30-40 kDa) et un macrocomplexe de protéines d'interaction [Abriel *et al*, 2015]. La sous-unité alpha de Nav1.5 est formée par un domaine intracytoplasmique N-terminal, quatre domaines homologues (D-I à D-IV), chacun étant constitué de six segments transmembranaires (S1-S6) reliés entre eux par des boucles intracytoplasmiques, et un domaine intracytoplasmique C-terminal (Figure 4-1). Le repliement des quatre domaines permet la formation d'un canal sélectif des ions sodium, dont l'ouverture est dépendante de la différence de potentiel entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. L'activation du canal (ouverture du pore) est permise grâce aux quatre segments transmembranaires S4 chargés positivement. Le canal est ensuite capable de s'inactiver grâce à la porte d'inactivation formée de trois acides amines hydrophobes (isoleucine, phénylalanine, méthionine ou motif "IFM") située dans la boucle reliant les domaines D-III et D-IV. Le domaine C-terminal est également impliqué dans le processus d'inactivation et permet de maintenir le canal fermé [Remme *et al*, 2013].

La répartition du canal sodique voltage-dépendant n'est pas homogène dans le myocarde: celui-ci est faiblement exprimé voire absent du noeud sinusal et du noeud atrioventriculaire, mais en quantité abondante dans le tronc du faisceau de His, ses branches et le réseau des fibres de Purkinje [Remme *et al*, 2009].

Le fonctionnement des canaux sodiques en conditions physiologiques et pathologiques (dû à une mutation à effet perte ou gain de fonction) est illustré dans les figures 4-2 et 4-3.

Figure 4-1: Canal sodique cardiaque et son complexe macromoléculaire

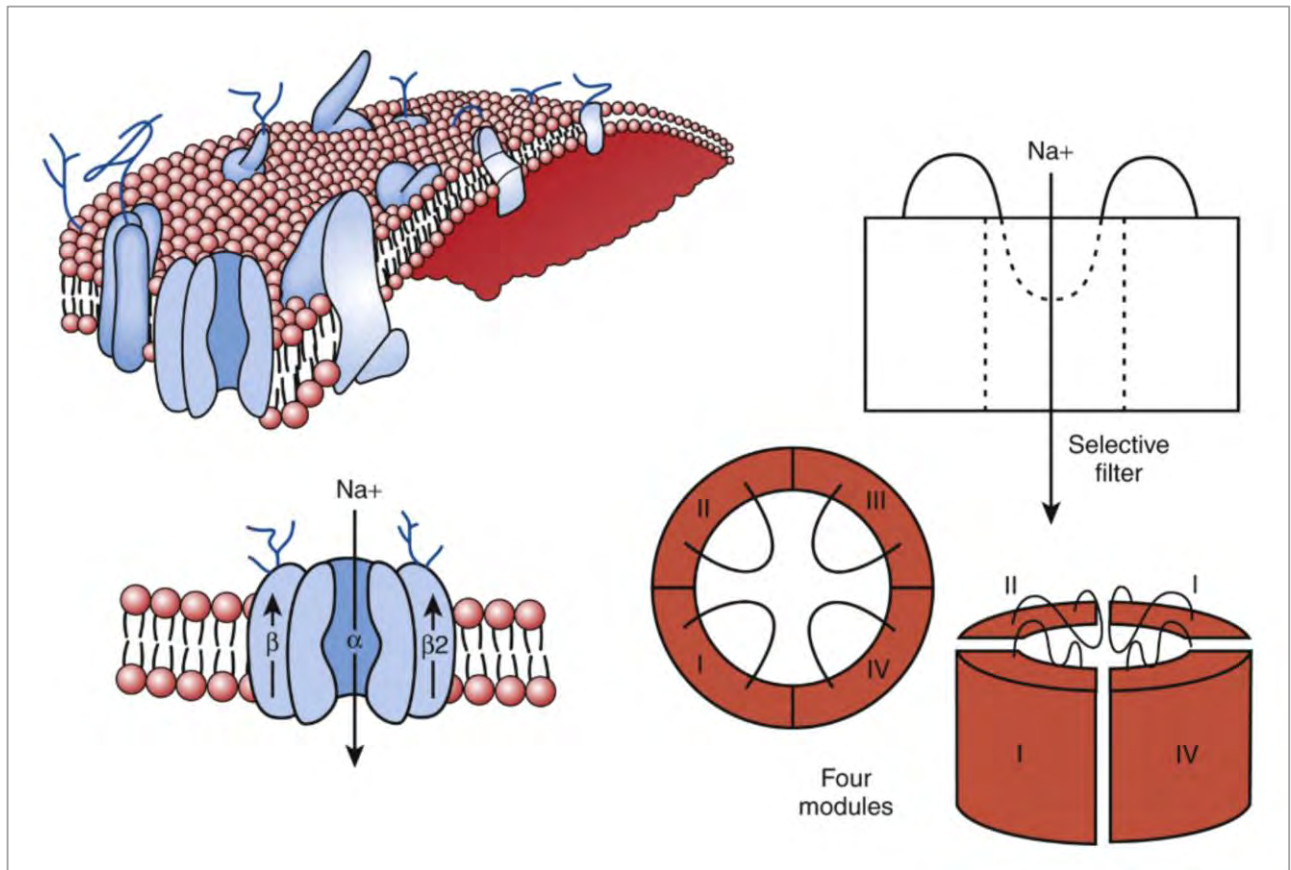


La sous-unité alpha du canal sodique Nav1.5 fait partie d'un complexe macromoléculaire de protéines d'interaction, telles que sa sous-unité beta, la syntrophine, MOG1 ou la cavéoline-3.

CaMKII: calmodulin-dependent protein kinase II; MOG1: multicopy suppressor of gsp1; FGF13: fibroblast growth factor like 13; Nedd4-like: neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4-2 like ubiquitin ligase; CAR: coxsackie and adenovirus receptor; Desmogl-2: desmoglein-2; SIV: serine-isoleucine-valine. Sur la figure du haut, seules deux des quatre sous-unités beta du canal sodique est représentée, sur celle du bas, seule une des quatre est représentée.

Adapté de [van Hoeijen et al, 2014; Abriel et al, 2015]

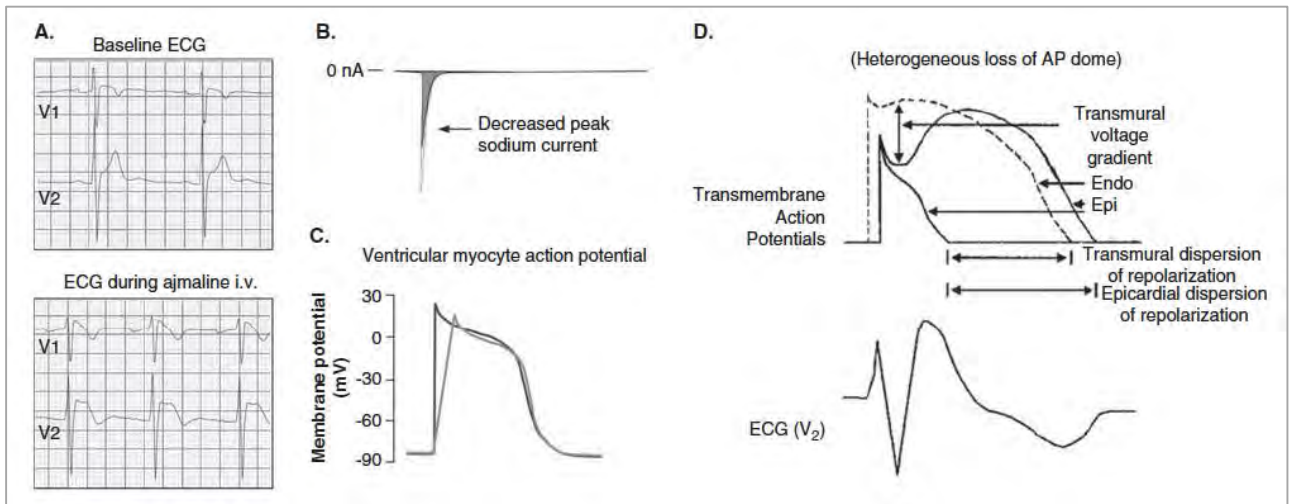
Figure 4-2: Représentation du canal sodique



Le canal sodique cardiaque voltage-dépendant Nav1.5 est une protéine canalaire transmembranaire, la sous-unité alpha, associée à des protéines ancillaires, les sous-unités beta et un macrocomplexe de protéines d'interaction. La sous-unité alpha comprend quatre domaines homologues transmembranaires (D-I à D-IV), dont le repliement permet la formation d'un canal sélectif des ions sodium, dont l'ouverture est dépendante de la différence de potentiel entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule.

Adapté de [Issa et al, 2012]

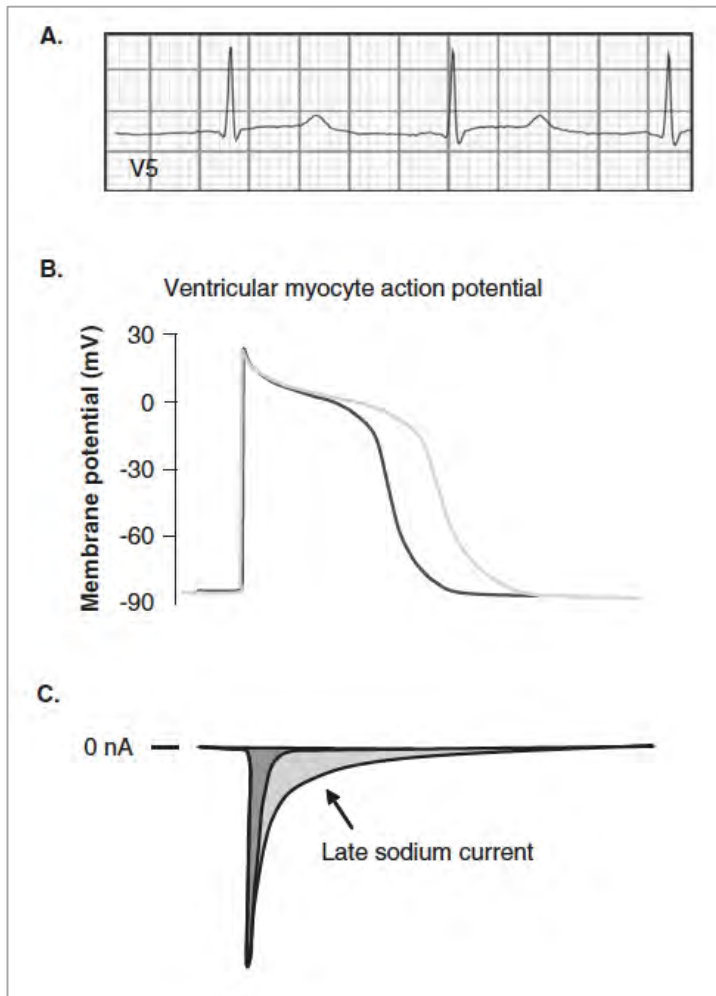
Figure 4-3 Fonctionnement du canal sodique en conditions pathologiques: effets électrophysiologiques d'une mutation *SCN5A* perte de fonction



(A): aspect de sus-décalage du segment ST de type 1 démasqué lors d'un test pharmacologique par un agent bloqueur des canaux sodiques (ajmaline) chez un patient porteur d'un syndrome de Brugada; (B): diminution du pic du courant sodique entrant due à une mutation *SCN5A* perte de fonction; (C): la réduction du pic de courant sodique induit une diminution de la vitesse de la phase 0 du potentiel d'action ventriculaire; (D): le gradient de voltage transmural et la perte du dome du potentiel d'action dans l'épicaarde mais pas dans l'endocarde pourrait expliquer l'aspect en dome (type 1) du sus-décalage du segment ST dans le syndrome de Brugada.

Adapté de [van Hoesjen et al, 2014; Veerman et al, 2015]

Figure 4-4: Fonctionnement du canal sodique en conditions pathologiques: effets électrophysiologiques d'une mutation SCN5A gain de fonction



(A): Augmentation de la durée de l'intervalle QT corrigé chez un patient porteur d'un syndrome du QT long congénital type 3;

(B): l'allongement de l'intervalle QT corrigé résulte d'une repolarisation plus tardive du potentiel d'action ventriculaire;

(C): une inactivation plus lente du canal sodique (due à la mutation SCN5A) donne lieu à un courant sodique tardif.

Adapté de [van Roeyen et al, 2014; Veerman et al, 2015]

II.2- SYNDROMES ET PHÉNOTYPES ASSOCIÉS AUX MUTATIONS SCN5A

En modifiant les propriétés fonctionnelles de Nav1.5, de nombreuses mutations du gène *SCN5A* peuvent conduire à un spectre phénotypique varié comprenant différentes anomalies du rythme et/ou de la conduction cardiaque (Tableau 3-1). Bien qu'associés à des mutations au sein du même gène, ces maladies ou syndromes se distinguent par des caractéristiques phénotypiques propres.

Tableau 4-1: Principales pathologies et phénotypes associés à des mutations dans *SCN5A*

| OMIM | Pathologie - phénotype | Mise en évidence |
|--------|--|--|
| 603830 | Syndrome du QT long congénital | Analyses de liaison et études fonctionnelles |
| 601144 | Syndrome de Brugada | Approche gène candidat, cosegrégation, études fonctionnelles |
| 113900 | Troubles de conduction | Analyses de liaison et études fonctionnelles |
| 608567 | Maladie du noeud sinusal | Approche gène candidat |
| 614022 | Fibrillation atriale familiale | Approche gène candidat |
| 601154 | Cardiomyopathie dilatée | Analyses de liaison |
| 603829 | Fibrillation ventriculaire familiale | Approche gène candidat |
| 272120 | Susceptibilité à la mort subite du NRS | Approche gène candidat |
| 613601 | Syndrome de repolarisation précoce | Approche gène candidat |
| - | Multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions (MEPPC) | Approche gène candidat |
| 108980 | Modulation de la durée de l'intervalle PR | Etude d'association pangénomique |
| 108980 | Modulation de la durée du complexe QRS | Etude d'association pangénomique |
| 610141 | Modulation de la durée de l'intervalle QTc | Etude d'association pangénomique |

Le syndrome du QT long de type 3 (LQT3; OMIM 603830). Le syndrome du QT long (LQTS) se définit par un allongement de l'intervalle QT corrigé sur l'électrocardiogramme et un risque accru de torsades de pointes et de mort subite par tachyarrhythmie ventriculaire (Figures 4-5 et 4-6). La prévalence du LQTS est estimée à 1 pour 2000 [Schwartz et al, 2009].

Figure 4-5: Syndrome du QT long congénital compliqué d'une torsade de pointes



Un LQTS est diagnostiqué en présence [Piori *et al*, 2015; Schwartz *et al*, 1993]:

a/ d'un intervalle QT corrigé ≥ 480 ms sur plusieurs tracés ou d'un score de Schwartz >3 ou d'une mutation génétique connue pour être associée au LQTS, indépendamment de la durée de l'intervalle QT (recommandation de classe I, niveau de preuve C);

b/ d'un intervalle QT corrigé ≥ 460 ms sur plusieurs tracés, sans autre cause d'allongement du QT et chez un patient ayant présenté une syncope inexpiquée (recommandation de classe IIa, niveau de preuve C);

Tableau 4-2: Différents types de syndromes du QT long congénital et substrat génétique

| LQTS | Gène | Locus | Fréquence | Protéine | Courant |
|---|-----------|---------------|-----------|-----------------------------|---|
| LQTS de transmission AD isolé (Syndrome de Romano-Ward) | | | | | |
| LQT1 | KCNQ1 | 11p15.5 | 30-35% | Kv7.1 | I_{Ks} ↓ |
| LQT2 | KCNH2 | 7q36.1 | 20-25% | Kv11.1 | I_{Kr} ↓ |
| LQT3 | SCN5A | 3p21 | 5-10% | Nav1.5 | I_{Na} ↑ |
| LQT4 | Ankyrin-B | 4q25-q27 | 1-2% | Ankyrin | I_{Na} ↑ I_{Ca} ↑ |
| LQT5 | KCNE1 | 21q22.12 | 1% | MinK | I_{Ks} ↓ |
| LQT6 | KCNE2 | 21q22.12 | Rare | MiRP1 | I_{Kr} ↓ |
| LQT9 | CAV3 | 3p25 | Rare | Caveolin3 | I_{Na} ↑ |
| LQT10 | SCN4B | 11q23.3 | Rare | Sous-unité SCN β 4 | I_{Na} ↑ |
| LQT11 | AKAP-9 | 7q21-q22 | Rare | Yatiao | I_{Ks} ↓ |
| LQT12 | SNTA1 | 20q11.2 | Rare | Syntrophin- α 1 | I_{Na} ↑ |
| LQT13 | KCNJ5 | 11q23.3-24.3 | Rare | Kir3.4 | I_{KACh} ↓ |
| LQT14 | CALM1 | 14q32.11 | Rare | Calmodulin1 | Anomalie de signalisation du Ca^{2+} |
| LQT15 | CALM2 | 2p21 | Rare | Calmodulin2 | |
| LQTS de transmission AD avec manifestations extracardiaques | | | | | |
| LQT7 | KCNJ2 | 17q23.1-q24.2 | Rare | Kir2.1 | I_{K1} ↓ |
| LQT8 | CACNA1C | 12p13.3 | Rare | CaV1.2 | I_{Ca} ↑ |
| LQTS de transmission AR (Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen) | | | | | |
| JLN1 | KCNQ1 | 11p15.5 | Rare | Kv7.1 | I_{Ks} ↓ |
| JLN2 | KCNE1 | 21q22.12 | Rare | MinK | I_{Ks} ↓ |

AD/AR: autosomique dominant/récessif; LQT7: Anderson-Tawil syndrome; LQT8: Timothy syndrome.

Adapté de [Nakano *et al*, 2015; Shimizu *et al*, 2013; Obeyesekere *et al*, 2015]

Le LQTS congénital existe sous trois formes (Tableau 4-2):

1- le syndrome de Romano-Ward, forme la plus fréquente (plus de 95% des cas), est à transmission autosomique dominante, sans manifestations extra-cardiaques. Il s'agit des LQT1 à LQT6 et des LQT9 à LQT15 [Nakano *et al*, 2015; Romano *et al*, 1963; Ward *et al*, 1964];

2- une seconde forme, très rare, associe LQTS de transmission autosomique dominante et manifestations extracardiaques. Il s'agit du syndrome d'Andersen-Tawil (ou LQT7) qui associe allongement de l'intervalle QT corrigé avec présence d'une onde U prédominante, accès de tachycardie ventriculaire bidirectionnelle ou polymorphe, dysmorphie faciale et paralysies périodiques hyper/hypokaliémiques [Boczek *et al*, 2015; Bloise *et al*, 2007]; et du syndrome de Timothy (ou LQT8) qui comprend un allongement de l'intervalle QT corrigé, des malformations cardiaques, une syndactylie, une dysmorphie et des traits de comportement autistique [Plaster *et al*, 2001];

3- Enfin le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen, très rare également, est à transmission autosomique récessive et associe allongement du QT corrigé et surdité congénitale [Schwartz *et al*, 2006; Jervell et Lange-Nielsen, 1957].

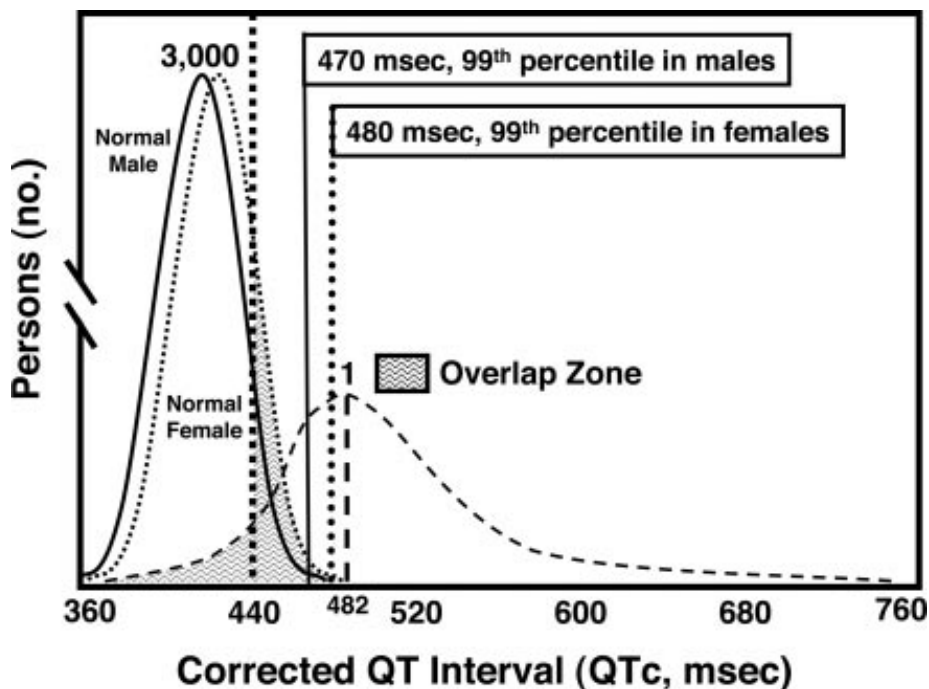
A ce jour des mutations dans 13 gènes ont été associées au syndrome de Romano-Ward, prolongeant la durée du potentiel d'action en diminuant le courant potassique (mutation perte de fonction) ou en augmentant le courant sodique ou le courant calcique (mutation gain de fonction) ce qui conduit à l'allongement de la durée de l'intervalle QT corrig e sur l'électrocardiogramme de surface. Trois gènes majeurs (KCNQ1 pour le LQT1, KCNH2 pour le LQT2 et SCN5A pour le LQT3) contribuent à 70 à 80% des cas de patients LQTS génotypés [Napolitano *et al*, JAMA 2005; Shimizu *et al*, Circ J 2008]. Le LQT3 représente 5 à 10% de ces cas [Ackerman *et al*, 2011].

Le LQT3 est associ e à des mutations gain de fonction du gène *SCN5A* [Wang *et al*, 1995]. Les patients porteurs d'un LQT3 ont souvent une bradycardie relative et présentent des arythmies ventriculaires pr eferentiellement durant des phases de fréquence cardiaque lente, c'est-à-dire au cours du repos ou du sommeil [Schwartz *et al*, 2001; Schwartz *et al*, 2006]. Compar e aux autres types de LQTS, les patients LQT3 sont expos es à un risque  lev e de mort subite, et l' v nement inaugural de la maladie est souvent un arrêt cardiaque (et non une syncope) [Zareba *et al*, 2001; Schwartz *et al*, 2001]. La majorité des mutations *SCN5A* associées au LQT3 induisent un défaut d'inactivation de Nav1.5 qui induit un courant sodique I_{Na} persistant (tardif) durant la phase de plateau du potentiel d'action: il s'agit d'un effet gain de fonction [Bennett *et al*, 2001]. La prolongation du potentiel d'action et une repolarisation retardée peuvent induire des post-dépolarisations précoces qui peuvent déclencher des torsades de pointes. Plus rarement des mutations *SCN5A* sont associées au LQT3 via un ralentissement de l'inactivation du pore canalaire (l'ouverture du canal sodique est plus longue), une récupération plus rapide de l'inactivation (plus de canaux sodiques sont disponibles) et donc une augmentation du courant sodique [Wedekind *et al*, 2001; Clancy *et al*, 2003].

La mort subite cardiaque est la manifestation inaugurale de la maladie chez 12% des patients et pour 4% d'entre eux, celle-ci survient au cours de la première année de vie [Schwartz *et al*, 2002].

Les survivants d'un arrêt cardiaque au cours de la première année de vie ont un sur-risque majeur de récurrence d'arrêt cardiaque au cours des dix premières années [Spazzolini et al, 2009]. Les survivants d'un arrêt cardiaque récupéré ont un risque élevé de récurrence, estimé à 14% à 5 ans malgré un traitement bêta-bloquant bien conduit [Moss *et al*, 2000]. Les enfants/adolescents porteurs d'un LQTS qui ont eu une ou deux syncope(s) ont respectivement 6 à 12 fois plus de risque de présenter un arrêt cardiaque, indépendamment de la durée de l'intervalle QT [Liu *et al*, 2011]. Même s'il existe un score diagnostique (Tableau 4-3), le diagnostic et la stratification du risque rythmique dans le LQTS sont rendus difficiles par: a/ une faible pénétrance, ce qui signifie qu'un certain nombre de patients porteurs de la mutation ont un phénotype sain avec un intervalle QT corrigé normal; b/ une proportion élevée (environ 30%) de cas de LQTS dus à des mutations *de novo*, donc en présence d'apparentés sains et d'une histoire familiale non informative; c/ dans une certaine mesure un chevauchement des valeurs d'intervalle QT normales et pathologiques, réalisant une "zone grise" au sein de laquelle le diagnostic ne peut être posé avec certitude, nécessitant la répétition des ECG, et une évaluation complémentaire par des enregistrements Holter-ECG 24h, des tests d'effort et/ou des tests pharmacologiques (Figure 4-6) [Taggart *et al*, 2007; Priori *et al*, 1999].

Figure 4-6: Distribution des valeurs de QT corrigé chez les sujets sains et chez les sujets atteints de LQTS



Adapté de [Taggart *et al*, 2007].

Tableau 4-3: Score diagnostique du LQTS (score de Schwartz)

| | Points |
|---|---------------|
| Données ECG (a) | |
| Intervalle QTc (b) \geq 480 ms | 3 |
| 460-479 ms | 2 |
| 450-459 ms (sexe masculin) | 1 |
| QTc \geq 480 ms à la 4e minute de récupération d'un test d'effort | 1 |
| Torsade de pointes (b) | 2 |
| Alternance de l'onde T | 1 |
| Notched T wave (3 dérivations) | 1 |
| FC repos $<$ 2 nd percentile pour l'âge | 0,5 |
| Données cliniques | |
| Syncope (b) en contexte de stress | 2 |
| sans stress | 1 |
| Surdité congénitale | 0,5 |
| Histoire familiale | |
| Apparenté atteint d'un LQTS documenté (c) | 1 |
| Mort subite inexplicée chez un apparenté du 1er degré avant l'âge de 30 ans (c) | 0,5 |

La correction du QT se fait par la formule de Bazett. (a) en l'absence d'autre cause médicamenteuse ou hydro-électrolytique; (b) s'excluent mutuellement; (c) un même apparenté ne peut pas être compté deux fois. Le score total indique la probabilité clinique de LQTS: \leq 1 point (probabilité faible), 1,5-3 (probabilité intermédiaire), \geq 3,5 (probabilité élevée).

Adapté de [Schwartz et al, 2013; Schwartz et al, 1993].

Cette approche est rendue encore plus incertaine en présence d'enfants suspects ou atteints d'un LQT3 (Figure 4-7). En effet, la faible prévalence de cette forme de LQTS et le nombre intimiste de publications rapportant des cas de mort subite du nourrisson associées à une mutation *SCN5A* ou des cas pédiatriques de LQT3 [Schwartz et al, 2001; Wang et al, 2008] apportent peu d'éléments sur les spécificités pédiatriques de cette pathologie.

Outre les mesures générales (contre-indication des médicaments allongeant le QT et correction des éventuels troubles hydro-électrolytiques), la stratégie thérapeutique des patients LQT3 comprend:

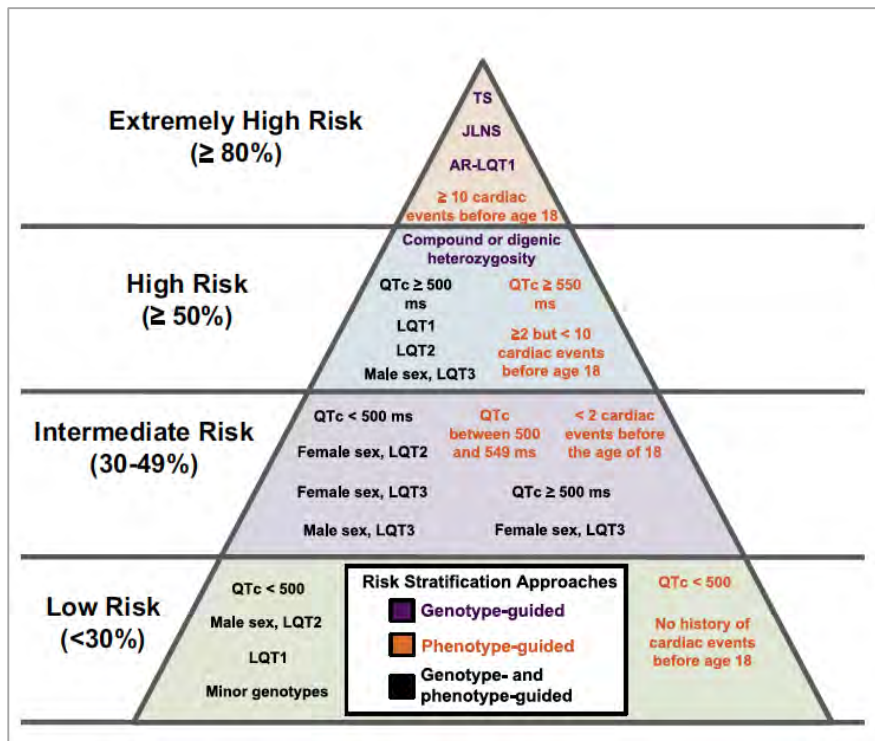
- a/ les bêta-bloquants en présence d'un diagnostic clinique de LQTS (recommandation I-B), ou chez les patients porteurs d'une mutation mais ayant un ECG normal (recommandation IIa-B);
- b/ les bloqueurs des canaux sodiques (mexiletine, flecainide, lidocaine, ranolazine) en coprescription des beta-bloquants pour réduire la durée du QT corrigé chez les malades LQT3 ayant un intervalle QT corrigé $>$ 500 ms (recommandation IIb-C);
- c/ l'implantation d'un défibrillateur automatique chez les malades considérés à haut risque, c'est-à-dire en prévention secondaire après un arrêt cardiaque récupéré (recommandation I-B), une

syncope ou une tachycardie ventriculaire documentée malgré un traitement bêta-bloquant bien conduit (recommandation IIa-B) ou chez les patients mutés asymptomatiques ayant un intervalle QT corrigé > 500 ms (recommandation IIb-C);

d/ la sympathectomie (dénervation sympathique du coeur gauche), considérée chez les patients symptomatiques porteurs d'un LQTS, lorsque les bêta-bloquants sont inefficaces, mal tolérés ou contre-indiqués; lorsque l'implantation d'un défibrillateur automatique est contre-indiquée ou refusée; et en cas de nombreuses thérapies de défibrillation appropriées malgré un traitement bêta-bloquant bien conduit (recommandation IIa-C) [Priori *et al*, 2015; El Sherif *et al*, 2015; Morita *et al*, 2008].

Cependant, les bêta-bloquants pourraient ne pas être une approche pharmacologique idéale dans le LQT3, dans la mesure où les événements rythmiques surviennent essentiellement durant le repos ou le sommeil, et l'effet des bloqueurs des canaux sodiques pourrait être mutation-spécifique [Remme *et al*, 2013; Moss *et al*, 2008]. L'efficacité de ces traitements n'a pas été étudiée en détails du fait de la rareté du LQT3 et de la difficulté d'évaluation d'une possible réponse au traitement variant selon le génotype.

Figure 4-7: Stratification du risque basée sur le génotype et le phénotype dans le LQTS

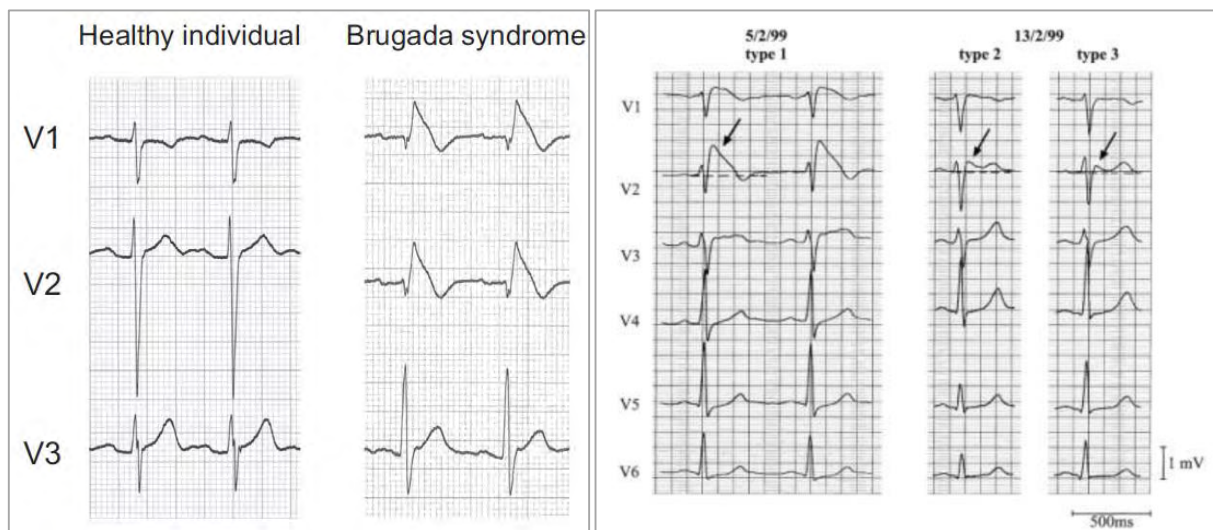


Les groupes à risque ont été définis par l'étude de la survenue d'un événement cardiaque (syncope, arrêt cardiaque ou mort subite) avant l'âge de 40 ans en l'absence de traitement.

Adapté de [Giudicessi *et al*, 2013; Priori *et al*, 2003].

Le syndrome de Brugada (BrS, 601144). Le syndrome de Brugada (BrS) est une maladie rythmique héréditaire décrite pour la première fois en 1992, caractérisée par un sus-décalage du segment ST dans les dérivations précordiales droites, la survenue d'arythmies ventriculaires et un risque de mort subite par tachycardie ventriculaire chez des individus jeunes (<40 ans), sans cardiopathie structurale et apparemment en bonne santé [Priori *et al*, 2015; Brugada *et al*, 1992]. La prévalence du BrS varie selon les études de 1 pour 1000 à 1 pour 10.000 [Fowler *et al*, 2009]. Ce syndrome pourrait être responsable de 5% des morts subites sur coeur sain de l'adulte [Mizusawa *et al*, 2012; Priori *et al*, 2002]. On sait cependant que la prévalence de ce syndrome est nettement plus élevée en Asie que dans les pays occidentaux. Chez l'enfant, la prévalence du BrS aux Etats-Unis et en Europe n'est pas connue. Estimée à partir d'un échantillon de 20.000 enfants japonais, la prévalence du BrS en pédiatrie serait de 0.0098% en Asie [Yamakawa *et al*, 2004].

Figure 4-8: Représentation des trois types ECG observés dans le syndrome de Brugada.



Adapté de [Watanabe *et al*, 2015; Mizusawa *et al*, 2012]

L'aspect ECG caractéristique (BrS type I) est une élévation du segment ST ≥ 2 mm dans au moins une dérivation précordiale droite parmi V1 ou V2, positionnée dans le second, le troisième ou le quatrième espace intercostal [Priori *et al*, 2013]. Trois types ECG sont différenciés suivant l'intensité du sus-décalage et la morphologie du segment ST (Figure 4-8). Le BrS type I se définit par un segment ST convexe, sus-décalé d'au moins 0.2 mV par rapport à la ligne isoélectrique et suivi d'une onde T négative. Le BrS type II est caractérisé 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 BrS type III quant-à-lui est

défini par un sus-décalage convexe ou en selle du segment ST de plus de 0.2 mV au point J puis de moins de 0.1 mV. Dans les BrS types II et III, l'onde T est positive [Antzelevitch *et al*, 2005]. L'aspect ECG de BrS type I est spontané ou peut être démasqué par un enregistrement Holter ECG des 24 heures lorsque le tonus vagal est élevé, en particulier en période nocturne ou en phase postprandiale [Shimeno *et al*, 2009; Ikeda *et al*, 2006], ou par l'administration en perfusion continue d'un anti-arythmique de classe 1A ou 1C bloqueur des canaux sodiques (ajmaline, flécaine, procainamide) [Miyazaki *et al*, 1996; Brugada *et al*, 2000; Wolpert *et al*, 2005]. Dans la plupart des cas, des troubles conductifs s'associent au phénotype [Kyndt *et al*, 2001; Antzelevitch *et al*, 2001].

Les mécanismes électrophysiologiques exacts responsables du sus-décalage du segment ST et de la survenue d'arythmies ventriculaires sont encore controversés. Cependant, étant donné que 20-30% des patients BrS sont porteurs d'une mutation *SCN5A* perte de fonction, et que l'aspect typique BrS type I peut être démasqué par un test thérapeutique utilisant un agent bloqueur des canaux sodiques, il est clair que le canal sodique Nav1.5 joue un rôle majeur dans la pathophysiologie de cette maladie [Lippi *et al*, 2012]. Cependant, en dépit d'une pénétrance incomplète, le diagnostic de BrS en l'absence d'une mutation familiale dans le gène *SCN5A* n'est pas rare, soulignant la complexité du substrat génétique dans cette pathologie [Probst *et al*, 2009].

Le BrS est une maladie rythmique héréditaire transmise sur un mode autosomique dominant et une pénétrance incomplète est fréquemment observée au sein des familles où ségrège le phénotype. A ce jour 20 gènes ont été associés au BrS, mais des mutations dans ces gènes ne sont identifiées que chez environ 30% des patients porteurs de ce syndrome [Watanabe *et al*, 2015]. Le substrat génétique comprend des mutations dans les gènes codant pour les canaux sodiques, les canaux calciques et les canaux potassiques ou pour des protéines régulant ces canaux. Les mutations *SCN5A* représentent environ 11 à 28% des cas de BrS génotypés, les mutations dans *SCN10A* environ 16% et les 18 autres gènes représentant environ 16% des patients (Tableau 4-4).

En règle générale les mutations *SCN5A* associées au BrS ont un effet perte de fonction induisant une diminution des canaux sodiques disponibles, soit par une altération de leur transport et de leur expression membranaire, soit par une altération de leurs propriétés fonctionnelles [Kapplinger *et al*, 2010]. La diminution du courant sodique s'accompagne d'une diminution de la vitesse de propagation du potentiel d'action, et donc à un allongement de la durée de l'intervalle PR et du complexe QRS sur l'ECG.

Tableau 4-4: Différents types de syndromes Brugada et substrat génétique

| Gène | Locus | Fréquence | Protéine | Courant | Type |
|---|--------------|-----------|--|--------------------------------|--------|
| Dysfonction des canaux sodiques | | | | | |
| SCN5A | 3p21 | 11-28% | Nav1.5 (sous-unité α) | I_{Na^+} ↓ | BrS-1 |
| SCN10A | 3p22.2 | 16.7% | Nav1.8 | I_{Na^+} ↓ | BrS-17 |
| SCN1B | 19q13.1 | 1.1% | Nav1.5 (sous-unité β 1) | I_{Na^+} ↓ | BrS-5 |
| SCN2B | 11q23 | Rare | Nav1.5 (sous-unité β 2) | I_{Na^+} ↓ | BrS-14 |
| SCN3B | 11q23.3 | Rare | Nav1.5 (sous-unité β 3) | I_{Na^+} ↓ | BrS-7 |
| GPD1L | 3p24 | Rare | G3PD1L | I_{Na^+} ↓ | BrS-2 |
| RANGRF | 17p13.1 | Rare | MOG1 | I_{Na^+} ↓ | BrS-11 |
| SLMAP | 3p21.2-p14.3 | Rare | Sarcolemmal membrane associated protein | I_{Na^+} ↓ | BrS-12 |
| PKP2 | 12p11 | Rare | Plakophilin-2 | I_{Na^+} ↓ | BrS-15 |
| FGF12 | 3q28 | Rare | FHAF1 | I_{Na^+} ↓ | BrS-16 |
| Dysfonction des canaux calciques | | | | | |
| CACNA1C | 12p13.3 | 6.6% | Cav1.2 (sous-unité α) | $I_{Ca^{2+}}$ ↓ | BrS-3 |
| CACNB2b | 10p12.33 | 4.8% | Cav1.2 (sous-unité β 2b) | $I_{Ca^{2+}}$ ↓ | BrS-4 |
| CACNA2D1 | 7q21.11 | 1.8% | Cav1.2 (sous-unité α 2 δ) | $I_{Ca^{2+}}$ ↓ | BrS-9 |
| Dysfonction des canaux potassiques | | | | | |
| KCNE3 | 11q13-14 | Rare | MiRP2 (sous-unité β) | I_{TO} ↑ | BrS-6 |
| KCNJ8 | 12p11.23 | 2% | Kir6.1 | I_{KATP} ↑ | BrS-8 |
| KCND3 | 1p13.2 | Rare | Kv4.3 (sous-unité α) | I_{TO} ↑ | BrS-10 |
| ABCC9 | 12p12.1 | Rare | SUR2A | I_{KATP} ↑ | BrS-13 |
| SEMA3A | 7p12.1 | Rare | Semaphorin | I_{TO} ↑ | BrS-19 |
| KCNH2 | 7q36.1 | Rare | hERG1 | I_{K^+} ↑ | |
| HCN4 | 15q24.1 | Rare | Hcn4 | I_{K^+} ↑ | |
| KCNE5 | Xq22.3 | Rare | MiRP4 (sous-unité β) | I_{K^+} ↑ | |
| Autre | | | | | |
| HEY2 | 6q | Rare | HEY2 (facteur de transcription) | I_{Na^+} ↓ | BrS-18 |
| TRPM4 | 19q13.33 | Rare | Trmp4 | Anomalie du potentiel de repos | |

Adapté de [Watanabe *et al*, 2015; Refaat *et al*, 2015; Obeyesekere *et al*, 2015]

Le BrS est 8 à 10 fois plus fréquent chez les hommes que chez les femmes [Antzelevitch *et al*, 2005] et il a été montré que le sexe masculin est associé à plus d'évènements rythmiques [Gehi *et al*, 2006]. Les évènements rythmiques et la mort subite surviennent préférentiellement au repos, au cours du sommeil ou lors d'une stimulation vagale [Antzelevitch *et al*, 2001]. Le BrS est typiquement une pathologie de l'adulte jeune, avec un âge moyen de fibrillation ventriculaire estimé à 41 ± 15 ans. Cependant la publication princeps contenait déjà 3 observations pédiatriques [Brugada *et al*, 1992] et d'autres cas chez des nourrissons ou de jeunes enfants – bien que rares – ont été publiés, témoignant du fait que le BrS pouvait également être diagnostiqué au décours d'une mort subite du nourrisson ou d'une syncope chez un enfant [Chockalingam *et al*, 2012; Probst *et al*, 2007; Skinner *et al*, 2007]. Un épisode fébrile et l'abus d'alcool sont à risque de

démasquer l'aspect BrS type I et de favoriser la survenue d'arythmies ventriculaires [Priori *et al*, 2002].

Outre les mesures générales (médicaments contre-indiqués, pas d'abus d'alcool, antipyrétiques en cas d'épisode fébrile ou de vaccination), la prise en charge thérapeutique du BrS s'articule autour de:

a/ l'implantation d'un défibrillateur automatique en prévention secondaire, pour les survivants d'un arrêt cardiaque récupéré ou pour les patients chez qui un accès de tachycardie ventriculaire soutenue a été documenté (recommandation I-C); pour les patients ayant un aspect type 1 spontané et un antécédent de syncope (recommandation IIa-C); et peut être considéré après induction d'une fibrillation ventriculaire lors d'une stimulation ventriculaire programmée avec 2 ou 3 extrastimuli à 2 sites distincts (recommandation IIb-C);

b/ un traitement par quinidine (agent bloqueur du courant I_{TO}) ou isoproterenol (agent augmentant le courant calcique entrant) en cas d'orage électrique (recommandation IIa-C);

c/ un traitement par quinidine chez les patients qui refusent ou présentent une contre-indication à l'implantation d'un défibrillateur automatique et/ou chez ceux nécessitant un traitement pour une arythmie supraventriculaire (recommandation IIa-C);

d/ l'ablation peut être considérée chez les patients ayant un antécédent d'orage électrique ou recevant de nombreux chocs appropriés (recommandation IIb-C) [Priori *et al*, 2015; El Sherif *et al*, 2015; Obeyesekere *et al*, 2015].

Dans une série multicentrique de 220 patients BrS adultes implantés d'un défibrillateur automatique suivis pendant 38 ± 27 mois, aucun patient n'était décédé et seuls 8% avaient reçu des thérapies appropriées, alors que 28% avaient expérimenté des complications liées à l'appareillage, dont 20% de chocs inappropriés (2.5 fois plus fréquents que les chocs appropriés) dus à une dysfonction de sonde, une surdétection de l'onde T, une tachycardie sinusale ou une tachycardie supraventriculaire [Sacher *et al*, 2006]. Ces données incitent à être très prudents sur les indications d'implantation de défibrillateur automatique (en particulier endocavitaires) chez l'enfant, car on sait que plus le patient est jeune, plus il est à risque de chocs inappropriés et de complications liées à la prothèse électrique [DeWitt *et al*, 2015].

Troubles de conduction progressifs (maladie de Lev-Lenègre familiale, OMIM 113900). La maladie de Lev-Lenègre correspond à une pathologie hétérogène, d'étiologie encore mal élucidée et dont le mécanisme peut être structurel et/ou fonctionnel [Smits *et al*, 2005]. Elle résulte d'une dégénérescence fibroscléreuse du faisceau de His-Purkinje liée à l'âge [Probst *et al*, 2003]. La propagation des influx électriques au sein du système de conduction ventriculaire proximal

diminue progressivement, se traduisant par un élargissement progressif des complexes QRS, l'apparition d'un bloc de branche droit et/ou gauche pouvant évoluer vers le bloc atrio-ventriculaire complet, la syncope et/ou la mort subite. Bien que ce soit une pathologie fréquente chez le sujet âgé, certaines formes surviennent chez des sujets plus jeunes (avant l'âge de 50 ans) et s'intègrent dans un cadre familial selon un mode de transmission héréditaire de type autosomique dominant [Priori *et al*, 2013; Ackerman *et al*, 2011]. Des mutations *SCN5A* perte de fonction responsables de la maladie de Lev-Lenègre familiale ont été initialement décrites en 1999, puis confortées par des travaux ultérieurs [Schott *et al*, 1999; Tan *et al*, 2001].

Le diagnostic chez un propositus est basé sur les données cliniques représentées par l'es antécédents personnels, l'histoire familiale et un enregistrement ECG 12-dérivations au repos. Une cardiopathie sous-jacente (cardiomyopathie dilatée ou cardiopathie congénitale) est à éliminer par échocardiographie transthoracique. La survenue de troubles de conduction chez un sujet jeune en l'absence de cardiopathie sous-jacente doit faire réaliser un dépistage génétique en présence d'un fort index de suspicion, c'est-à-dire en cas d'antécédents familiaux de troubles conductifs, d'implantation d'un stimulateur cardiaque et/ou de mort subite [Ackerman *et al*, 2011].

Les médicaments déprimant la conduction cardiaque doivent être évités. L'implantation d'un stimulateur cardiaque doit être considérée selon les recommandations internationales, afin de prévenir le risque de mort subite [Epstein *et al*, 2013; Brignole *et al*, 2013]. Les recommandations d'implantation chez l'enfant sont détaillées dans l'article 2 (chapitre 2). Un suivi ECG régulier est nécessaire et le dépistage familial – clinique et génétique – est un volet majeur de la prise en charge lorsqu'une mutation a été identifiée chez un propositus. L'identification précoce au stade pré-symptomatique des apparentés à risque permet de leur proposer un suivi prospectif régulier, et une prise en charge précoce et adaptée en cas d'apparition de troubles de conduction [Ackerman *et al*, 2011].

Maladie du noeud sinusal (OMIM 608567). La maladie du noeud sinusal héréditaire est caractérisée par une dysfonction sinusale avec bradycardie sinusale, pauses sinusales et diminution de la réponse chronotrope [Abe *et al*, 2014]. De même que pour la maladie de Lev-Lenègre, la maladie du noeud sinusal est habituellement rencontrée chez les sujets âgés, due à une fibrose ou une ischémie du noeud sinusal, mais des familles au sein desquelles cette maladie affecte des sujets jeunes et ségrège selon un modèle d'hérédité mendélienne ont été décrites. *SCN5A* est un des gènes associé à ces formes héréditaires [Makita *et al*, 2005; Benson *et al*, 2003]. Les principes thérapeutiques sont similaires à ceux évoqués dans le paragraphe précédent et sont détaillées dans l'article 1 (chapitre 2).

Fibrillation atriale familiale (OMIM 614022). La fibrillation atriale est l'arythmie la plus fréquente dans les pays développés, survenant en règle générale sur une cardiopathie structurale. Lorsque ce trouble du rythme survient en l'absence d'anomalies structurales chez des sujets relativement jeunes et de surcroît en présence d'un pedigree familial, une cause génétique est suspectée et *SCN5A* est un des gènes identifiés comme pouvant être associé à ce phénotype [Darbar *et al*, 2008; Ellinor *et al*, 2008]. Des mutations *SCN5A* perte de fonction et des mutations *SCN5A* gain de fonction ont été décrites dans la fibrillation atriale familiale, si bien que le mécanisme physiopathologique reste mal compris à ce jour [Veerman *et al*, 2015].

Multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions. Ce syndrome d'identification récente a été associé à la mutation R222Q dans *SCN5A*, identifiée dans des familles au sein desquelles les apparentés atteints présentaient des extrasystoles ventriculaires fréquentes, majoritairement au repos et issues du système de Purkinje, pouvant dans certains cas conduire à la survenue d'arythmie ventriculaires et de mort subite [Laurent *et al*, 2012; Nair *et al*, 2012]. Ce syndrome peut s'associer à des cardiomyopathies dilatées, probablement dues à un phénomène de tachycardiomyopathie [Veerman *et al*, 2015].

Cardiomyopathie dilatée (OMIM 601154). L'association de mutations *SCN5A* (à la fois perte ou gain de fonction) à des cas de cardiomyopathie dilatée, souvent accompagnées d'une dysfonction systolique ventriculaire gauche et d'arythmies supraventriculaires reste mal comprise [Bezzina *et al*, 2003; McNair *et al*, 2004; Olson *et al*, 2005].

Syndromes de chevauchement. Dans certains cas, une même mutation *SCN5A* peut donner lieu à différents phénotypes chez un même individu ou au sein d'une même famille. Par exemple, la mutation *SCN5A-1795insD* identifiée dans une famille hollandaise était associée à différents phénotypes de sévérité variable comprenant dysfonction sinusale, troubles de conduction, syndrome de Brugada et syndrome du QT long, isolés ou associés selon les individus considérés dans la famille [Bezzina *et al*, 1999; van den Berg *et al*, 2001]. D'autres descriptions similaires ont été depuis rapportées [Kyndt *et al*, 2001; Kanter *et al*, 2012], introduisant la notion de syndromes de chevauchement des canalopathies cardiaques sodiques [Remme *et al*, 2013]. Dans la majorité des cas de syndromes chevauchants, la conduction cardiaque est altérée [Kyndt *et al*, 2001; Remme *et al*, 2013]. Kanter *et al*. ont récemment rapporté l'association d'arythmies ventriculaires et de troubles de conduction intraventriculaire chez des nourrissons et de jeunes enfants, dûs à des mutations à effet perte de fonction des canaux sodiques et/ou calciques [Kanter *et al*, 2012]. Les syndromes chevauchants liés à *SCN5A* peuvent également associer cardiomyopathie dilatée et LQT3, fibrillation atriale et LQT3, syndrome de Brugada et LQT3 ou encore flutter atrial,

syndrome de Brugada et troubles de conduction [Kwon *et al*, 2012; Olesen *et al*, 2012; Nakaya *et al*, 2014; Hothi *et al*, 2015].

La fréquence des syndromes de chevauchement n'est pas connue mais cette entité montre qu'il existe un continuum entre différents phénotypes cliniques associés aux mutations *SCN5A*. La coexistence d'un LQT3 et d'un BrS (spontané ou masqué) a déjà été associée à plusieurs mutations: 1795insD, delK1500, E1784K, L1786Q, delKQP, delF1617, W1191X et D1114N (Figure 4-7) [Bezzina *et al*, 1999; Grant *et al*, 2002; Rossenbacker *et al*, 2005; Makita *et al*, 2009; Kanters *et al*, 2014]. Cette association ne semble pas être rare et pose la question de réaliser un test aux bloqueurs des canaux sodiques chez tout patient chez qui un diagnostic de LQT3 est posé, à la recherche d'un BrS masqué [Nakaya *et al*, 2014; Kanter *et al*, 2014]. En effet la conséquence pratique de la combinaison de ces deux phénotypes est la question du traitement pharmacologique adapté, dans la mesure où:

a/ les bêta-bloquants seraient moins efficaces dans le LQT3 que dans le LQT1 et le LQT2 [Shimizu *et al*, 2013];

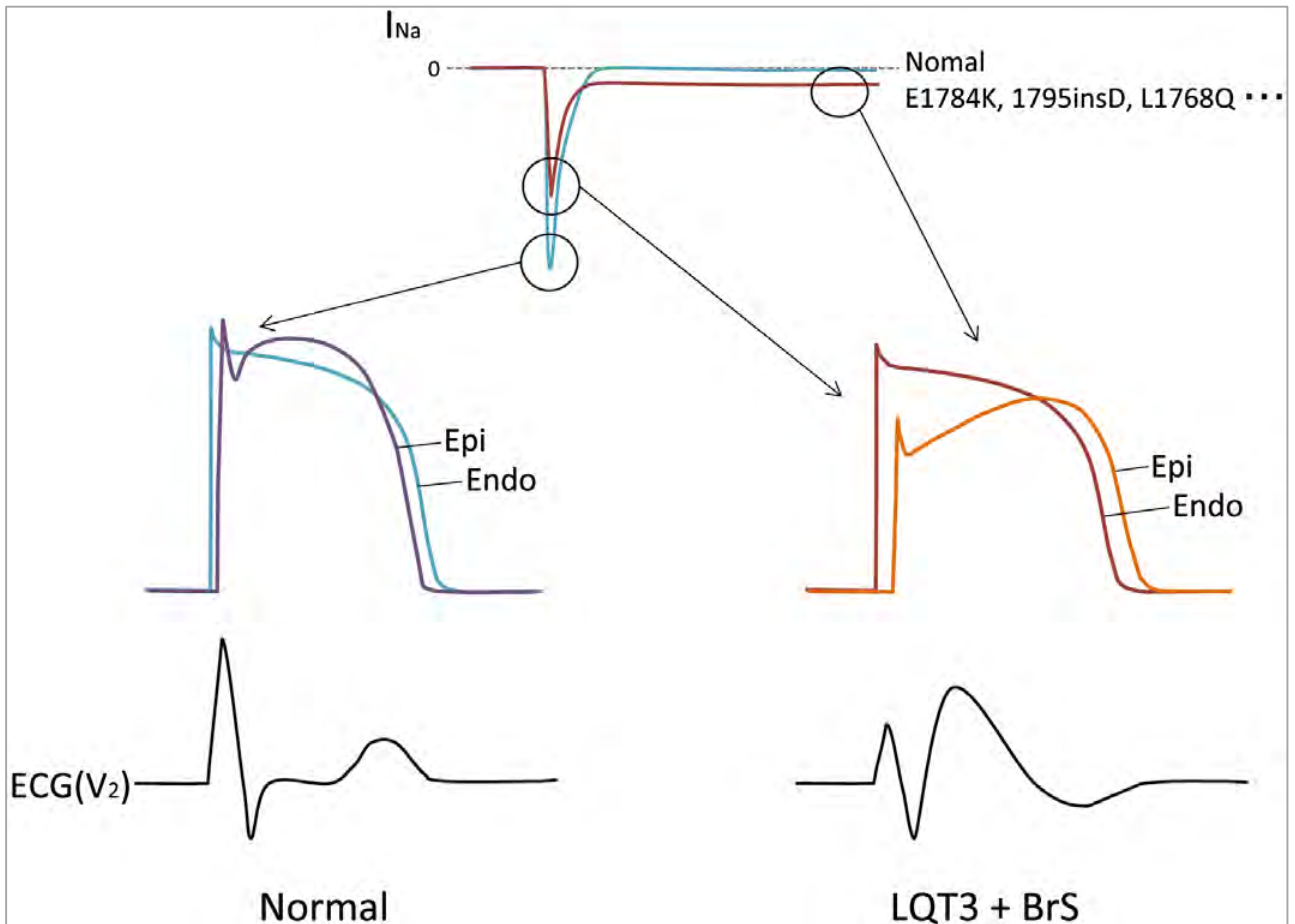
b/ les bêta-bloquants, indiqués dans le traitement du LQTS, ne sont pas indiqués dans le BrS où ils pourraient majorer les symptômes et favoriser la survenue d'une fibrillation ventriculaire [Priori *et al*, 2015; Veerakul *et al*, 2014];

c/ un anti-arythmique de classe Ia tel que la quinidine pourrait avoir un effet délétère car le blocage des canaux HERG par ces drogues peut induire une majoration de l'allongement de l'intervalle QT [Nakaya *et al*, 2014];

d/ l'efficacité de la mexiletine et de la ranolazine restent à être évaluée sur le long-terme [Kanter *et al*, 2014; van den Berg *et al*, 2014];

e/ au-delà de l'arsenal pharmacologique, l'implantation d'un défibrillateur automatique reste probablement la meilleure option thérapeutique chez ces malades particuliers.

Figure 4-9: Représentation des mécanismes électrophysiologiques pouvant expliquer la co-existence d'un LQT3 et d'un BrS causés par une même mutation SCN5A.



Il a été montré qu'une persistance du courant sodique entrant durant la phase de plateau du potentiel d'action peut entraîner un allongement du temps de repolarisation, et qu'une diminution du pic du courant sodique, en particulier dans les cellules épicaudiques, peut donner une sur-élévation en dôme du segment ST (aspect BrS type 1). Cependant les mécanismes électrophysiologiques précis permettant d'expliquer comment une unique mutation SCN5A peut conduire à la combinaison de ces deux phénotypes restent à être élucidés.

Adapté de [Nakaya et al, 2014]

II.3- VARIABILITÉ PHÉNOTYPIQUE DES MUTATIONS *SCN5A*

Une dysfonction de la sous-unité alpha du canal sodique Nav1.5 due à une mutation de *SCN5A* est associée à une grande variabilité phénotypique (Tableau 4-1, Figure 4-10). Les mutations *SCN5A* ayant un effet gain-de-fonction induisent un défaut d'inactivation de Nav1.5 et donc un courant sodique I_{Na} persistant, prolongeant la phase de plateau (phase 2), et sont associées au LQT3. A l'inverse, les mutations *SCN5A* ayant un effet perte-de-fonction induisent une diminution du courant sodique entrant (phase 0) et sont associées au syndrome de Brugada, à la dysfonction sinusale, aux troubles de conduction et possiblement à la cardiomyopathie dilatée. Enfin des mutations ayant un effet mixte, à la fois perte-de-fonction sur le courant sodique entrant (phase 0) et gain-de-fonction sur le courant sodique tardif (phase 2) peuvent être associées à la fibrillation atriale familiale et/ou à un syndrome de chevauchement [Remme *et al*, 2013; Liu *et al*, 2014].

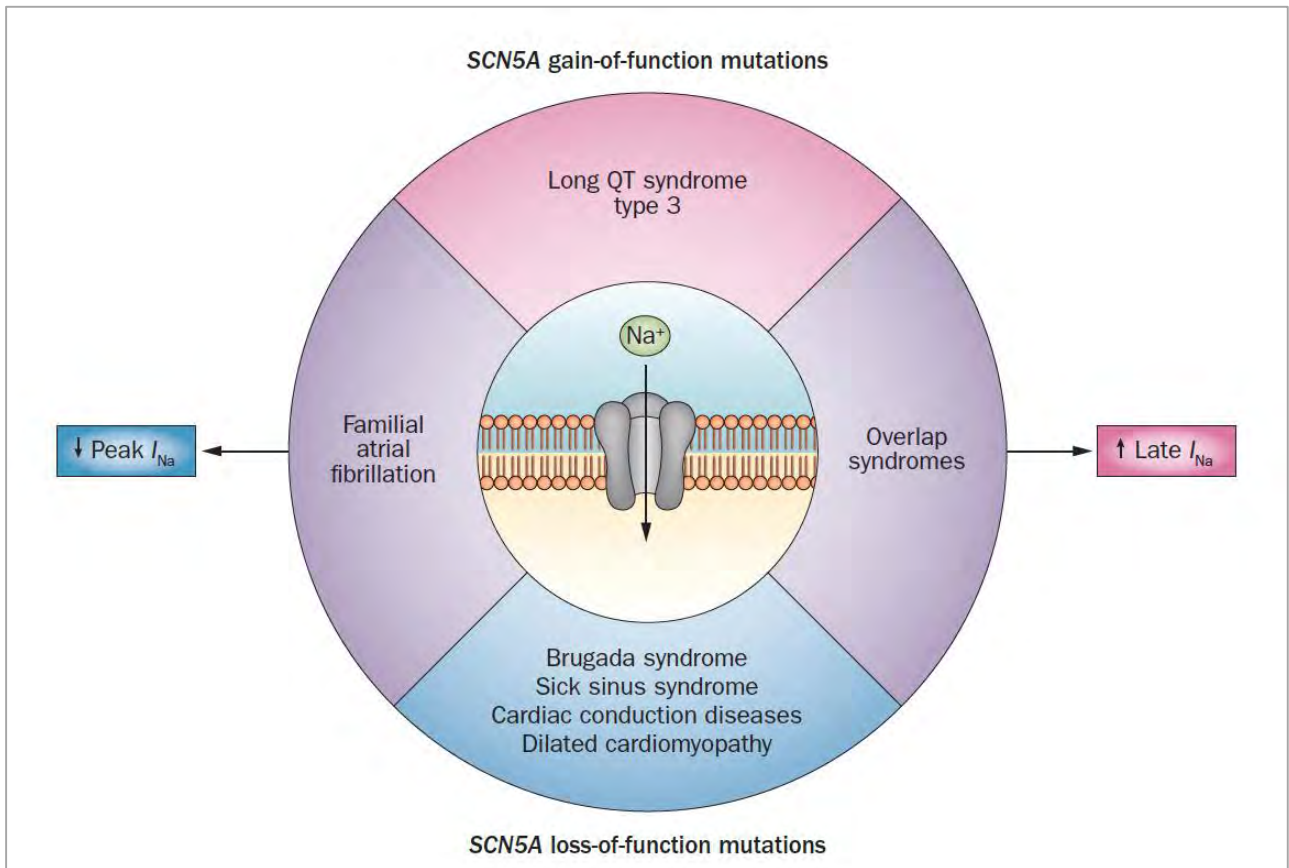
Bien qu'au cours des 20 dernières années, de nombreuses études aient apporté des éléments de compréhension des mécanismes moléculaires, génétiques et électrophysiologiques associés aux dysfonctions et/ou aux dysrégulations des canaux sodiques dues aux mutations *SCN5A*, de nombreux points restent obscurs. Il est cependant clair que le fonctionnement et la régulation des canaux sodiques cardiaques est plus complexe qu'initialement postulé, faisant intervenir un réseau de protéines d'interaction, telles que les sous-unités beta de Nav1.5, l'ankyrine, la caveoline-3, MOG1 (ran guanine nucleotide release factor) ou la syntrophine. L'activité du canal Nav1.5 peut être modifiée par un défaut d'expression ou de fonctionnement d'un composant de son complexe macromoléculaire [Liu *et al*, 2014; Abriel *et al*, 2015].

Les mutations *SCN5A* peuvent altérer les propriétés cinétiques d'ouverture du canal, son expression et sa distribution à la membrane, ou sa dégradation. Mais pour un effet direct donné d'une mutation *SCN5A* sur l'activité biophysique du canal sodique Nav1.5, le phénotype peut avoir une pénétrance variable selon les individus atteints et peut également varier en fonction de l'âge [Gehi *et al*, 2006], du sexe [Priori *et al*, 2000; Kyndt *et al*, 2001], du moment du cycle circadien, de la température corporelle [Abdelsayed *et al*, 2015] et de la région du coeur considérée. Par exemple, les hommes atteints d'un syndrome du QT long de type 3 ont tendance à avoir un intervalle QT corrigé plus long que les femmes [Locati *et al*, 1998], et le syndrome de Brugada affecte davantage les hommes que les femmes [Priori *et al*, 2000]. Kyndt *et al*. ont rapporté une grande famille au sein de laquelle quatre hommes porteurs d'une mutation *SCN5A* ayant un effet perte-de-fonction (G1406R) avaient un syndrome de Brugada, alors que sept autres membres de cette famille dont six femmes porteurs de la même mutation présentaient des troubles de conduction [Kyndt *et al*, 2001]. Il est intéressant de noter que la prédominance masculine du syndrome de Brugada n'est pas observée dans l'enfance, ce qui a conduit à proposer que les modifications hormonales liées à l'âge puisse expliquer la majoration du risque rythmique chez les

hommes après la puberté [Probst *et al*, 2007; Crosson *et al*, 2015]. De plus, chez un patient donné porteur d'une mutation *SCN5A* associée au syndrome de Brugada, l'aspect ECG peut varier en fonction du temps, traduisant une variation circadienne de la susceptibilité aux arythmies ventriculaires léthales, et les manifestations électriques peuvent s'aggraver lors d'épisodes fébriles [Probst *et al*, 2007; Juntilla *et al*, 2008]. Enfin les troubles de conduction associés aux mutations *SCN5A* perte-de-fonction sont volontiers progressifs et s'aggravent avec l'âge [Probst *et al*, 2003]. Par ailleurs, la variabilité phénotypique des mutations *SCN5A* pourrait aussi résulter d'autres facteurs de régulation, telles que les modifications de transcription du gène, de transport nucléocytoplasmique de l'ARN, de sa traduction, de modifications post-transcriptionnelles et/ou de la dégradation de la protéine [Remme *et al*, 2013; Liu *et al*, 2014; Marionneau *et al*, 2015].

Cette grande variabilité phénotypique rend une relation génotype-phénotype très difficile, en particulier dans la population pédiatrique pour laquelle on dispose encore de peu de données dans la littérature médicale. Le manque de corrélation peut rendre la prise de décision difficile pour les patients chez qui une mutation *SCN5A* a été identifiée.

Figure 4-10: Variabilité phénotypique associée aux mutations du gène SCN5A.



Les mutations SCN5A ayant un effet gain-de-fonction induisent un courant sodique I_{Na} persistant, prolongeant la phase de plateau (phase 2), et sont associées au syndrome du QT long de type 3. Les mutations SCN5A ayant un effet perte-de-fonction induisent une diminution du courant sodique entrant (phase 0) et sont associées au syndrome de Brugada, à la dysfonction sinusale, aux troubles de conduction et possiblement à la cardiomyopathie dilatée. Par ailleurs des mutations ayant un effet à la fois perte-de-fonction sur le courant sodique entrant (phase 0) et un effet gain-de-fonction sur le courant sodique tardif (phase 2) peuvent être associées à la fibrillation atriale familiale et/ou à un phénotype mixte (ou syndrome de chevauchement).

Adapté de [Liu et al, 2014]

III- Etude #6: ETUDE DES ENFANTS PORTEURS D'UNE MUTATION DU GÈNE *SCN5A*

III.1- Problématique

Près des deux-tiers des morts subites récupérées de l'enfant et de l'adulte jeune sont dues à une maladie rythmique héréditaire, et 10 à 15% des morts subites du nourrisson sont attribuées à une canalopathie cardiaque sodique [Klaver *et al*, 2011; Skinner *et al*, 2013; Wong *et al*, 2014; Wilders *et al*, 2015]. Une investigation complète au décours de la mort subite ou de la mort subite récupérée d'un nourrisson ou d'un enfant est essentielle pour documenter ou exclure une maladie rythmique héréditaire, dans la mesure où ce diagnostic est d'une importance majeure pour la prise en charge ultérieure de cet enfant s'il a survécu et/ou de ses apparentés qui sont susceptibles d'être eux aussi atteints et donc à risque d'évènement rythmique [Wong *et al*, 2014b; Skinner *et al*, 2013].

Des études antérieures ont permis d'individualiser certaines spécificités pédiatriques de ces maladies rythmiques héréditaires liées à une mutation du gène *SCN5A* en particulier dans le cas du syndrome de Brugada:

- a/ les troubles de la conduction cardiaque sont l'anomalie ECG la plus fréquente;
 - b/ un épisode fébrile et une vaccination sont identifiés comme des potentiels facteurs de risque d'évènement rythmique et/ou de mort subite;
 - c/ le risque d'évènement rythmique est majoré chez les enfants ayant présenté des symptômes et chez ceux dont l'ECG révèle un aspect de syndrome de Brugada de type 1 spontané;
 - d/ les bêta-bloquants ont un rôle dans la prévention des arythmies ventriculaires
- [Probst *et al*, 2007; Nannenber *et al*, 2012; Chockalingam *et al*, 2012].

Cependant de grandes différences de pratique existent parmi les rythmopédiatres concernant l'approche diagnostique et la prise en charge de ces enfants mutés *SCN5A*. Une étude évaluant les modalités de prise en charge du syndrome de Brugada chez l'enfant a récemment montré d'importantes déviations dans la pratique clinique des rythmopédiatres, en comparaison aux recommandations établies pour le diagnostic et le traitement des patients adultes porteurs d'un syndrome de Brugada [Harris *et al*, 2014].

Du fait de la faible prévalence des maladies rythmiques héréditaires dans la population pédiatrique, il existe peu de données disponibles sur les caractéristiques cliniques et les modalités diagnostiques ou thérapeutiques de ces pathologies, adaptées à l'enfant. Très peu d'études multicentriques concernant cette population de patients ont été publiées à ce jour. De plus, avec les avancées des techniques de dépistage génétique, de plus en plus d'enfants sont diagnostiqués comme étant porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*, soit en tant que propositus, soit dans le cadre d'un dépistage familial. Cependant les relations génotype-phénotype doivent être clarifiées chez ces patients, car par exemple aujourd'hui, la

prise en charge d'un syndrome de Brugada chez un enfant asymptomatique n'est pas consensuelle [Eckhardt *et al*, 2012; Brunklaus *et al*, 2014; Harris *et al*, 2014]. Un enregistrement ECG contemporain d'un test pharmacologique par un agent bloqueur des canaux sodiques, une étude électrophysiologique avec stimulation ventriculaire programmée, ou encore un dépistage génétique ont été proposés pour tenter de stratifier le risque rythmique chez ces patients, mais avec une sensibilité et/ou une spécificité limitées, en particulier à l'âge pédiatrique [Sorgente *et al*, 2011; McMillan *et al*, 2014; Conte *et al*, 2014].

Les rythmologues et rythmopédiatres sont confrontés à deux questions majeures concernant leurs prises en charge dans la population pédiatrique:

a/ quelle est la bonne stratégie diagnostique des pathologies liées à *SCN5A* chez l'enfant ?

et b/ quand et comment traiter les enfants porteurs d'une mutation du gène *SCN5A* ?

Une meilleure compréhension de la signification clinique des mutations du gène *SCN5A* permettrait aux cardiogénétiens et aux rythmologues de mieux conseiller les patients et leurs familles.

III.2- Objectifs

L'objectif principal de ce travail était de mieux caractériser les troubles de conduction et les relations génotype-phénotype chez les enfants porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*.

Les objectifs secondaires étaient de: a/ améliorer nos connaissances quant au mode de présentation et à l'histoire naturelle des canalopathies *SCN5A* à l'âge pédiatrique; et b/ analyser les pratiques médicales dans l'évaluation et la prise en charge de ces diagnostics chez l'enfant, en comparaison avec les recommandations publiées.

III.3- Méthodologie

Caractéristiques de l'étude. Nous avons mis en place un projet de recherche clinique, visant à constituer une vaste cohorte d'enfants porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*. Il s'agit d'une étude multicentrique internationale, rétrospective sur 25 ans (1990 à 2015) à laquelle 25 centres de cardiogénétique et/ou de rythmologie pédiatrique ont participé (10 centres en Europe, 7 aux Etats-Unis, 2 au Canada, 4 en Asie et 2 en Océanie) (Figure 4-11). Les caractéristiques de l'étude #6 sont résumées dans le Tableau 4-5.

Tous les patients a/ porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*, quel que soit le diagnostic clinique; et b/ âgés de moins de 16 ans au moment du diagnostic clinique et/ou génétique; ont été inclus dans l'étude. Il n'y avait pas de critère d'exclusion. Les patients décédés étaient inclus dans l'étude. L'identification des patients était assurée dans chaque centre par le médecin co-investigateur.

Tableau 4-5: Caractéristiques de l'étude #6

| | |
|----------------------------------|--|
| Etude #6 | Etude des troubles de conduction et compréhension des relations génotype-phénotype chez les enfants porteurs d'une mutation du gène SCN5A |
| Institution coordinatrice | L'institut du thorax, INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291 Université de Nantes, Nantes, France |
| Investigateur principal | Dr. Alban-Elouen Baruteau |
| Comité scientifique | Dr. Florence Kyndt, Pr. Arthur Wilde, Pr. Minoru Horie, Pr. Mickael Ackerman, Pr. Peter Schwartz, Pr. Vincent Probst |
| Statisticien | Béatrice Guyomarch, l'institut du thorax, Nantes |
| Schéma de l'étude | Etude rétrospective multicentrique internationale (25 centres participants) Europe: 11 centres, Amérique du Nord: 8 centres, Asie-Océanie: 6 centres |
| Comité d'Ethique | Institutional Review Board de chaque institution participante |
| Financement | Fédération Française de Cardiologie, Bourse d'études à l'étranger 2015 Fondation Lefoulon-Delalande – Institut de France, Bourse de Recherche 2015 |
| Co-Investigateurs | Pr. A. Wilde, Dr. S. Vink, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands Pr. Nico A. Blom, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands Dr. JP. Kaski, University College London, London, UK Pr. E. Behr, Dr. L. Wong, St George's University, London, UK Pr. J. Tfelt-Hansen, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark Dr. L. Crotti, Dr. F. Dagradi, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy Pr P. Schwartz, Pr. S. Priori, University of Pavia, Pavia, Italy Dr. M. Borggrefe, Dr. B. Rudic, University Medical Center, Mannheim, Germany Dr. C. Rieuland, Universitätsklinik für Kinderheilkunde, Bern, Switzerland Dr. I. Denjoy, Pr. P. Guicheney, INSERM U1166, Univ. Sorbonne, Paris, France Dr. F. Kyndt, Pr. V. Probst, INSERM U1087, L'institut du thorax, Nantes Dr. D. Abrams, Harvard Medical School, Boston, MA, USA Pr. L. Liberman, Columbia University Medical Center, Mew York, NY, USA Pr. M. Ackerman, Pr. D. Tester, Dr. JM. Bos, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA Pr. AM. Dubin, Stanford University, Palo Alto, CA, USA Pr. M. Shah, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA Pr. G. Van Hare, Washington University, St Louis, MO, USA Dr. E. Stephenson, Dr. LA. Zahavich, University of Toronto, Toronto, Canada Pr. S. Sanatani, Pr. A. Krahn, University of British Columbia, Vancouver, Canada Pr M. Horie, Dr. O. Junichi, Shiga University of Medical Sciences, Otsu, Japan Pr. W. Shimizu, Nippon Medical School, Tokyo, Japan Pr. T. Aiba, National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka, Japan Dr. TC. Yung, Dr. SY. Kwok, University of Hong Kong, Hong Kong, China Pr. J. Skinner, Dr. A. Winbow, University of Auckland, Auckland, New Zealand Pr. A. Davis, Dr. M. Jadhav, Melbourne University, Melbourne, Australia |
| Nb de sujets inclus | 423 propositus (environ 70 autres en cours d'inclusion) |
| Critères d'inclusion | 1- Patient porteur d'une mutation du gène SCN5A, quel que soit le diagnostic clinique et 2- âge ≤16 ans au moment du diagnostic clinique et/ou génétique |
| Critères d'exclusion | Aucun (waved consent) |
| Publication | Baruteau AE et al, <i>En cours de rédaction</i> . |

Structure du réseau. Le réseau a été construit en contactant:

a/ des médecins ayant l'habitude de travailler avec l'institut du thorax, ce qui a permis de rallier au projet: Isabelle Denjoy (Paris, France), Arthur Wilde (Amsterdam, Pays-Bas), Jacob Tfelt-Hansen (Copenhagen, Danemark), Lia Crotti (Milan, Italie) et Boris Rudic (Mannheim, Allemagne);

b/ tous les médecins co-auteurs du consensus d'experts HRS/EHRA/APHRS sur le diagnostic et la prise en charge des patients porteurs d'une maladie rythmique héréditaire [Piori *et al*, 2013], ce qui a permis de rallier au projet: Minoru Horie (Otsu, Japan), Elijah Behr (Londres, UK), Nico Blom (Leiden, Pays-Bas), Arthur Wilde (Amsterdam, Pays-Bas), Andrew Krahn (Vancouver, Canada), Peter Schwartz (Pavie, Italy) et Wataru Shimizu (Tokyo, Japan);

c/ tous les médecins co-auteurs du consensus d'experts PACES/HRS sur l'évaluation et la prise en charge des arythmies ventriculaires sur coeur sain chez l'enfant [Crosson *et al*, 2014], ce qui a permis de rallier au projet: Anne Dubin (Palo Alto, USA), Elizabeth Stephenson (Toronto, Canada).

d/ des médecins du réseau constitué dans le cadre de l'étude DISCO (chapitre 5): Juan Pablo Kaski (Londres, UK), Leonardo Liberman (New York, USA), Mickael Ackerman (Rochester, USA), Anne Dubin (Palo Alto, USA), Maully Shah (Philadelphie, USA), George Van Hare (St Louis, USA), Shubayan Sanatani (Vancouver, Canada), Jonathan Skinner (Auckland, Nouvelle-Zélande) et Andrew Davis (Melbourne, Australie).

e/ d'autres médecins qui ont eu connaissance de cette étude et nous ont contacté pour y participer: Claudine Rieuland (Bern, Suisse), Tak-Cheung Yung (Hong Kong, Chine), Dominic Abrams (Boston, USA).

Recueil des données. Le cahier d'observation a été rédigé avec une attention particulière concernant les données relatives aux caractéristiques de la (des) mutation(s), l'histoire familiale, le diagnostic clinique et le mode de présentation, les caractéristiques ECG, les données des investigations complémentaires (test pharmacologique, étude électrophysiologique, épreuve d'effort), les modalités de la prise en charge (traitement pharmacologique, stimulateur cardiaque, défibrillateur automatique implantable) et les données du suivi médical (durée du suivi, évènements cardiovasculaires, décès, rupture du traitement, complications liées à l'appareillage le cas échéant).

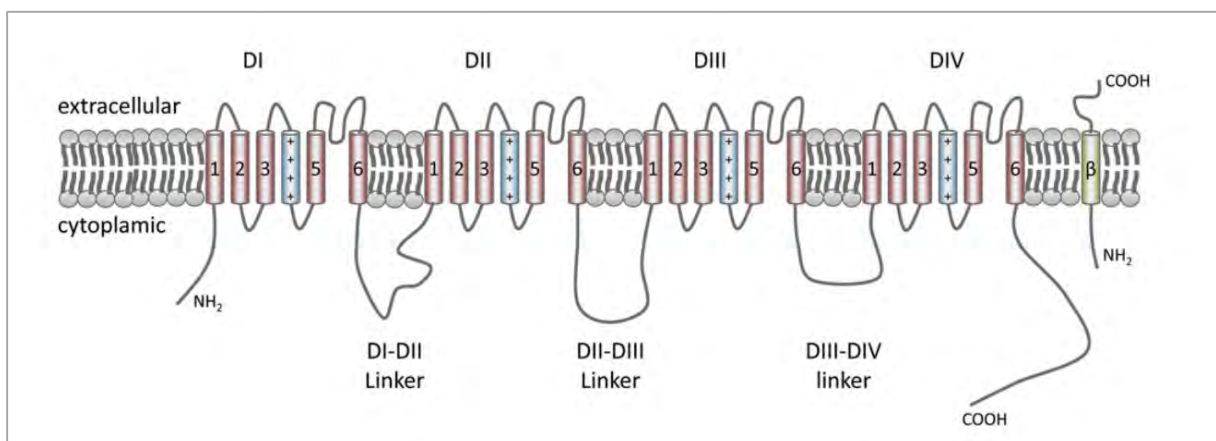
Analyses du génotype. Les données concernant les génotypes ont été recueillies localement par chaque médecin co-investigateur, dans les centres de cardiogénétique affiliés aux centres de rythmologie pédiatrique participant à cette étude. Les données recueillies étaient le nombre et la description des mutations identifiées pour chaque patient: exon, changement de base nucléotidique, changement d'acide aminé, effet perte et/ou gain de fonction, type de mutation: mutation non-sens (truncation mutation), mutation faux-sens active (missense active mutation; définie comme une mutation faux-sens avec réduction $\leq 90\%$ du courant sodique entrant) et mutation faux-sens inactive (missense inactive; définie comme une mutation faux-sens avec réduction $> 90\%$ du courant sodique entrant)

[Meregalli *et al*, 2009]. Enfin la topologie des mutations a été décrite selon la classification présentée dans le Tableau 4-6.

Avant de s'engager dans les analyses statistiques, les génotypes de tous les patients inclus dans ce travail ont été vérifiés par le Dr. Florence Kyndt à l'institut du thorax, Université de Nantes.

Tableau 4-6: Classification topologique des mutations *SCN5A*

| Classification topologique | Acides aminés |
|---|---------------|
| Domaine N-terminal | 1 à 126 |
| Domaines homologues | |
| DI | 127 à 415 |
| DI S1-S4 | 127 à 252 |
| DI S5-S6 | 253 à 415 |
| DII | 712 à 939 |
| DII S1-S4 | 712 à 841 |
| DII S5-S6 | 842 à 939 |
| DIII | 1201 à 1470 |
| DIII S1-S4 | 1201 à 1336 |
| DIII S5-S6 | 1337 à 1470 |
| DIV | 1524 à 1772 |
| DIV S1-S4 | 1524 à 1659 |
| DIV S5-S6 | 1660 à 1772 |
| Boucles inter-domaines (interdomain linkers) | |
| DI/DII | 416 à 711 |
| DII/DIII | 940 à 1200 |
| DIII/DIV | 1471 à 1523 |
| Domaine C-terminal | 1773 à 2016 |



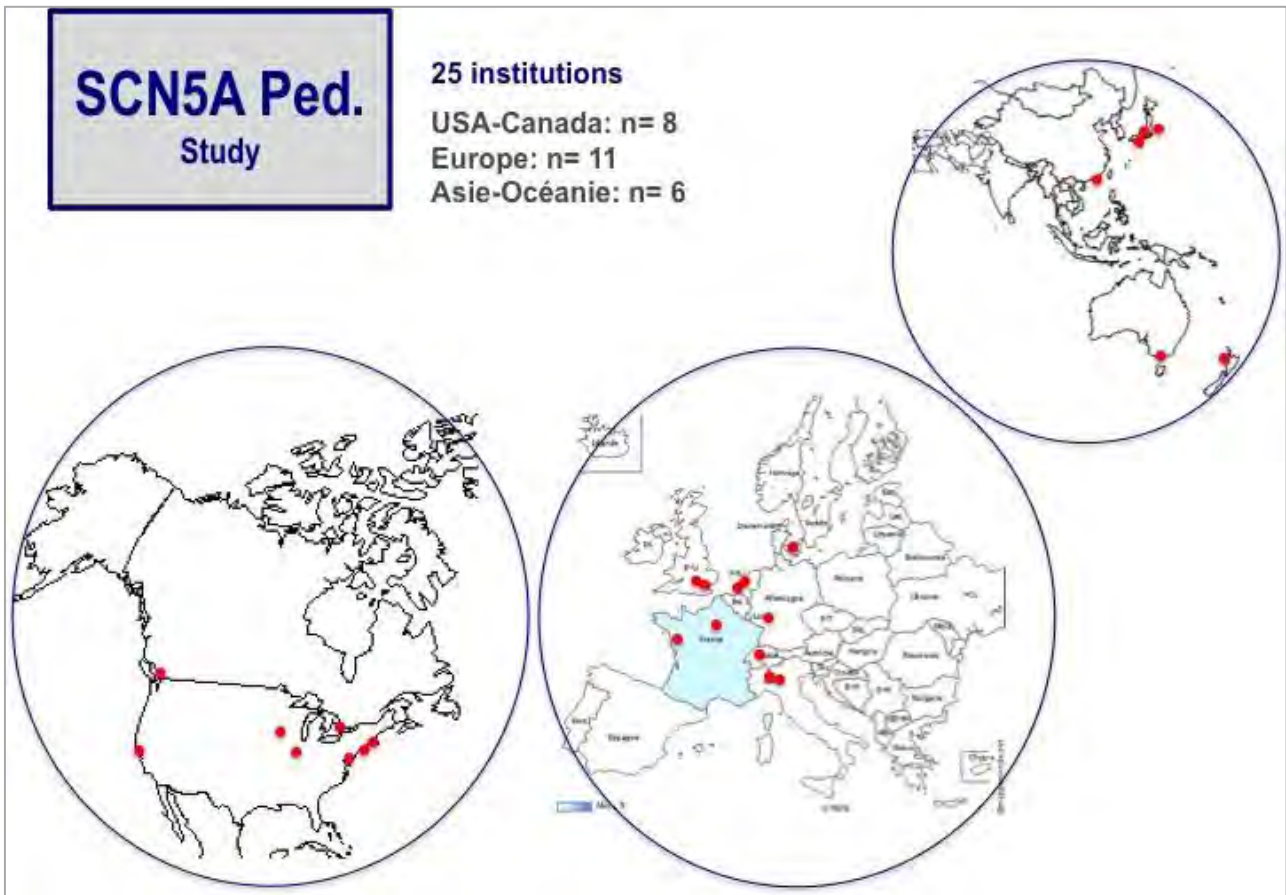
Adapté de [Veerman *et al*, 2015; Kapplinger *et al*, 2015]

Analyses ECG. Les ECG 12-dérivations de tous les patients inclus dans l'étude ont été centralisés: celui enregistré au moment du diagnostic, et lorsqu'il était disponible celui enregistré lors de la dernière consultation de suivi. Les ECG ont été systématiquement réinterprétés par trois médecins co-investigateurs (le Dr. Anna Jong-Hoeppner, le Dr. Matthias Lachaud et moi) en connaissant l'âge du patient au moment de l'enregistrement du tracé, mais "en aveugle" concernant le diagnostic clinique. Les mesures de la fréquence cardiaque, de l'intervalle PR (non réalisée en cas de BAV complet), de la durée du complexe QRS et de l'intervalle QT ont été réalisées, et l'intervalle QT a été corrigé pour la fréquence cardiaque en utilisant la formule de Bazett [Bazett *et al*, 1920]. Les mesures des différents paramètres ECG ont été comparées aux valeurs normales pour l'âge [Fleming *et al*, 2011; Rijnbeek *et al*, 2001]. Le diagnostic des troubles de conduction atrioventriculaire et/ou intraventriculaire et l'analyse de l'intervalle QT ont été réalisés selon les définitions usuelles et les critères recommandés par l'American Heart Association et l'Heart Rhythm Society [Surawicz *et al*, 2009; Rautaharju *et al*, 2009; Elizari *et al*, 2007; Mangrum *et al*, 2000]. Les critères ECG diagnostiques des maladies rythmiques héréditaires retenus étaient ceux recommandés par les experts de l'Heart Rhythm Society et de l'European Heart Rhythm Association [Priori *et al*, 2013]. Tous les tracés ECG ont été analysés deux fois (première analyse: Anna Jong-Hoeppner et Matthias Lachaud; seconde analyse: Alban Baruteau) et les mesures des différents intervalles ont ensuite été moyennées. En cas de discordance concernant le diagnostic phénotypique, les tracés étaient réinterprétés par un troisième médecin (Leonardo Liberman).

Règles de publication. Il a été défini au préalable que chaque médecin co-investigateur sera co-auteur de l'article issu de ce travail. Pour respecter le volume respectif des centres participants, il a été convenu que:

- a/ l'ordre d'apparition des auteurs est déterminé par le nombre de patients apportés à la série;
- b/ le nombre d'auteurs par centre est défini ainsi: 1 auteur si le centre apporte 10 patients ou moins; 2 auteurs entre 10 et 30 patients; 3 auteurs si plus de 30 patients.

Figure 4-11: SCN5A Ped. Study: planisphère des 25 centres participants



III.4- Principaux résultats

Ce travail n'est pas finalisé au moment de rendre le manuscrit de cette thèse; sont donc présentés ici des résultats préliminaires. Les principales modifications qui seront apportées dans les semaines à venir portent sur:

1- la taille de l'échantillon; 423 enfants ont été considérés dans cette première analyse, mais le nombre de patients étudiés va être prochainement augmenté par: (a) les malades de Boston, Philadelphie et Milan où le recueil des données est toujours en cours (environ 70 patients supplémentaires), (b) 16 patients avaient une mutation faux-sens conservatrice dans *SCN5A*, dont la responsabilité vis-à-vis du phénotype est moins évidente; ils n'ont pas été retenus dans un premier temps dans l'attente d'une interprétation génétique complémentaire;

2- des analyses statistiques supplémentaires dans l'interprétation des corrélations génotype-phénotype et dans l'analyse des facteurs de risque et de la survie;

3- la lecture critique du manuscrit par tous les co-auteurs et ses modifications en fonction de leurs commentaires.

Nous devrions ainsi pouvoir soumettre pour publication une version aboutie de ce travail en février 2016.

Title: Genotype-Phenotype correlations in pediatric SCN5A mutation carriers: new insights for a better risk stratification in neonates and children.

Authors: Alban-Elouen Baruteau, MD, Florence Kyndt, PharmD, PhD, Arthur A. Wilde, MD, PhD, Minoru Horie, MD, PhD, Nico A. Blom, MD, PhD, Suzanne Vink, MD, Ozawa Junichi, MD, Hervé Le Marec, MD, PhD, Jean-Jacques Schott, PhD, Matthias Lachaud, MD, Isabelle Denjoy, MD, Véronique Fressart, MD, Jean-Marc Lupoglazoff, MD, PhD, Aiba Takeshi, MD, PhD, Wataru Shimizu, MD, PhD, Johan M. Bos, MD, PhD, David J. Tester, BS, Annika Winbo, MD, PhD, Jonathan Skinner, MD, Mangesh Jadhav, MD, Andrew Davis, MD, Elizabeth A. Stephenson, MD, Laura A. Zahavich, MSc, Federica Dagradi, MD, Lia Crotti, MD, Carla Spazzolini, DVM, Leonie Wong, MD, Elijah Behr, MD, Anne M. Dubin, MD, Sonia Franciosi, PhD, Shubhayan Sanatani, MD, Andrew Krahn, PhD, Anna Jong-Hoepfner, MD, Leo Liberman, MD, Claudine Rieubland, MD, George F. Van Hare, MD, Juan Pablo Kaski, MD, Boris Rudic, MD, Sit Yee Kwok, MD, Tak-Cheung Yung, MD, Jacob Tfelt-Hansen, MD, PhD, Dominic J. Abrams, MD, John K. Triedman, MD, Mully J. Shah, MD, Béatrice Guyomarc'h-Delasalle, MS, Michael J. Ackerman, MD, PhD, Peter J. Schwartz, MD, Vincent Probst, MD, PhD.

Affiliations: L'Institut du Thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR6291, Centre de Référence des Maladies Rythmiques Héritaires, Université de Nantes, Nantes, France (AEB, FK, JJS, HLM, ML, BD, VP); LIRYC Institute (Electrophysiology and Heart Modeling Institute), Hôpital du Haut Lévêque, Service de Cardiologie Pédiatrique, Université de Bordeaux, Bordeaux, France (AEB); Department of Pediatric Cardiology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands (NB, SV); Department of Experimental and Clinical Cardiology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands (SV, AAW); Department of Cardiovascular and Respiratory Medicine, Shiga University of Medical Sciences, Otsu, Japan (MH, OJ); AP-HP, Hôpital Bichat, Service de Cardiologie, Centre de Référence des Maladies Rythmiques Héritaires, Université Denis Diderot, Paris, France (ID); AP-HP, Hôpital Pitié Salpêtrière, Service de Biologie Moléculaire, Paris, France (VF); AP-HP, Hôpital Robert Debré, Service de Cardiologie Pédiatrique, Paris, France (JML); Department of Cardiovascular Medicine, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan (AT); Department of Cardiovascular Medicine, Nippon Medical School, Tokyo, Japan (WS); Department of Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Windland Smith Rice Sudden Death Genomics Laboratory, Department of Medicine/Division of Cardiovascular Diseases & Department of Pediatrics/Division of Pediatric Cardiology, Mayo Clinic, Rochester, MN (MJB, MJA, DJT); Greenlane Paediatric and Congenital Cardiac Services, Starship Childrens Hospital, Auckland, New Zealand (AW, JS); Department of Cardiology, The Royal Children's Hospital, Melbourne University, Melbourne, Australia (AD, MJ); The Hospital for Sick Children, Labbatt Family Heart Centre, University of Toronto, Toronto, Canada (ES, LZ); Center for Cardiac Arrhythmias of Genetic Origin, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italy (FD, LC, CS, PJS); Cardiovascular Sciences Research Center, St George's University of London, London, United Kingdom (LW, EB); Lucile Packard Children's Hospital, Division of Pediatric Electrophysiology, Stanford University, Palo Alto, CA, USA (AMD); British Columbia Children's Hospital, Department of Pediatric Cardiology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada (SF, SS, AK) Morgan Stanley Children's Hospital, Division of Pediatric Cardiology, New York Presbyterian Hospital, Columbia University Medical Center, New York, NY, USA (AJH, LL); Division of Human Genetics, Department of Pediatrics, Inselspital, University of Bern, Switzerland (CR); Washington University in St. Louis School of Medicine, Department of Pediatrics/Division of Cardiology, St. Louis, MO, USA (GFVH); Inherited Cardiovascular Diseases Unit, Department of Cardiology, Great Ormond Street Hospital for Children, London, UK (JPK); Institute of Cardiovascular Science, University College London, London, UK (JPK); Medical Faculty Mannheim of the University of Heidelberg, 1st Department of Medicine, Mannheim, Germany (BR); DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Mannheim, Germany (BR); Department of Paediatrics, The Chinese University of Hong Kong, Prince of Wales Hospital, Hong Kong, China (SYK); Division of Paediatric Cardiology, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, Queen Mary Hospital, The University of Hong Kong, Hong Kong, China (TCY); Danish National Research Foundation Centre for Cardiac Arrhythmia, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark (JTH); Laboratory of Molecular Cardiology, Department of Cardiology, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Denmark (JTH); Department of Cardiology, The Heart Centre, Copenhagen University Hospital-Rigshospitalet (JTH); Inherited cardiac arrhythmia program, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA (DJ, JKT); The Children's Hospital of Philadelphia, Division of Cardiology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania (MJS).

Address correspondence to: Alban-Elouen Baruteau, L'institut du thorax, INSERM UMR1087, CNRS UMR6291, Université de Nantes, Nantes, France, alban.baruteau@etu.univ-nantes.fr, +1-929-278-3452.

Abstract (xx words)

Background: Mutations in *SCN5A*, the gene encoding the alpha subunit of the cardiac sodium channel can lead to a wide range of primary electrical diseases and predispose to sudden cardiac death (SCD) at any age. Genotype to phenotype correlations of *SCN5A* mutations remain unclear and, given the relative rarity of cardiac sodium channelopathies in the pediatric population, their clinical characteristics and outcomes need to be clarified, to better understand risk stratification in the young diagnosed with a given *SCN5A* mutation.

Methods: A multicenter, international, 1990-2015 retrospective cohort study was conducted in 25 tertiary hospitals in 13 different countries. All patients 16 years of age or younger diagnosed with a genetically confirmed *SCN5A* mutation, whatever the clinical diagnosis were included in the analysis.

Results: 423 children (233 men, 55.1%) fulfilled the study inclusion criteria, with a median age of 7.6 (0.0 to 16.7) years at diagnosis; 147 (34.7%) individuals were probands. Phenotypic spectrum was divided in 76 (18.0%) isolated LQT3, 33 (7.8%) isolated BrS type 1, 86 (20.3%) isolated PCCD, 3 (0.7%) isolated SSS and 102 (24.1%) overlap phenotypes; 123 (29.1%) kept a negative phenotype throughout follow-up. As in adults, the risk of arrhythmic events in children is high, especially when a spontaneous BrS, LQTS, PCCD or overlap phenotype is displayed but also in those with a negative phenotype. Phenotype varied according to mutation type, missense pathogenic mutations being more frequent than radical mutations or VUS in isolated LQT3, isolated PCCD and negative phenotype patients. ACA/SCD or syncope as first symptom as well as appropriate ICD shocks in implanted patients were more frequently observed in case of mutation located to the transmembrane region. Compound genotype, double *SCN5A* mutation, sinus node dysfunction, age ≤ 1 year at diagnosis and absence of family history of BrS, LQTS, PCCD or PM implantation and SD or ICD implantation were independent predictors of cardiac event giving new insights to identify high-risk subgroups in *SCN5A* mutation-positive infants and children.

Conclusion: In the largest series of *SCN5A* mutation carriers children, we found a high rate of cardiac events; ECG phenotype varied according to mutation type, whereas clinical severity was related to mutation location; several factors emerged as predictors of cardiac arrest or arrhythmic event.

Keywords: *SCN5A*; sodium channelopathy; Long QT syndrome; Brugada syndrome; cardiac conduction disorders; genotype-phenotype correlation.

Abbreviations.

ACA: aborted cardiac arrest; AF: atrial fibrillation; AV: atrioventricular; BrS: Brugada syndrome; DCM: dilated cardiomyopathy; ECG: 12-lead electrocardiogram; LQT3: long QT syndrome type 3; MEPPC: multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions; PCCD: progressive cardiac conduction disorders; QTc : corrected QT interval; SIDS: sudden infant death syndrome; SCD: sudden cardiac death; SSS: sick sinus syndrome; VF: ventricular fibrillation; VT: ventricular fibrillation; VUS: variant of unknown functional significance.

INTRODUCTION

Mutations in *SCN5A*, the gene encoding the alpha subunit of the cardiac sodium channel can lead to a wide range of primary electrical diseases and predispose to sudden cardiac death (SCD) at any age. Roughly two thirds of aborted cardiac arrests (ACA) in children and youth are due to inherited heart diseases, the most commonly implicated being cardiac sodium channelopathies (Wong 2014, Skinner 2013). Up to 15% of unexplained sudden infant deaths are attributed to sodium channelopathies (Wong 2014, Klaver 2011). Diagnosis is pivotal to further management of the child if he/she survives, and also to his/her relatives who may be at risk. Over the last two decades, an increasing number of *SCN5A* mutations have been described in both adults and children, associated with long QT syndrome type 3 (LQT3), Brugada syndrome (BrS), progressive cardiac conduction disorders (PCCD), atrial standstill and sick sinus syndrome (SSS), familial ventricular fibrillation (VF), familial atrial fibrillation (AF), sudden infant death syndrome (SIDS), multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions (MEPPC) and dilated cardiomyopathy (DCM). Combined genetic, electrophysiological and molecular studies have improved our understanding of these primary electrical diseases (Chen-Izu 2015, Abriel 2015, Veerman 2015). The clinical spectrum ranges from asymptomatic mutation carriers to inaugural sudden cardiac death because of incomplete penetrance and variable expressivity of the diseases (Liu 2014, Remme 2013). Cardiac sodium channelopathies have been diagnosed in infancy and early childhood because of symptoms or due to familial screening (Nannenbergh 2012, Kanter 2012). Age-related specificities have emerged, such as absence of male predominance and fever-triggered arrhythmias in BrS children or strong predisposition to recurrent cardiac arrest in LQTS infants who experienced a cardiac arrest during their first year of life (Chockalingam 2012, Probst 2007, Spazzolini 2009).

The number of detected asymptomatic mutation carriers children is increasing because of cascade genetic screening of relatives in the management of patients with inherited arrhythmia syndromes (Chockalingam 2015, Priori 2013). But in the same time, significant practice variation exists among pediatric electrophysiologists with deviation from accepted diagnostic and therapeutic practices for adult patients, especially regarding the asymptomatic *SCN5A* positive children (Harris 2014). This constatation raises the fact that lots of challenging questions remain unanswered in clinical practice and that genotype to phenotype correlations of *SCN5A* mutations remain unclear. Moreover, given the relative rarity of cardiac sodium channelopathies in the pediatric population, their clinical characteristics and outcomes need to be clarified, in order to better understand risk stratification in the young diagnosed with a given *SCN5A* mutation.

This study aimed to better assess the genotype-to-phenotype relationships and the risk analysis of the cardiac sodium channelopathies when diagnosed in infants and children.

METHODS

Study design. A multicenter, international, 1990-2015 retrospective cohort study was conducted in 25 tertiary hospitals in 13 different countries. After institutional review board approval was obtained from all participating institutions, pediatric cardiology database searches identified all patients 16 years of age or younger diagnosed with a genetically confirmed SCN5A mutation, whatever the clinical diagnosis. Both dead and alive patients were included. SCN5A single nucleotide polymorphisms were not included.

Definitions. Diagnosis of LQTS, BrS, PCCD and SSS were made according to the ESC/AEPC guidelines and to the HRS/EHRA/APHRS recommendations (Priori 2013, Priori 2015). SIDS was defined as an infant death of a seemingly healthy baby less than one year old, that cannot be explained after a thorough case investigation, including a scene investigation, autopsy and review of the clinical history (Moon 2011). The proband was defined as the first patient in a family diagnosed with a cardiac sodium channelopathy. The term non-proband was used to describe all other relatives regardless of symptoms or health status. A cardiac event was defined as occurrence of SCD, ACA, VF, monomorphic VT, polymorphic VT with torsade de pointes characteristics or syncope. The earliest documentation of a patient's conduction abnormality was used as the time of diagnosis of atrioventricular (AV) block.

Clinical investigations. Demographic data, personal and family history, symptoms and cardiac events, electrocardiogram (ECG) data, treatment and clinical status throughout follow-up were ascertained. Underlying structural cardiac abnormalities were excluded in all subjects by physical examination, chest X-ray and 2-dimensional echocardiography. Laboratory tests were done to exclude electrolyte or metabolic disturbances at the time of ECG recording. Patient treatment was based on the clinical judgment of the referring cardiologist. Exercise testing, drug testing with a sodium channel blocker and electrophysiological study results were also collected if available. Regarding the risk and the limits of the Na channel blocker challenge in pediatric population, this test was not considered as necessary to determine the clinical status of the patients. Exercise ECG parameters were measured at rest, at peak exercise and at 5-min recovery. In case of device implantation, pacing type and mode of pacing, or ICD type and number of appropriate/inappropriate shocks were noticed, as well as other device-related complications.

For actuarial survival analysis, patients were divided into 3 groups: (1) the cardiac arrest group gathering all infants and children whose first manifestation was a SIDS, SCD, ACA, documented ventricular tachycardia or VF; (2) the syncope group when the first clinical manifestation leading to diagnosis was a syncope; and the asymptomatic group when diagnosis was made by familial screening or after minor symptoms like isolated palpitations. A second analysis was made to compare outcomes of patients according to occurrence of cardiac events before the first year of age.

ECG analysis. The initial baseline, unpaced 12-lead ECG before therapy, was recorded in all patients. A second ECG tracing was recorded at time of pacemaker implantation or at last follow-up visit in non-paced patients. The ECGs were analyzed by 3 medical investigators. ECG readers were blinded regarding the phenotype of patients. The 3 ECG readers all analyzed each ECG, and measurements were then averaged. ECG parameters of interest were heart rate, PR interval, QRS complex and corrected QT (QTc) interval durations. Atrioventricular and intraventricular conduction disturbances were classified according to the age at the time of diagnosis using consensually agreed definitions and practice guidelines (Rijnbeek 2001, Schwartz 2002, Elizari 2007, Surawicz 2009, Fleming 2001). The QT interval was corrected for heart rate using the Bazett's formula (Bazett 1920, Phan 2015). Suggested QTc values for diagnosing QTc prolongation among our study population were QTc \geq 500 ms or QTc \geq 480 ms in case of cardiac event (Goldenberg 2006; Rautaharju 2009, Priori 2015).

Genetic analysis. Mutation analysis of the *SCN5A* gene followed standard accepted protocols for genetic testing and is described elsewhere (2,10). Amino acid numbering was made according to transcription variant 1 of *SCN5A* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NM_198056) and the predicted structure reported by Wang et al (Wang 1996), according to which the protein consists of 4 transmembrane domains, each composed of 6 segments. The biophysical properties, type and topological location of *SCN5A* mutations were determined on the basis of previously published data (Remme 2008, Meregalli 2009, Kapplinger 2010, Kapplinger 2015). It was verified that these DNA variants were disease-causative mutations, rather than polymorphisms, by generally accepted criteria (Giudicessi 2013, Ingles 2011): (a) localization of nonsynonymous single nucleotide variants to highly conserved amino acid residues/key functional domains and/or result in radical amino acid substitutions; (b) absence or extreme rarity of the variant in control cohorts or publicly available exome/genome datasets; (c) co-segregation of the variant with the disease phenotype; (d) nonsense, frameshift, or insertion/deletion mutations that lead to truncated protein products; (e) evidence of perturbed ion channel function through in-vitro functional studies.

Statistical analysis. Data were analyzed with the SPSS and SAS packages (SPSS Inc version 23,0, Chicago, Ill; SAS Institute Inc version 9,4, Cary, NC), We used the χ^2 or Fisher exact test to compare categorical variables. The Kruskal-Wallis tests were performed to test for statistical differences in continuous parameters. The mean event rate per year was evaluated by the number of events occurring during the follow-up divided by the number of patients multiplied by the average duration of follow-up. Continuous data are presented as mean, standard deviation, minimum, maximum, median. Kaplan-Meier method and the Cox proportional hazards model were used to evaluate the risk of clinical factors of interest to cardiac events or global mortality. Hazard ratios (HR) and confidence intervals (CI) are presented in univariate analysis. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant but to take into account multiplicity tests for phenotype analysis we used a value of $p < 0.01$. Mutation analysis involves only characteristics on the first mutation.

RESULTS

Demographic and clinical characteristics. A total of 423 children (233 men, 55.1%) fulfilled the study inclusion criteria, with a median age of 7.6 (0.0 to 16.7) years at diagnosis, 62% of patients being diagnosed before the age of 10 years old (Figure 1); 147 (34.7%) individuals were probands. Detailed phenotypes and family history are presented in Table 1. Phenotypic spectrum was divided in 76 (18.0%) isolated LQT3, 33 (7.8%) isolated BrS type 1 [BrS-1, spontaneously in 16 (3.8%), after drug challenge in 17 (4.0%)], 86 (20.3%) isolated PCCD, 3 (0.7%) isolated SSS and 102 (24.1%) overlap phenotypes; 123 (29.1%) kept a negative phenotype throughout follow-up. Thirteen (3.1%) patients without any ECG in their medical records were included in this later group, as no ECG phenotype was observed for them.

Of the 423 patients, postmortem genetic screening after SCD led to diagnosis in 13 (3.1%, 4 SIDS), aborted cardiac arrest in 50 (11.8%), syncope in 61 (14.4%) and lack of symptoms in 299 (70.7%) (Figure 2). Of these, 276 (65.3%) were identified during family screening and 23 (5.4%) during an ECG performed for palpitations. Cardiac arrest was the first symptom in 19.7% isolated LQT3, 15.1% isolated BrS-1, 13.9% isolated PCCD and 16.7% overlap phenotype patients. Clinical characteristics according to main phenotypes are summarized in Table 2. There was no significant difference between phenotypes regarding both gender and age at diagnosis.

A family history of PCCD or PM implantation was found in 28.4% of overlap phenotype patients, 25.6% of isolated PCCD patients, 21.2% of Brs-1 patients, 6.6% of isolated LQT3

patients and 14.6% of patients with a negative phenotype ($p=0.001$), whereas there was no difference in family history of sudden cardiac death or ICD implantation according to phenotypes. Of the 226 (53.4%) patients who had a family history of either SCD, aborted cardiac arrest, SIDS or ICD implantation, 45 (19.9%) had an isolated LQT3, 22 (9.7%) an isolated BrS-1, 46 (20.3%) an isolated PCCD, 48 (21.2%) an overlap syndrome and 65 (28.8%) a negative phenotype. Of the 81 (19.1%) patients who had a family history of pacemaker implantation, 5 (6.2%) had an isolated LQT3, 7 (8.6%) a BrS type 1, 22 (27.2%) an isolated PCCD, 29 (35.8%) an overlap syndrome and 18 (8.0%) a negative phenotype. Interestingly, of the 151 (35.7%) children who had a family history of BrS, only 34 (22.5%) displayed a BrS-1, 18 (11.9%) of them an isolated BrS-1; of the 122 (28.8%) patients who had a family history of LQTS, only 61 (50.0%) harboured a LQT3 phenotype, 39 (32.0%) of them an isolated LQT3; and of the 53 (12.5%) patients who had a family history of PCCD, 27 (50.9%) presented with PCCD, 13 (24.5%) of them with isolated PCCD.

ECG at diagnosis was available in 409 (96.7%) patients, with a mean heart rate of 85 ± 30 bpm, a mean PR interval of 157 ± 34 ms, a mean QRS complex of 85 ± 23 ms and a mean corrected QT interval of 438 ± 58 ms. Cardiac conduction disorders were observed in 171 (40.4%) patients, represented by an AV block in 166 [40.6%; first-degree AV block in 151 (36.9%), high grade AV block in 15 (3.7%)], a right bundle branch block (RBBB) in 173 [42.3%; incomplete RBBB in 122 (29.8%), complete RBBB in 51 (12.5%)] and a left bundle branch block (LBBB) in 16 [3.9%; incomplete LBBB in 11 (2.7%), complete LBBB in 5 (1.2%)].

Among the 413 patients who received a treatment (10 patients died at first presentation), 122 (29.5%) had an antiadrenergic therapy [betablocker in 121 (29.3%), left cardiac sympathetic denervation in 8 (1.9%)], 58 (14.0%) received a sodium channel blocker [mexiletine in 39 (9.4%) patients, hydroquinidine in 14 (3.4%), flecainide in 4 (1.0%), amiodarone in 3 (0.7%), lidocaine in 1 (0.2%)]. All patients received guidance on lifestyle modifications, such as aggressive antipyretic measures, the need to report to hospital for ECG monitoring during fever episodes and were given information to the drugs to be avoided if appropriate, as recommended by the ACC/AHA/ESC guidelines. ICD implantation was performed in 70 (16.9%) patients and PM implantation in 38 (9.2%), at a median age of 9.6 ± 5.7 and 6.6 ± 4.8 years respectively (endocardial leads in 53.6%; dual chamber device in 46.3%).

Genetic characteristics. Of the 423 *SCN5A* mutation-positive pediatric cases, 436 *SCN5A* mutations (184 unique mutations) were identified; 13 (3.1%) patients harbored double

SCN5A mutations and 9 (2.1%) had a compound genotype with an additional mutation in another gene: *KCNH2* (4 patients), *KCNQ1* (3 patients), *RYR2* (1 patient) or *CACNA1C* (1 patient) (Table 1). *SCN5A* mutations are listed in Table 4. Two-thirds (n=282, 66.7%) were missense pathogenic mutations, whereas the remaining third involved 103 (24.3%) radical mutations [80 (18.9%) truncation mutations and 23 (5.4%) in-frame mutations] and 38 (9.0%) missense variants of unknown functional significance (VUS).

Topological location is still ongoing for 78 (18.4%) mutations. In the others (345 mutations, 81.6%), 5 (1.2%) localized to the N-terminus, 198 (46.8%) localized to one of the 4 transmembrane-spanning regions [DI in 56 (13.2%), DII in 23 (5.4%), DIII in 53 (12.5%) and DIV in 66 (15.6%)], 44 (10.4%) localized to an interdomain linker [12 (2.8%) in IDL I-II, 15 (3.5%) in IDL II-III and 17 (4.0%) in IDL III-IV], and 98 (23.2%) localized to the C-terminus. Of the 198 cases whose *SCN5A* mutations were localized to one of the 4 transmembrane-spanning regions, 58 (13.7%) localized to either DI S1-S4, DII S1-S4, DIII S1-S4, or DIV S1-S4, 21 (5.0%) localized to either DI S4-S5, DII S4-S5, DIII S4-S5 or DIV S4-S5 and 119 (28.1%) localized to the S5, P-loop, and S6 regions containing the pore and selectivity filter of the sodium channel (DI S5-S6, DII S5-S6, DIII S5-S6, or DIV S5-S6).

Clinical outcomes and risk analysis. The mean follow-up period was 6.7±5.6 years [median: 5.6 (0.6-45.7) years]. Follow-up was significantly longer in the cardiac event group patients than in the asymptomatic group (8.1±7.5 vs 6.1±4.5 years; p<0.0001). During follow-up, 253 cardiac events occurred in 132 (30.1%) patients. During follow-up, 46 (10.9%) patients had recurrent arrhythmic events under treatment [1 recurrence in 5.9%, 2 recurrences in 1.9% and more than 3 in 3.1% (maximum: 16 events)]. Of the 70 children who received an ICD, 81 appropriate shocks were delivered [median number of shocks per patient: 1 (1 to 11), ≥1 appropriate ICD shock in 27 (38.6%)] and 12 inappropriate shocks were delivered [median number of shocks per patient: 1 (1 to 2), ≥1 appropriate ICD shock in 9 (12.9%)].

For every patients, we knew the date of birth and the exact age at which every cardiac events occurred, allowing us to generate curves that show the time interval from birth to the first major cardiac event (Figure 3) or from diagnosis to the first post-diagnosis cardiac event (Figure 4). It is noteworthy that patients harboring a negative phenotype were also exposed to a high risk of life-threatening arrhythmias, 8.1% of them presenting with cardiac arrest as first symptom, 4.9% experiencing sudden cardiac death, 18.7% having a least one cardiac event throughout follow-up and 7.3% undergoing ICD implantation. In univariate analysis, overlap phenotype patients experienced more cardiac events compared to those with a

negative phenotype (HR: 2.43, 95%CI: 1.45-4.07, $p=0.02$), as did isolated LQT3 patients (HR: 1.97, 95%CI: 1.13-3.45, $p=0.02$), isolated PCCD patients (HR: 1.89, 95%CI: 1.07-3.34, $p=0.02$) and isolated BrS-1 patients (HR: 1.56, 95%CI: 0.72-3.38, $p=0.02$) (Figure 3). However there was no statistical difference regarding the mortality rate between either BrS-1 and negative phenotype patients ($p=0.8$), LQT3 and negative phenotype patients ($p=0.8$), PCCD and negative phenotype patients ($p=0.8$) or overlap phenotype and negative phenotype patients ($p=0.8$).

Clinical risk factors for cardiac event are presented in Table 4. Sinus node dysfunction, AV block, RBBB, supraventricular arrhythmia and spontaneous LQTS phenotype were more frequent in the cardiac event group (Table 3). A corrected QT ≥ 500 ms was recorded in 78 (19.1%) patients: 34.8% of patients from the cardiac event group and 14.0% from the no cardiac event group ($p<0.0001$) (Table 3). Of the 165 patients who had available additional ECGs, cardiac conduction deteriorated in 47 (28.5%) in a median period of 1.0 (0.03 to 15.7 years), with 14 worsened or newly diagnosed AV block, 37 worsened or newly diagnosed RBBB, 9 worsened or newly diagnosed LBBB.

Patients with ACA/SCD as first symptom were more predisposed to undergo a second arrhythmic event than those with syncope as first symptom and those diagnosed while asymptomatic (64.4% vs 31.1%, HR: 3.01, 95%CI: 1.59-5.72, $p<0.0001$; and 64.4% vs 4.4%, HR: 99.9, 95%CI: 23.83-419.08, $p<0.0001$; respectively). Patients with syncope as first symptom were more predisposed to undergo a further arrhythmic event than those diagnosed while asymptomatic (31.1% vs 4.4%, HR: 33.2, 95%CI: 7.54-146.24, $p<0.0001$) (Figure 4).

Genotype-to-phenotype correlations. Double *SCN5A* mutation and compound genotype with associated mutation in another gene predisposed to cardiac event ($p=0.0003$ and $p=0.0003$ respectively) (Table 5).

Phenotype varied according to mutation type, as missense pathogenic mutations were more frequent than radical mutations or VUS in isolated LQT3 ($p=0.0003$), isolated PCCD ($p=0.003$) and negative phenotype patients ($p=0.04$). Missense pathogenic mutations were found in 69% of cases diagnosed before one year of age, whereas radical mutations were found in 29.6% and VUS in 1.4% ($p=0.0028$). However outcome parameters did not differ according to mutation type (Table 6).

There was no difference in phenotypes occurrence according to topological location of the *SCN5A* mutations (Tables 7 and 8). The event rate per patient-year differed according to

mutation location (Table 7) and ACA/SCD or syncope were more frequently observed as first symptom in case of mutation located to the transmembrane region ($p=0.002$ and $p=0.002$ respectively) (Table 7). No difference appeared in the ICD implantation rate according to the mutation location, but appropriate ICD shocks in implanted patients were more frequent in mutations located to the DI-DIV region ($p=0.09$), specifically in mutations located to the S5-S6 region ($p=0.07$) (Tables 7 and 8).

Multivariable analysis. In a multivariable analysis, compound genotype (HR: 4.65, 95%CI: 1.17-18.37, $p=0.02$), double *SCN5A* mutation (HR: 3.47, 95%CI: 1.45-8.27, $p=0.02$), sinus node dysfunction (HR: 4.32, 95%CI: 1.99-9.34, $p=0.0002$) and age ≤ 1 year at diagnosis (HR: 8.42, 95%CI: 5.06-14.01, $p<0.0001$) were predictors of cardiac event. Absence of family history of BrS (HR: 3.84, 95%CI: 2.15-6.87, $p<0.0001$), absence of family history of LQTS (HR: 4.56, 95%CI: 2.47-8.41, $p<0.0001$), absence of family history of PCCD or PM implantation (HR: 3.37, 95%CI: 1.25-9.09, $p=0.02$) and absence of family history of SCD or ICD implantation (HR: 1.98, 95%CI: 1.24-3.16, $p=0.04$) were independent predictors of cardiac event, whereas patients with no family history of BrS, LQTS, PCCD or PM implantation, and SCD or ICD implantation were probands in 40.8%, 38.9%, 31.6% and 42.6% of cases respectively. The results of SV arrhythmia ($p=0.06$), cQT ≥ 500 ms ($p=0.06$), AV block ($p=0.19$), RBBB ($p=0.13$) and overlap phenotype ($p=0.25$) were not predictive of cardiac event, however.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this study constitutes the largest pediatric cohort of *SCN5A* mutation carriers reported to date, including 423 genotype-positive children with 436 *SCN5A* mutations. Polymorphisms were not included in this study, so that all studied children harboured *SCN5A* disease-causative mutations. Our major results are that double *SCN5A* mutation, compound genotype with associated mutation in another gene, sinus node dysfunction, an early diagnosis ≤ 1 year of age and absence of family history of cardiac channelopathy or arrhythmic event are strongly predictors of cardiac event; phenotype is associated with mutation type but clinical outcomes depend on mutation topological location.

Cardiac sodium channelopathies: data need in children. Over the past decade, the discovery that *SCN5A* mutations serve as the primary genetic substrate for the spectrum of SCD-predisposing inherited cardiac sodium channelopathies has impacted profoundly how these genetic disorders are diagnosed, risk stratified, and managed clinically (Remme 2013, Abriel 2015). While the availability of genetic testing provides an important opportunity to

identify and deliver prophylactic treatment to genotype-positive individuals at risk for potentially lethal cardiac arrhythmias, it has also exposed the glaring fact that the cardiac channelopathies, like many monogenic disorders, exhibit incomplete penetrance and variable expressivity whereby family members who harbor the same disease-causative mutation often assume vastly different clinical courses. In the case of the cardiac channelopathies, the expressivity spectrum of genotype-positive individuals ranges from overt ECG abnormalities and arrhythmia-triggered cardiac events such as syncope, out-of-hospital cardiac arrest or SCD to the absence of any discernible features on ECG and a lifelong asymptomatic state. Risk stratification and appropriate management of infants and children who are diagnosed with a *SCN5A* mutation remain a clinical challenge because despite a relatively low event rate, the presenting symptom is often cardiac arrest (Schwartz 2001, Adler 2015), which is confirmed by our finding that cardiac arrest led to diagnosis in 14.4% of our cases. The rarity of cardiac sodium channelopathy cases in childhood makes data hard to come by, the largest series of *SCN5A* mutation-positive BrS-1 children and of LQT3 children published to date including less than 40 cases (Conte 2014, Blaufox 2012, Probst 2007). Although huge efforts have been made over the past 20 years to better assess gene-specific triggers (Schwartz 2001), gene-specific therapy (Schwartz 1995) or gene-specific risk stratification (Priori 2003) in LQTS patients, several questions remain regarding genotype-to-phenotype correlations in *SCN5A* mutation-positive patients whatever their clinical diagnosis, especially when diagnosed in infancy or childhood. Indeed, genotype-to-phenotype correlation studies in children affected by cardiac sodium channelopathies have been limited because of the low prevalence of mutation carriers. A clinical dilemma arises from the fact that disease penetrance and expressivity are highly variable, notably in BrS and LQT3 (Remme 2013). This is particularly troublesome because the only generally accepted treatment for preventing SCD in cardiac sodium channelopathies is an implantable cardioverter-defibrillator (Priori 2015). Clearly, the genetic determinants underlying the incomplete penetrance, variable expressivity, and phenotypic overlap observed in the cardiac sodium channelopathies remain poorly understood and new tools for risk stratification are much needed, especially regarding the pediatric population.

Over the past two decades, the progressive unraveling of genetic and clinical underpinnings of cardiac sodium channelopathies, mainly LQT3 and BrS, has led to the enumeration of numerous clinically meaningful genotype-to-phenotype correlations that have unlocked previously unforeseen management strategies and enabled genotype-based management of LQTS patients, identification of key functional domains and probability of *SCN5A* variants to play a role in disease occurrence according to their topological location, and understanding of some age-related specificities as well (Giudicessi 2013, Schwartz 2013). However,

intragenic risk stratification in *SCN5A* mutation carriers, based on mutation nature and/or location is not a possibility today (Schwartz 2013, Schwartz 2015).

Correlation between genotype and ECG phenotype. We found no overrepresented domain when looking at the N-terminus domain, the DI-DIV region and the C-terminus domain among the five main ECG phenotypes and no difference appeared when considering the 6 segments of the transmembrane domains. However, in a recent case/control study, Kapplinger et al. were able to identify regions of Nav1.5 associated with a high probability of pathogenicity in both BrS and LQT3 (Kapplinger 2015, Kapplinger 2010). In their study, the transmembrane region yielded an overrepresentation of BrS-associated variants, whereas the DIII/DIV interdomain linker and the S3-S5+6 segment of all transmembrane domains hosted an overrepresentation of LQT3-associated variants (Kapplinger 2015). These differences are likely due to ascertainment biases inherent to each study design. Two additional analyses could help us to propose a more accurate approach: (a) to calculate separately for the 4-transmembrane domains (DI through DIV), the 6 segments of the transmembrane domains (S1 through S6) and 3 interdomain linkers (DI/DII, DII/DIII and DIII/DIV), as subregions within the transmembrane and interdomain linkers may impart different biogenic and biophysical properties thereby making specific subregions more or less likely to harbor pathogenic LQTS-associated variants, BrS-associated variants, PCCD-associated variants, overlap phenotype-associated variants and negative-phenotype variants; (b) to consider, for a given phenotype, every single case of this phenotype, including not only the isolated cases but also the one involved in an overlap syndrome. This latter approach would probably improve the accuracy of our analyses, leading us to consider 158 LQT3-causative mutations versus 76 isolated LQT3 cases, 61 BrS-1-causative mutations versus 33 isolated BrS-1 cases and 171 PCCD-causative mutations versus 86 isolated PCCD cases.

When considering the nature of *SCN5A* mutations in our series, missense pathogenic mutations were overrepresented compared to radical mutations and VUS in both isolated LQT3 and isolated BrS-1 cases. In a previous report of loss-of-function cardiac sodium channelopathies in 33 children, there were more radical mutations, but the small size of the studied population do not allow comparison (Chockalingam 2012). Given the role of I_{Na} reduction in the pathophysiology of BrS and PCCD, we could hypothesize that those *SCN5A* mutations that reduce I_{Na} the most cause the most severe phenotype, and may lead to an overlap phenotype associating BrS and PCCD. Our analysis could be improved in loss-of-function *SCN5A* mutations by considering truncation mutations, functionally inactive missense mutations (defined as missense mutations that resulted in >90% peak I_{Na}

reduction in patch-clamp studies) and functionally active missense mutations (defined as missense mutations with $\leq 90\%$ peak INa reduction) (Meregalli 2009).

Correlation between genotype and clinical severity. Children with *SCN5A* mutation in our cohort were highly symptomatic, in that 14.9% presented with SCD or ACA, 14.4% with syncope, and 30.1% experienced arrhythmic event throughout follow-up. The incidence of cardiac events was comparable to a 43 LQT3 children series from a recently published multicenter international study (Blaufox 2012) but higher than has been reported from other LQT3 or BrS series in the past (Schwartz 2001, Zareba 2003, Probst 2007). The differences in study design make it difficult to directly compare our study with those involving populations of mixed LQTS genotypes, because in each of these studies, LQT3 patients accounted for less than 10% of genotyped patients, leading the rates of cardiac event being likely to be most representative of the rates of LQT1 and LQT2 patients. Moreover the rate of SCD or ACA in our *SCN5A* mutation-positive cohort was 14.9%, in accordance with a recent report on LQT3 children (Blaufox 2012) but significantly higher than that reported in BrS children (Probst 2007, Conte 2014). This may reflect the overrepresentation of LQT3 phenotypes in our cohort, as it is widely known that LQT3 patients tend to experience the highest rate of breakthrough cardiac events, even while on beta-blocker therapy (Schwartz 2001, Priori 2004, Schwartz 2009). As a result, there has been increasing interest in targeting the pathogenic late sodium current produced by LQT3-causative *SCN5A* gain-of-function mutations with a combination of a beta-blocker and an adjuvant sodium channel blocker as a LQT3 specific management therapy (Schwartz 2009, Ruan 2007, Moss 2008). However, despite the successful use of a combination of beta-blocker and sodium channel blocker to treat isolated cases of malignant perinatal LQT3 patients (Wang 2008) the effect of sodium channel blockers appear to be largely mutation-specific (Ruan 2007), necessitating a cumbersome drug challenge under continuous ECG monitoring to assess both therapeutic efficacy and the potential of eliciting an unwanted BrS-1 ECG pattern given the pleiotropic nature of some *SCN5A* mutations (Priori 2000). Our results fully support these previous findings, as cardiac arrest was the first symptom in 19.7% of the 76 isolated LQT3 children who carried an 2.8% rate of arrhythmic event per patient year throughout a 7 years follow-up.

Gender difference appeared neither in phenotype repartition nor in the risk analysis for cardiac event, whereas previous studies had indicated that BrS was predominant in male subjects (Eckardt 2005) and that life-threatening events were higher among LQT3 men than LQT3 women (Priori 2003); our results are concordant with previous pediatric reports (Probst 2007, Chockalingam 2012) and are probably explained by the fact that levels of testosterone

are low in children of both sexes. However, the molecular mechanisms underlying sex-related differences in electrophysiology are poorly understood.

We found that double *SCN5A* mutation, compound genotype, sinus node dysfunction and age ≤ 1 year at diagnosis were independent predictors of cardiac event. It was previously known that double *SCN5A* mutation carriers showed a more severe phenotype with a longer corrected QT interval, a younger age at diagnosis and more occurrence of cardiac events despite therapy (Schwartz 2010, Schwartz 2012). The analysis of 212 patients from the International LQTS Registry who had an ECG recorded in the first year of life shown that LQTS patients who experience ACA during their first year of life are at very high risk for subsequent ACA or SCD during their next 10 years of life, and beta-blockers might not be effective in preventing fatal cardiac events in this high-risk subset (Spazzolini 2009). Our results extend this observation to all *SCN5A* mutated children, identifying that an early diagnosis before 1 year of age was an independent predictor of cardiac event. Sinus node dysfunction represent a high-risk subgroup, which may lead to consider a more aggressive treatment and a more focused follow-up in these patients.

Surprisingly, absence of family history of BrS, of LQTS, of PCCD or PM implantation and absence of family history of SCD or ICD implantation were independent predictors of cardiac event. This observation is not biased by the fact that those children were more frequently probands, as patients with no family history of BrS, LQTS, PCCD or PM implantation, and SCD or ICD implantation were probands in 40.8%, 38.9%, 31.6% and 42.6% of cases respectively. Based on this unexpected result, we can wonder if patients without any significant family history might represent *de novo* mutations, and if so, if *de novo* *SCN5A* mutations might be more pathogenic than the other ones. Indeed, it should be kept in consideration that not all genetic arrhythmias would have a family history, as in many cases arrhythmia causal mutation are *de novo* in origin and it has been shown that *de novo* mutation in the *SCN5A* gene associated with early onset of sudden infant death (Wedekind 2001). Anyway, *SCN5A* mutation-positive patients with no family history constitute a subgroup at high-risk of cardiac arrest and arrhythmic event and should be treated accordingly.

CONCLUSIONS

We present here the results of the largest series, to the best of our knowledge, of *SCN5A* mutation carriers children. Our inability to accurately risk stratify genotype-positive individuals highlights the need to deepen our understanding of the complex genetic background that

modulates the penetrance/expressivity of *SCN5A* mutations as well as to develop further genotype-, intragenic-, and mutation-specific approaches to risk stratification and eventually treatment of cardiac sodium channelopathies. As in adults, the risk of arrhythmic events in children is high, especially when a spontaneous BrS, LQTS, PCCD or overlap phenotype is displayed but also in those with a negative phenotype. Phenotype varied according to mutation type, missense pathogenic mutations being more frequent than radical mutations or VUS in isolated LQT3, isolated PCCD and negative phenotype patients. ACA/SCD or syncope as first symptom as well as appropriate ICD shocks in implanted patients were more frequently observed in case of mutation located to the transmembrane region. Compound genotype, double *SCN5A* mutation, sinus node dysfunction, age ≤ 1 year at diagnosis and absence of family history of BrS, LQTS, PCCD or PM implantation and SD or ICD implantation were independent predictors of cardiac event giving new insights to identify high-risk subgroups in *SCN5A* mutation-positive infants and children.

Acknowledgements: none

Financial disclosure: None of the authors has any financial relationships relevant to this article to disclose. Dr. Baruteau is supported by the French Federation of Cardiology, the 2015 Academic Research Grant from the European Heart Rhythm Association and a research grant from the Lefoulon Delalande Foundation-Institut de France.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Wong LC, Behr ER. Sudden unexplained death in infants and children: the role of undiagnosed inherited cardiac conditions. *Europace*. 2014;16:1706-13.
- Skinner JR. Investigation following resuscitated cardiac arrest. *Arch Dis Child*. 2013;98:66-71.
- Klaver EC, Versluijs GM, Wilders R. Cardiac ion channel mutations in the sudden infant death syndrome. *Int J Cardiol*. 2011;152:162-70.
- Chen-Izu Y, Shaw RM, Pitt GS, Yarov-Yarovoy V, Sack JT, Abriel H, Aldrich RW, Belardinelli L, Cannell MB, Catterall WA, Chazin WJ, Chiamvimonvat N, Deschenes I, Grandi E, Hund TJ, Izu LT, Maier LS, Maltsev VA, Marionneau C, Mohler PJ, Rajamani S, Rasmusson RL, Sobie EA, Clancy CE, Bers DM. Na⁺ channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *J Physiol*. 2015;593:1347-60.
- Abriel H, Rougier JS, Jalife J. Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. *Circ Res*. 2015;116:1971-88.
- Veerman CC, Wilde AA, Lodder EM. The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene*. 2015;573:177-87.
- Remme CA. Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects. *J Physiol*. 2013;591:4099-116.
- Liu M, Yang KC, Dudley SC Jr. Cardiac sodium channel mutations: why so many phenotypes? *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:607-15.
- Nannenberg EA, Sijbrands EJ, Dijkman LM, Alders M, van Tintelen JP, Birnie M, van Langen IM, Wilde AA. Mortality of inherited arrhythmia syndromes: insight into their natural history. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:183-9.
- Kanter RJ, Pfeiffer R, Hu D, Barajas-Martinez H, Carboni MP, Antzelevitch C. Brugada-like syndrome in infancy presenting with rapid ventricular tachycardia and intraventricular conduction delay. *Circulation*. 2012;125:14-22.
- Chockalingam P, Clur SA, Breur JM, Kriebel T, Paul T, Rammeloo LA, Wilde AA, Blom NA. The diagnostic and therapeutic aspects of loss-of-function cardiac sodium channelopathies in children. *Heart Rhythm*. 2012;9:1986-92.
- Probst V, Denjoy I, Meregalli PG, Amirault JC, Sacher F, Mansourati J, Babuty D, Villain E, Victor J, Schott JJ, Lupoglazoff JM, Mabo P, Veltmann C, Jesel L, Chevalier P, Clur SA, Haissaguerre M, Wolpert C, Le Marec H, Wilde AA. Clinical aspects and prognosis of Brugada syndrome in children. *Circulation*. 2007;115:2042-8.
- Spazzolini C, Mullally J, Moss AJ, Schwartz PJ, McNitt S, Ouellet G, Fugate T, Goldenberg I, Jons C, Zareba W, Robinson JL, Ackerman MJ, Benhorin J, Crotti L, Kaufman ES, Locati EH, Qi M, Napolitano C, Priori SG, Towbin JA, Vincent GM. Clinical implications for patients with long QT syndrome who experience a cardiac event during infancy. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:832-7.
- Chockalingam P, Mizusawa Y, Wilde AA. Channelopathies - emerging trends in the management of inherited arrhythmias. *Indian Pacing Electrophysiol J*. 2015;15:43-54.

Harris BU, Miyake CY, Motonaga KS, Dubin AM. Diagnosis and management of pediatric brugada syndrome: a survey of pediatric electrophysiologists. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2014;37:638-42.

Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm.* 2013;10:1932-63.

Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck KH, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekvål TM, Spaulding C, Van Veldhuisen DJ. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J.* 2015 Aug 29. pii: ehv316. [Epub ahead of print].

Moon RY; Task Force on Sudden Infant Death Syndrome. SIDS and other sleep-related infant deaths: expansion of recommendations for a safe infant sleeping environment. *Pediatrics.* 2011;128:1030–1039.

Bazett H. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart* 1920;7:353–70.

Phan DQ, Silka MJ, Lan YT, Chang RK. Comparison of formulas for calculation of the corrected QT interval in infants and young children. *J Pediatr.* 2015;166:960-4.e1-2.

Rijnbeek PR, Witsenburg M, Schrama E, Hess J, Kors JA. New normal limits for the paediatric electrocardiogram. *Eur Heart J.* 2001;22:702-11.

Schwartz PJ, Garson A Jr, Paul T, Stramba-Badiale M, Vetter VL, Wren C; European Society of Cardiology. Guidelines for the interpretation of the neonatal electrocardiogram. A task force of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2002;23:1329-44.

Elizari MV, Acunzo RS, Ferreiro M. Hemiblocks revisited. *Circulation.* 2007;115:1154-63.

Surawicz B, Childers R, Deal BJ, Gettes LS, Bailey JJ, Gorgels A, Hancock EW, Josephson M, Kligfield P, Kors JA, Macfarlane P, Mason JW, Mirvis DM, Okin P, Pahlm O, Rautaharju PM, van Herpen G, Wagner GS, Wellens H; American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; American College of Cardiology Foundation; Heart Rhythm Society. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part III: intraventricular conduction disturbances: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society. Endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:976-81.

Fleming S, Thompson M, Stevens R, Heneghan C, Plüddemann A, Maconochie I, Tarassenko L, Mant D. Normal ranges of heart rate and respiratory rate in children from birth to 18 years of age: a systematic review of observational studies. *Lancet.* 2011;377:1011-8.

Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W. QT interval: how to measure it and what is "normal". *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006;17:333-6.

Rautaharju PM, Surawicz B, Gettes LS, Bailey JJ, Childers R, Deal BJ, Gorgels A, Hancock EW, Josephson M, Kligfield P, Kors JA, Macfarlane P, Mason JW, Mirvis DM, Okin P, Pahlm O, van Herpen G, Wagner GS, Wellens H; American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; American College of Cardiology Foundation; Heart Rhythm Society. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part IV: the ST segment, T and U waves, and the QT interval: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society. Endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:982-91.

Remme CA, Wilde AA, Bezzina CR. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18:78-87.

Meregalli PG, Tan HL, Probst V, Koopmann TT, Tanck MW, Bhuiyan ZA, Sacher F, Kyndt F, Schott JJ, Albuissou J, Mabo P, Bezzina CR, Le Marec H, Wilde AA. Type of SCN5A mutation determines clinical severity and degree of conduction slowing in loss-of-function sodium channelopathies. *Heart Rhythm.* 2009;6:341-8.

Kapplinger JD, Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Callis TE, Valdivia CR, Makielski JC, Wilde AA, Ackerman MJ. Enhanced Classification of Brugada Syndrome-Associated and Long-QT Syndrome-Associated Genetic Variants in the SCN5A-Encoded Nav1.5 Cardiac Sodium Channel. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015;8:582-95.

Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, Brugada P, Fressart V, Guerchicoff A, Harris-Kerr C, Kamakura S, Kyndt F, Koopmann TT, Miyamoto Y, Pfeiffer R, Pollevick GD, Probst V, Zumhagen S, Vatta M, Towbin JA, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Antzelevitch C, Salisbury BA, Guicheney P, Wilde AA, Brugada R, Schott JJ, Ackerman MJ. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2010;7:33-46.

Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation.* 2001;103:89-95.

Adler A, Rosso R, Chorin E, Havakuk O, Antzelevitch C, Viskin S. Risk stratification in Brugada syndrome: Clinical characteristics, electrocardiographic parameters, and auxiliary testing. *Heart Rhythm.* 2015 Sep 1. pii: S1547-5271(15)01128-5. doi: 10.1016/j.hrthm.2015.08.038. [Epub ahead of print]

Conte G, Dewals W, Sieira J, de Asmundis C, Ciconte G, Chierchia GB, Di Giovanni G, Baltogiannis G, Saitoh Y, Levinstein M, La Meir M, Wellens F, Pappaert G, Brugada P. Drug-induced brugada syndrome in children: clinical features, device-based management, and long-term follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:2272-9.

Blaufox AD, Tristani-Firouzi M, Seslar S, Sanatani S, Trivedi B, Fischbach P, Paul T, Young ML, Tisma-Dupanovic S, Silva J, Cuneo B, Fournier A, Singh H, Tanel RE, Etheridge SP. Congenital long QT 3 in the pediatric population. *Am J Cardiol.* 2012;109:1459-65.

Remme CA, Wilde AA, Bezzina CR. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18:78-87.

Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y, Remme CA, Gourraud JB, Simonet F, Verkerk AO, Schwartz PJ, Crotti L, Dagradi F, Guicheney P, Fressart V, Leenhardt A, Antzelevitch C, Bartkowiak S, Borggrefe M, Schimpf R, Schulze-Bahr E, Zumhagen S, Behr ER, Bastiaenen R, Tfelt-Hansen J, Olesen MS, Kääh S, Beckmann BM, Weeke P, Watanabe H, Endo N, Minamino T, Horie M, Ohno S, Hasegawa K, Makita N, Nogami A, Shimizu W, Aiba T, Froguel P, Balkau B, Lantieri O, Torchio M, Wiese C, Weber D, Wolswinkel R, Coronel R, Boukens BJ, Bézieau S, Charpentier E, Chatel S, Despres A, Gros F, Kyndt F, Lecointe S, Lindenbaum P, Portero V, Violleau J, Gessler M, Tan HL, Roden DM, Christoffels VM, Le Marec H, Wilde AA, Probst V, Schott JJ, Dina C, Redon R. Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat Genet.* 2013;45:1044-9.

Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantù F, Towbin JA, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, Chen LS. Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na⁺ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation.* 1995;92:3381-6.

Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2003;348:1866-74.

Schwartz PJ, Crotti L, Insolia R. Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5:868-77.

Ingles J, Zodgekar PR, Yeates L, Macciocca I, Semsarian C, Fatkin D; CSANZ Cardiac Genetic Diseases Council Writing Group. Guidelines for genetic testing of inherited cardiac disorders. *Heart Lung Circ.* 2011; 20:681–687.

Giudicessi JR, Ackerman MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Transl Res.* 2013;161:1-14.

Schwartz PJ, Ackerman MJ, George AL Jr, Wilde AA. Impact of genetics on the clinical management of channelopathies. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:169-80.

Schwartz PJ, Ackerman MJ. The long QT syndrome: a transatlantic clinical approach to diagnosis and therapy. *Eur Heart J.* 2013;34:3109-16.

Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Grillo M, Bloise R, Ronchetti E, Moncalvo C, Tulipani C, Veia A, Bottelli G, Nastoli J. Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *JAMA.* 2004;292:1341-4.

Zareba W, Moss AJ, Locati EH, Lehmann MH, Peterson DR, Hall WJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Priori SG, Benhorin J, Towbin JA, Robinson JL, Andrews ML, Napolitano C, Timothy K, Zhang L, Medina A; International Long QT Syndrome Registry. Modulating effects of age and gender on the clinical course of long QT syndrome by genotype. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:103-9.

Etheridge SP, Sanatani S, Cohen MI, Albaro CA, Saarel EV, Bradley DJ. Long QT syndrome in children in the era of implantable defibrillators. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1335-40.

Schwartz PJ, Spazzolini C, Priori SG, Crotti L, Vicentini A, Landolina M, Gasparini M, Wilde AA, Knops RE, Denjoy I, Toivonen L, Mönnig G, Al-Fayyadh M, Jordaens L, Borggrefe M,

Holmgren C, Brugada P, De Roy L, Hohnloser SH, Brink PA. Who are the long-QT syndrome patients who receive an implantable cardioverter-defibrillator and what happens to them?: data from the European Long-QT Syndrome Implantable Cardioverter-Defibrillator (LQTS ICD) Registry. *Circulation*. 2010;122:1272-82.

Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L. All LQT3 patients need an ICD: true or false? *Heart Rhythm*. 2009;6:113-20.

Ruan Y, Liu N, Bloise R, Napolitano C, Priori SG. Gating properties of SCN5A mutations and the response to mexiletine in long-QT syndrome type 3 patients. *Circulation*. 2007;116:1137-44.

Moss AJ, Zareba W, Schwarz KQ, Rosero S, McNitt S, Robinson JL. Ranolazine shortens repolarization in patients with sustained inward sodium current due to type-3 long-QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008; 19:1289–93.

Wang DW, Crotti L, Shimizu W, Pedrazzini M, Cantu F, De Filippo P, et al. Malignant perinatal variant of long-QT syndrome caused by a profoundly dysfunctional cardiac sodium channel. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2008; 1:370–8.

Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Bloise R, Crotti L, Ronchetti E. The elusive link between LQT3 and Brugada syndrome: the role of flecainide challenge. *Circulation*. 2000; 102:945–7.

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;111:257–263.

Wedekind H, Smits JP, Schulze-Bahr E, Arnold R, Veldkamp MW, Bajanowski T, Borggrefe M, Brinkmann B, Warnecke I, Funke H, Bhuiyan ZA, Wilde AA, Breithardt G, Haverkamp W. De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death. *Circulation*. 2001;104:1158 –1164.

Table 1: Phenotypes and family history (n=423)

| Phenotype and family history | n (%) |
|---|--------------|
| Phenotype | |
| Negative phenotype | 123 (29.1) |
| LQT3 | 158 (37.3) |
| Isolated LQT3 | 76 (18.0) |
| Overlap phenotype including LQT3 | 82 (19.4) |
| Concealed LQT3 (revealed by exercise testing) | 14 (3.3) |
| BrS-1 | 61 (14.4) |
| Isolated BrS-1 | 33 (7.8) |
| Overlap phenotype including BrS-1 | 28 (6.6) |
| Drug-induced BrS-1 | 17 (4.0) |
| PCCD | 171 (40.4) |
| Isolated PCCD | 86 (20.3) |
| Overlap phenotype including PCCD | 85 (20.1) |
| SSS | 19 (4.5) |
| Isolated SSS | 3 (0.7) |
| Overlap phenotype including SSS | 16 (3.8) |
| DCM | 7 (1.6) |
| Isolated DCM | 0 (0.0) |
| Overlap phenotype including DCM | 7 (1.6) |
| Overlap phenotype | 102 (24.1) |
| LQT3 and BrS-1 | 7 (1.6) |
| LQT3 and PCCD | 53 (12.5) |
| LQT3 and SSS | 5 (1.2) |
| LQT3 and DCM | 4 (0.9) |
| BrS-1 and PCCD | 14 (3.3) |
| PCCD and SSS | 3 (0.7) |
| PCCD and DCM | 2 (0.5) |
| LQT3 and BrS-1 and PCCD | 5 (1.2) |
| LQT3 and BrS-1 and SSS | 1 (0.2) |
| LQT3 and PCCD and SSS | 6 (1.4) |
| LQT3 and PCCD and DCM | 1 (0.2) |
| BrS-1 and PCCD and SSS | 1 (0.2) |
| Family history | |
| Sudden death | 130 (30.7) |
| Including SIDS | 25 (5.9) |
| Aborted cardiac arrest | 68 (16.1) |
| Syncope | 144 (34.0) |
| Atrial fibrillation | 18 (4.2) |
| PCCD | 53 (12.5) |
| DCM | 13 (3.1) |
| PM implantation | 63 (14.9) |
| ICD implantation | 132 (31.2) |

Table 2: Clinical characteristics according to main phenotypes

| | Isolated LQT3 (n=76) | Isolated BrS-1 (n=33) | Isolated PCCD (n=86) | Overlap phenotype (n=102) | Negative phenotype (n=123) | p value |
|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|---|----------------|
| Male, n (%) | 42 (55.3) | 16 (48.5) | 50 (58.1) | 65 (63.7) | 60 (48.8) | 0.2 |
| Age at diagnosis, yrs | 8.8 (0.0-15.5) | 6.1 (0.1-15.7) | 5.9 (0.0-16.1) | 9.3 (0.0-16.7) | 8.1 (0.0-16.0) | 0.51 |
| CA as first symptom, n (%) | 15 (19.7) | 5 (15.1) | 12 (13.9) | 17 (16.7) | 10 (8.1) | 0.18 |
| FH of SD-ICD | 45 (59.2) | 22 (66.7) | 46 (53.5) | 48 (47.1) | 65 (52.8) | 0.29 |
| FH of CCD-PM | 5 (6.6) | 7 (21.2) | 22 (25.6) | 29 (28.4) | 18 (14.6) | 0.001 |
| FU length, yrs | 7.1 (0.0-45.7) | 6.1 (0.0-15.5) | 5.2 (0.6-35.7) | 5.2 (0.7-44.3) | 4.7 (0.0-25.9) | |
| PM, n (%) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 8 (9.3) | 29 (28.4) | 0 (0.0) | <0.0001 |
| ICD, n (%) | 19 (25.0) | 6 (18.2) | 13 (15.1) | 23 (22.5) | 9 (7.3) | 0.006 |
| SVT, n (%) | 4 (5.3) | 0 (0.0) | 3 (3.5) | 9 (8.8) | 0 (0.0) | 0.003 |
| CE, n (%) | 29 (38.2) | 9 (27.3) | 27 (31.4) | 44 (43.1) | 23 (18.7) | 0.02 |
| Event rate /patient year | 2.8 | 2.2 | 2.8 | 3.6 | 1.5 | 0.02 |
| Death, n (%) | 4 (5.3) | 1 (3.0) | 2 (2.3) | 3 (2.9) | 6 (4.9) | 0.8 |

CA: cardiac arrest; FH: family history; "SD-ICD" includes sudden cardiac death, aborted cardiac arrest, sudden infant death syndrome, ICD implantation; CCD: cardiac conduction disorder; PM: pacemaker; FU: follow-up; ICD: implantable cardioverter defibrillator; CE: cardiac event; "death" means sudden death or heart transplantation.

Table 3: Relations between ECG characteristics and cardiac event

| | No cardiac event | Cardiac event | HR, 95%IC | p value |
|-----------------------------|------------------|---------------|-----------------|---------|
| ECG parameters | | | | |
| Age at ECG, mean ± SD | 8.1 ± 5.0 | 8.2 ± 6.9 | 0.86, 0.8-0.93 | 0.0002 |
| Heart rate, bpm | 85.5 ± 31 | 84.0 ± 29 | 1.01, 0.99-1.02 | 0.15 |
| PR interval, ms | 156 ± 33 | 160 ± 34 | 1, 0.99-1.01 | 0.71 |
| QRS complex, ms | 84 ± 21 | 86 ± 28 | 1, 0.99-1.02 | 0.64 |
| QT interval, ms | 372 ± 68 | 400 ± 88 | 1, 1.0-1.01 | 0.07 |
| cQT interval, ms | 430 ± 50 | 455 ± 71 | 1.13, 1.07-1.21 | <0.0001 |
| cQT ≥500 ms | 38 (14.0) | 40 (34.8) | 2.19, 1.49-3.21 | <0.0001 |
| cQT ≥550 ms | 6 (2.2) | 12 (10.4) | 2.64, 1.45-4.81 | 0.0014 |
| ECG diagnosis | | | | |
| Sinus node dysfunction | 8 (2.8%) | 11 (9.1%) | 2.42, 1.3-4.51 | 0.01 |
| Cardiac conduction disorder | 154 (53.7%) | 82 (67.8%) | 1.87, 1.28-2.75 | 0.001 |
| AV block (any grade) | 107 (37.3%) | 59 (48.4%) | 1.65, 1.16-2.36 | 0.006 |
| RBBB (any grade) | 113 (39.3%) | 60 (49.6%) | 1.58, 1.11-2.26 | 0.01 |
| LBBB (any grade) | 10 (3.4%) | 6 (4.9%) | 1.54, 0.68-3.51 | 0.3 |
| SV arrhythmia, n (%) | 4 (1.4) | 12 (9.4) | 3.69, 2.03-6.69 | <0.0001 |
| Spontaneous BrS-1 pattern | 22 (7.7%) | 13 (10.7%) | 1.31, 0.74-2.34 | 0.35 |
| Spontaneous LQTS | 31 (10.8%) | 36 (29.8%) | 2.3, 1.56-3.39 | <0.0001 |

cQT: corrected QT interval; AV: atrioventricular; RBBB: right bundle branch block; LBBB: left bundle branch block; SV: supraventricular; BrS-1: Brugada syndrome type 1; LQTS: long QT syndrome.

Table 4: SCN5A mutations (436 mutations, 184 unique mutations)

| SCN5A mutations | exon | Aminoacid changes | Effect | n |
|---|-------------|--------------------------|------------------|----------|
| Truncation mutations [n=80 (17.7%), 44 distinct mutations] | | | | |
| c127C>T | 2 | pArg43* | Loss of function | 1 |
| c268del | 2 | pGln90Trpfs*14 | Loss of function | 1 |
| c393-1C>T | 4 | | Loss of function | 1 |
| c468G>A | 4 | pTrp156* | Loss of function | 2 |
| c611+1G>A | 5 | | Loss of function | 2 |
| c703+1G>A | 6 | | Loss of function | 1 |
| c870del | 7 | pAsn291Thrfs*52 | Loss of function | 2 |
| c934+1G>A | 7 | | Loss of function | 2 |
| c1036G>T | 9 | pGlu346* | Loss of function | 1 |
| c1603C>T | 12 | pArg535* | Loss of function | 4 |
| c1890G>A | 12 | pThr631Valfs*101 | Loss of function | 3 |
| c1936del | 13 | pGln646Argfs*5 | Loss of function | 7 |
| c2184_2186del | 14 | pLeu729del | Loss of function | 1 |
| c2320del | 15 | pTyr774Thrfs*28 | Loss of function | 2 |
| c2335C>T | 15 | pGln779* | Loss of function | 2 |
| c2520del | 16 | pAsn841Thrfs*2 | Loss of function | 1 |
| c2582_2583del | 16 | pPhe861Trpfs*90 | Loss of function | 6 |
| c2998C>T | 17 | pGln1000* | Loss of function | 1 |
| c3045_3046del | 17 | pGu1015Aspfs*14 | Loss of function | 1 |
| c3175C>T | 17 | pGln1059* | Loss of function | 1 |
| c3207_3211dup | 17 | pGlu1071Glyfs*76 | Loss of function | 1 |
| c3313G>T | 18 | pGlu1105* | Loss of function | 1 |
| c3318dup | 18 | pGlu1107Argfs*24 | Loss of function | 2 |
| c3319G>T | 18 | pGlu1107* | Loss of function | 1 |
| c3352C>T | 18 | pGln1118* | Loss of function | 2 |
| c3491dup | 19 | pGlu1165Argfs*6 | Loss of function | 2 |
| c3572G>A | 20 | pTrp1191* | Loss of function | 2 |
| c3666+1del | 20 | pLeu1222Leufs*7 | Loss of function | 2 |
| c3840+1G>A | 21 | | Loss of function | 5 |
| c3900_3903dup | 22 | Leu1302Valfs18 | Loss of function | 1 |
| c4105G>T | 23 | pGly1369* | Loss of function | 1 |
| c4118del | 23 | pLeu1373* | Loss of function | 4 |
| c4245+1G>T | 23 | | Loss of function | 1 |
| c4299+1dup | 24 | pGly1031fs*27 | Loss of function | 1 |
| c4423del | 24 | pGln1475Asnfs*6 | Loss of function | 1 |
| c4437+5G>A | 25 | | Loss of function | 1 |
| c4708_4710dup | 27 | pIle1570dup | Loss of function | 1 |
| c4845C>G | 28 | pTyr1615* | Loss of function | 1 |
| c4867C>T | 28 | pArg1623* | Loss of function | 1 |
| c5083C>T | 28 | pGln1695* | Loss of function | 1 |
| c5321_5324dup | 28 | pPhe1775Leufs*15 | Loss of function | 2 |
| c5433T>G | 28 | pTyr1811* | Loss of function | 1 |
| c5830C>T | 28 | pArg1944* | Loss of function | 2 |
| c6017del | 28 | pPro2006Leufs*32 | Loss of function | 1 |

SCN5A mutations (suite)

| SCN5A mutations | Exon | Aminoacid changes | Effect | n |
|---|------|-------------------|------------------|---|
| Missense pathogenic mutations [n=289 (63.9%), 99 distinct mutations] | | | | |
| c362G>A | 3 | pArg121Gln | Loss of function | 1 |
| c278T>C | 3 | pPhe93Ser | Loss of function | 3 |
| c481G>A | 4 | pGlu161Lys | Loss of function | 2 |
| c559A>C | 5 | pThr187Pro | | 1 |
| c673C>T | 6 | pArg225Trp | Gain and loss | 5 |
| c665G>A | 6 | pArg222Gln | Gain of function | 1 |
| c635T>C | 6 | pLeu212Pro | Gain of function | 2 |
| c725C>A | 7 | pAla242Asp | | 1 |
| c844C>T | 7 | pArg282Cys | Loss of function | 1 |
| c718G>A | 7 | pVal240Met | | 1 |
| c827T>C | 7 | pLeu276Pro | | 2 |
| c1007C>T | 9 | pPro336Leu | Loss of function | 1 |
| c1018C>T | 9 | pArg340Trp | Gain of function | 2 |
| c1066G>A | 9 | pAsp356Asn | Loss of function | 7 |
| c1099C>T | 9 | pArg367Cys | Loss of function | 1 |
| c1100G>A | 9 | pArg367His | Loss of function | 1 |
| c1106T>A | 9 | pMet369Lys | Loss of function | 4 |
| c1109C>T | 9 | pThr370Met | Gain of function | 4 |
| c1120T>G | 9 | pTrp374Gly | Loss of function | 2 |
| c1126C>T | 9 | pArg376Cys | Loss of function | 1 |
| c1218C>A | 10 | pAsn406Lys | Gain of function | 2 |
| c1231G>A | 10 | pVal411Met | Gain of function | 9 |
| c1237G>A | 10 | pAla413Thr | | 2 |
| c1540G>T | 12 | pGly514Cys | Loss of function | 2 |
| c1889C>T | 12 | pThr630Met | Loss of function | 2 |
| c2047T>C | 14 | pCys683Arg | | 6 |
| c2065C>T | 14 | pArg689Cys | Gain of function | 1 |
| c2204C>T | 14 | pAla735Val | Loss of function | 1 |
| c2275A>T | 15 | pIle759Phe | | 1 |
| c2441G>A | 16 | pArg814Gln | | 3 |
| c2516T>C | 16 | pLeu839Pro | Loss of function | 1 |
| c2632C>T | 16 | pArg878Cys | Loss of function | 1 |
| c2674T>A | 16 | pPhe892Ile | | 1 |
| c2677C>T | 16 | pArg893Cys | Loss of function | 1 |
| c2690G>A | 16 | pGly897Glu | Loss of function | 1 |
| c2701G>A | 16 | pGlu901Lys | Loss of function | 6 |
| c2780A>G | 16 | pAsn927Ser | Loss of function | 1 |
| c2701G>A | 17 | pGlu901Lys | Loss of function | 1 |
| c2821T>A and c2822C>A | 17 | pSer941Asn | Gain of function | 1 |
| c2822C>T | 17 | pSer941Phe | | 1 |
| c2893C>T | 17 | pArg965Cys | Loss of function | 2 |
| c3157G>A | 17 | pGlu1053Lys | Loss of function | 1 |
| c3556G>A | 20 | pAla1186Thr | Gain of function | 2 |
| c3662C>T | 20 | pAla1221Val | | 2 |
| c3673G>A | 21 | pGlu1225Lys | Loss of function | 3 |
| c3694C>T | 21 | pArg1232Trp | Loss of function | 1 |
| c3727G>A | 21 | pAsp1243Asn | | 2 |
| c3784G>A | 21 | pGly1262Ser | Loss of function | 1 |
| c3823G>A | 21 | pAsp1275Asn | Loss of function | 4 |
| c3911C>T | 22 | pThr1304Met | Gain of function | 1 |
| c3956G>T | 22 | pGly1319Val | Loss of function | 8 |
| c3974A>G | 23 | pAsn1325Ser | Gain of function | 4 |
| c3988G>A | 23 | pAla1330Thr | Gain of function | 2 |
| c3995C>A | 23 | pPro1332Gln | | 1 |

SCN5A mutations (suite)

| SCN5A mutations | Exon | Aminoacid changes | Effect | n |
|---|------|------------------------|------------------|----|
| Missense pathogenic mutations (suite) | | | | |
| c3995C>T | 23 | pPro1332Leu | Gain of function | 1 |
| c4000A>G | 23 | plle1334Val | Gain of function | 2 |
| c4035G>T | 23 | pTrp1345Cys | | 2 |
| c4037T>C | 23 | pLeu1346Pro | Loss of function | 1 |
| c4140C>G | 23 | pAsn1380Lys | | 2 |
| c4216G>C | 23 | pGly1406Arg | Loss of function | 2 |
| c4222G>A | 23 | pGly1408Arg | Loss of function | 2 |
| c4282G>T | 24 | pAla1428Ser | Loss of function | 1 |
| c4346A>G | 25 | pTyr1449Cys | Loss of function | 2 |
| c4442G>T | 26 | pGly1481Val | | 1 |
| c4458C>A | 26 | pPhe1486Leu | Gain of function | 1 |
| c4459A>C | 26 | pMet1487Leu | Gain of function | 1 |
| c4493T>C | 26 | pMet1498Thr | | 2 |
| c4501C>G | 26 | pLeu1501Val | | 2 |
| c4510A>G | 26 | pLys1504Glu | | 1 |
| c4562T>A | 27 | plle1521Lys | Loss of function | 2 |
| c4747C>T | 27 | pArg1583Cys | Loss of function | 1 |
| c4748G>A | 27 | pArg1583His | Loss of function | 1 |
| c4783G>A | 27 | pAsp1595Asn | Loss of function | 1 |
| c4441G>A | 28 | pGly1481Arg | | 1 |
| c4868G>A | 28 | pArg1623Gln | Gain of function | 6 |
| c4876C>T | 28 | pArg1626Cys | | 1 |
| c4892G>A | 28 | pGly1631Asp | Gain of function | 1 |
| c4895G>T | 28 | pArg1632Leu | | 1 |
| c4931G>A | 28 | pArg1644His | Gain of function | 2 |
| c4978A>G | 28 | plle1660Val | Loss of function | 2 |
| c5015C>A | 28 | pSer1672Tyr | Loss of function | 1 |
| c5129C>T | 28 | pSer1710Leu | Loss of function | 4 |
| c5164A>G | 28 | pAsn1722Asp | Loss of function | 2 |
| c5227G>A | 28 | pGly1743Arg | Loss of function | 3 |
| c5228G>A | 28 | pGly1743Glu | Loss of function | 10 |
| c5287G>A | 28 | pVal1763Met | Gain of function | 5 |
| c5287G>T | 28 | pVal1763Leu | | 1 |
| c5296A>C | 28 | pMet1766Leu | Gain and loss | 1 |
| c5302A>G | 28 | plle1768Val | Gain of function | 12 |
| c5320A>C | 28 | pAsn1774His | | 1 |
| c5320A>G | 28 | pAsn1774Asp | | 1 |
| c5329G>A | 28 | pVal1777Met | Gain of function | 8 |
| c5329G>T | 28 | pVal1777Leu | | 1 |
| c5350G>A | 28 | pGlu1784Lys | Gain and loss | 64 |
| c5357T>G | 28 | pLeu1786Arg | | 1 |
| c5368G>A | 28 | pAsp1790Asn | | 1 |
| c5369A>G | 28 | pAsp1790Gly | Gain of function | 7 |
| c5383T>A | 28 | pTyr1795Asn | | 1 |
| c5384A>G | 28 | pTyr1795Cys | Gain of function | 2 |
| In-frame mutations [n=23 (5.1%), 8 distinct mutations] | | | | |
| c4015_4017del | 23 | pLeu1339del | | 1 |
| c4140_4142del | 23 | pAsn1380del | Loss of function | 3 |
| c4456_4458del | 26 | pPhe1486del | Gain and loss | 1 |
| c4519-4527del | 26 | pGln1507_Pro1509del | | 3 |
| c4850_4852del | 28 | pPhe1617del | Gain and loss | 3 |
| c5242_5244del | 28 | pGly1748del | | 1 |
| c5272_5274del | 28 | plle1758del | | 3 |
| c5385_5387dup | 28 | pTyr1795_Glu1796insAsp | Gain and loss | 8 |

SCN5A mutations (suite)

| SCN5A mutations | Exon | Aminoacid changes | Effect | n |
|---|------|-------------------|--------|---|
| Unknwon functional effect [n=44 (9.7%), 33 distinct mutations] | | | | |
| c10T>G | 2 | pPhe4Val | | 1 |
| c670C>T | 6 | pLeu224Phe | | 1 |
| c680T>C | 6 | pLeu227Pro | | 1 |
| c787G>A | 7 | pVal263Ile | | 1 |
| c994G>A | 8 | pAla332Thr | | 1 |
| c1022G>A | 9 | pCys341Tyr | | 2 |
| c1063T>A | 9 | pPhe355Ile | | 2 |
| c1201T>C | 10 | pSer401Pro | | 1 |
| c1273G>A | 10 | pAla425Thr | | 1 |
| c1637A>G | 12 | pAsp546Gly | | 1 |
| c2150C>T | 14 | pPro717Leu | | 2 |
| c2335C>A | 15 | pGln779Lys | | 2 |
| c3067C>T | 17 | pArg1023Cys | | 2 |
| c3220A>G | 17 | pSer1074Gly | | 1 |
| c3236C>A | 18 | pSer1079Tyr | | 2 |
| c3236C>T | 18 | pSer1079Phe | | 2 |
| c3385G>A | 18 | pGly1129Ser | | 1 |
| c3626C>G | 20 | pThr1209Arg | | 1 |
| c3629T>C | 20 | pPhe1210Ser | | 1 |
| c3665T>G | 20 | pLeu1222Arg | | 1 |
| c3718G>C | 21 | pGlu1240Gln | | 1 |
| c4004T>C | 23 | pMet1335Thr | | 4 |
| c4115C>G | 23 | pPro1372Arg | | 1 |
| c4380C>A | 25 | pPhe1460Leu | | 1 |
| c4424A>T | 25 | pGln1475Leu | | 1 |
| c4473G>T | 26 | pGln1491His | | 1 |
| c4571T>C | 27 | pIle1524Thr | | 2 |
| c4901T>C | 28 | pLeu1634Pro | | 1 |
| c5246T>A | 28 | pIle1749Asn | | 1 |
| c5431T>A | 28 | pTyr1811Asn | | 1 |
| c5546A>G | 28 | pHis1849Arg | | 1 |
| c5848T>C | 28 | pTyr1950His | | 1 |
| c5378T>A | 28 | pMet1793Lys | | 1 |

Table 5: Risk analysis for cardiac event

| | no CE | CE | p value |
|---|------------|-----------|---------|
| Clinical characteristics | | | |
| Male, n (%) | 164 (55.6) | 69 (53.9) | 0.86 |
| Age ≤1 year at diagnosis | 34 (11.5) | 37 (28.9) | <0.0001 |
| Family history of SD or ICD, n (%) | 183 (62.7) | 43 (33.6) | <0.0001 |
| Family history of PM implantation, n (%) | 66 (22.6) | 15 (11.7) | 0.01 |
| Family history of BrS, n (%) | 133 (45.1) | 18 (14.1) | <0.0001 |
| Family history of LQTS, n (%) | 107 (36.3) | 15 (11.7) | <0.0001 |
| Family history of PCCD, n (%) | 44 (14.9) | 9 (7.0) | 0.05 |
| Isolated LQT3 phenotype, n (%) | 48 (16.3) | 28 (21.9) | 0.95 |
| Isolated BrS type 1 phenotype, n (%) | 24 (8.1) | 9 (7.0) | 0.65 |
| Isolated PCCD phenotype, n (%) | 60 (20.3) | 26 (20.3) | 0.7 |
| Overlap phenotype, n (%) | 59 (20.0) | 43 (33.6) | <0.01 |
| Genetic characteristics | | | |
| Double <i>SCN5A</i> mutation, n (%) | 5 (1.7) | 8 (6.3) | 0.0003 |
| Compound mutation, n (%) | 3 (1.0) | 6 (4.7) | 0.0003 |
| Radical mutation, n (%) | 72 (24.4) | 31 (24.2) | 0.97 |
| Missense pathogenic mutation, n (%) | 198 (67.1) | 84 (65.6) | 0.9 |
| Unknown functional effect, n (%) | 25 (8.5) | 13 (10.2) | 0.97 |
| N-terminus location, n (%) | 3 (1.0) | 2 (1.6) | 0.8 |
| DI-DIV region, n (%) | 131 (44.4) | 67 (52.3) | 0.45 |
| DI/DII, DII/DIII, DIII/DIV linkers, n (%) | 27 (9.1) | 17 (13.3) | 0.27 |
| C-terminus, n (%) | 79 (26.8) | 19 (14.8) | <0.01 |
| S1-S4, n (%) | 51 (17.3) | 28 (21.9) | 0.94 |
| S5-S6, n (%) | 80 (27.1) | 39 (30.5) | 0.94 |
| S3-S5+6, n (%) | 114 (38.6) | 58 (45.3) | 0.06 |

SD: sudden death; ICD: implantable cardioverter defibrillator; PM: pacemaker; BrS: Brugada syndrome; LQTS: long QT syndrome; PCCD: progressive cardiac conduction disorder; CE: cardiac event.

Table 6: Phenotypes and outcomes according to SCN5A mutation types

| Phenotype | Radical mutation | Missense pathogenic mutation | Unknown functional effect | p value |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------|
| Phenotypes | | | | |
| Isolated LQT3, n (%) | 10 (13.1) | 58 (76.3) | 8 (10.5) | 0.0003 |
| Isolated BrS, n (%) | 9 (27.2) | 22 (66.7) | 2 (6.1) | 0.84 |
| Isolated PCCD, n (%) | 32 (37.2) | 47 (54.7) | 7 (8.1) | 0.003 |
| Overlap syndrome, n (%) | 31 (30.4) | 65 (63.7) | 6 (5.9) | 0.11 |
| Negative phenotype, n (%) | 21 (17.0) | 88 (71.5) | 14 (11.4) | 0.04 |
| Outcomes | | | | |
| Diagnosis ≤1year, n (%) | 21 (29.6) | 49 (69.0) | 1 (1.4) | 0.0028 |
| CA as first symptom, n (%) | 18 (28.1) | 40 (62.5) | 6 (9.4) | 0.75 |
| Syncope as first symptom, n (%) | 10 (18.6) | 40 (72.2) | 7 (12.3) | 0.75 |
| Asympto at diagnosis, n (%) | 75 (24.8) | 202 (66.9) | 25 (8.3) | 0.75 |
| Event rate /patient year, % | 3.1 | 2.5 | 2.8 | 0.97 |
| ICD, n (%) | 15 (21.4) | 51 (72.9) | 4 (5.7) | 0.65 |
| Appropriate shocks, n (%) | 15 (21.7) | 50 (72.5) | 4 (5.8) | 0.29 |
| Death or transplantation, n (%) | 3 (18.8) | 11 (68.8) | 2 (12.5) | 0.9 |
| Uneventful follow-up, n (%) | 72 (24.4) | 198 (67.1) | 25 (8.5) | 0.97 |

CA: cardiac arrest (includes aborted cardiac arrest and sudden cardiac death); ICD: implantable cardioverter defibrillator.

Table 7: Phenotype and outcomes according to SCN5A mutation topology (domains)

| | N-terminus | DI-DIV region | C-terminus | p value |
|---------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------|
| Phenotype | | | | |
| Isolated LQT3, n (%) | 0 (0.0) | 44 (57.9) | 29 (38.2) | 0.04 |
| Isolated BrS-1, n (%) | 1 (3.0) | 20 (60.6) | 4 (12.1) | 0.15 |
| Isolated PCCD, n (%) | 2 (2.3) | 45 (52.3) | 10 (11.6) | 0.04 |
| Overlap phenotype, n (%) | 0 (0.0) | 51 (50.0) | 31 (30.4) | 0.06 |
| Negative phenotype, n (%) | 2 (1.6) | 79 (64.2) | 24 (19.5) | 0.23 |
| Outcomes | | | | |
| Diagnosis ≤1year, n (%) | 1 (1.4) | 47 (66.2) | 11 (15.5) | 0.13 |
| ACA/SCD as first symptom, n (%) | 2 (3.1) | 44 (68.8) | 4 (6.3) | 0.002 |
| Syncope as first symptom, n (%) | 2 (2.9) | 36 (63.2) | 14 (24.6) | 0.002 |
| Asympto at diagnosis, n (%) | 3 (1.0) | 162 (53.6) | 80 (26.5) | 0.002 |
| Event rate /patient year | 4.2 | 3.1 | 1.3 | 0.0038 |
| ICD, n (%) | 2 (2.9) | 41 (58.6) | 17 (24.3) | 0.36 |
| Appropriate shocks, n (%) | 1 (1.4) | 41 (59.4) | 17 (24.6) | 0.09 |
| Death or transplantation, n (%) | 0 (0.0) | 13 (81.3) | 1 (6.3) | - |
| Uneventful follow-up,n (%) | 3 (1.0) | 158 (53.6) | 79 (26.8) | 0.0038 |

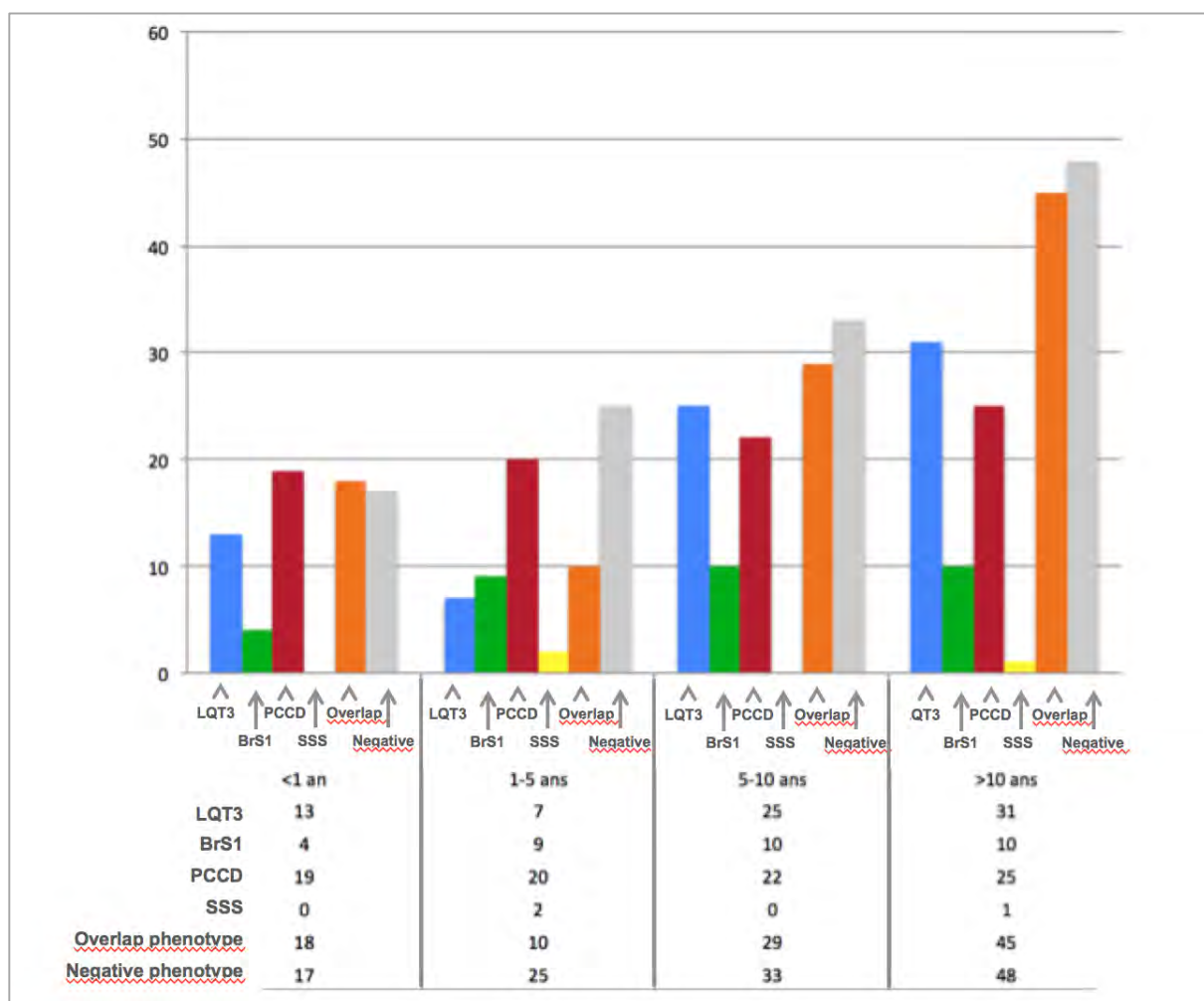
LQT3: long QT syndrome type 3; BrS-1: Brugada syndrome type 1; PCCD: progressive cardiac conduction disorder; CA: cardiac arrest (includes aborted cardiac arrest and sudden cardiac death); ICD: implantable cardioverter defibrillator.

Table 8: Phenotype and outcomes according to SCN5A mutation topology (segments)

| | S1-S4 | S4-S5 | S5-S6 | p value |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| Phenotype | | | | |
| Isolated LQT3, n (%) | 7 (9.2) | 5 (6.6) | 19 (25.0) | 0.47 |
| Isolated BrS-1, n (%) | 9 (27.3) | 1 (3.0) | 8 (24.2) | 0.13 |
| Isolated PCCD, n (%) | 9 (10.5) | 3 (3.5) | 28 (32.6) | 0.45 |
| Overlap phenotype, n (%) | 14 (13.7) | 2 (2.0) | 27 (26.5) | 0.36 |
| Negative phenotype, n (%) | 18 (14.6) | 10 (8.1) | 37 (30.1) | 0.32 |
| Outcomes | | | | |
| Diagnosis ≤1year, n (%) | 10 (14.1) | 4 (5.6) | 26 (36.6) | 0.81 |
| ACA/SCD as first symptom, n (%) | 10 (15.6) | 2 (3.1) | 22 (34.4) | 0.59 |
| Syncope as first symptom, n (%) | 11 (19.3) | 4 (7.0) | 14 (24.6) | 0.59 |
| Asympto at diagnosis, n (%) | 37 (12.3) | 15 (5.0) | 83 (27.5) | 0.59 |
| Event rate /patient year | 3.2 | 2.6 | 3.1 | 0.94 |
| ICD, n (%) | 11 (15.7) | 5 (7.1) | 21 (30.0) | 0.74 |
| Appropriate shocks, n (%) | 11 (15.9) | 5 (7.2) | 21 (30.4) | 0.07 |
| Death or transplantation, n (%) | 2 (12.5) | 0 (0.0) | 6 (37.5) | - |
| Uneventful follow-up,n (%) | 37 (12.5) | 14 (4.7) | 80 (27.1) | 0.94 |

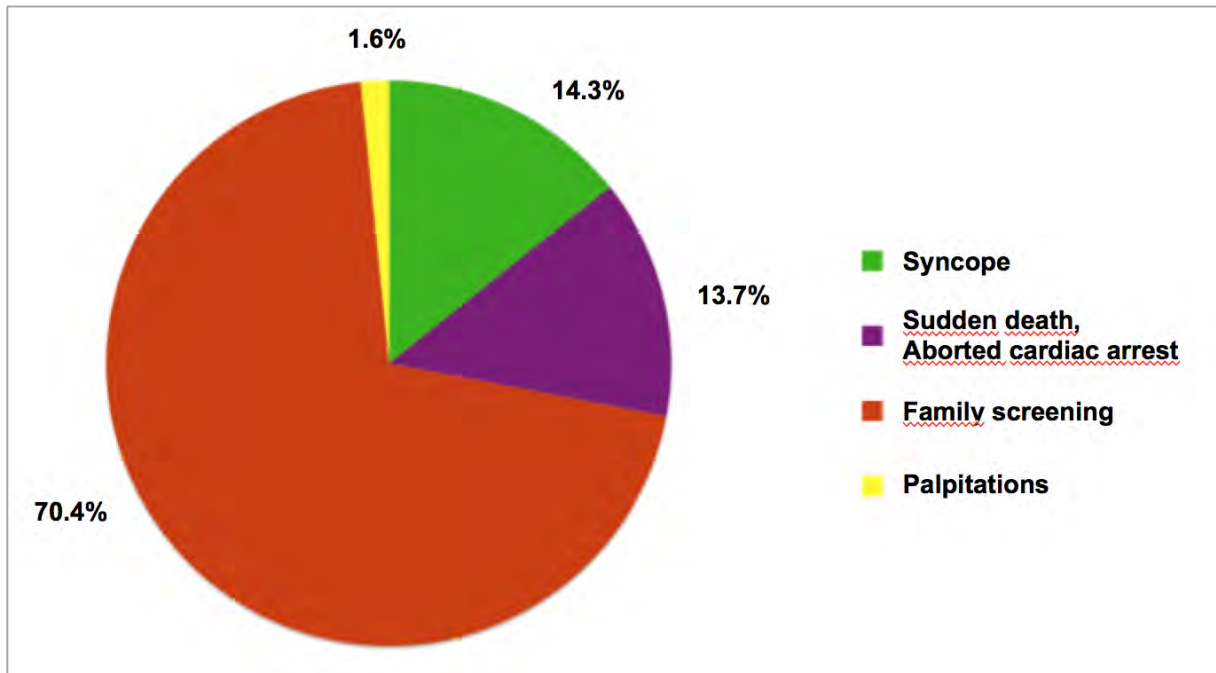
LQT3: long QT syndrome type 3; BrS-1: Brugada syndrome type 1; PCCD: progressive cardiac conduction disorder; CA: cardiac arrest (includes aborted cardiac arrest and sudden cardiac death); ICD: implantable cardioverter defibrillator.

Figure 1: Phenotypes repartition according to age at diagnosis



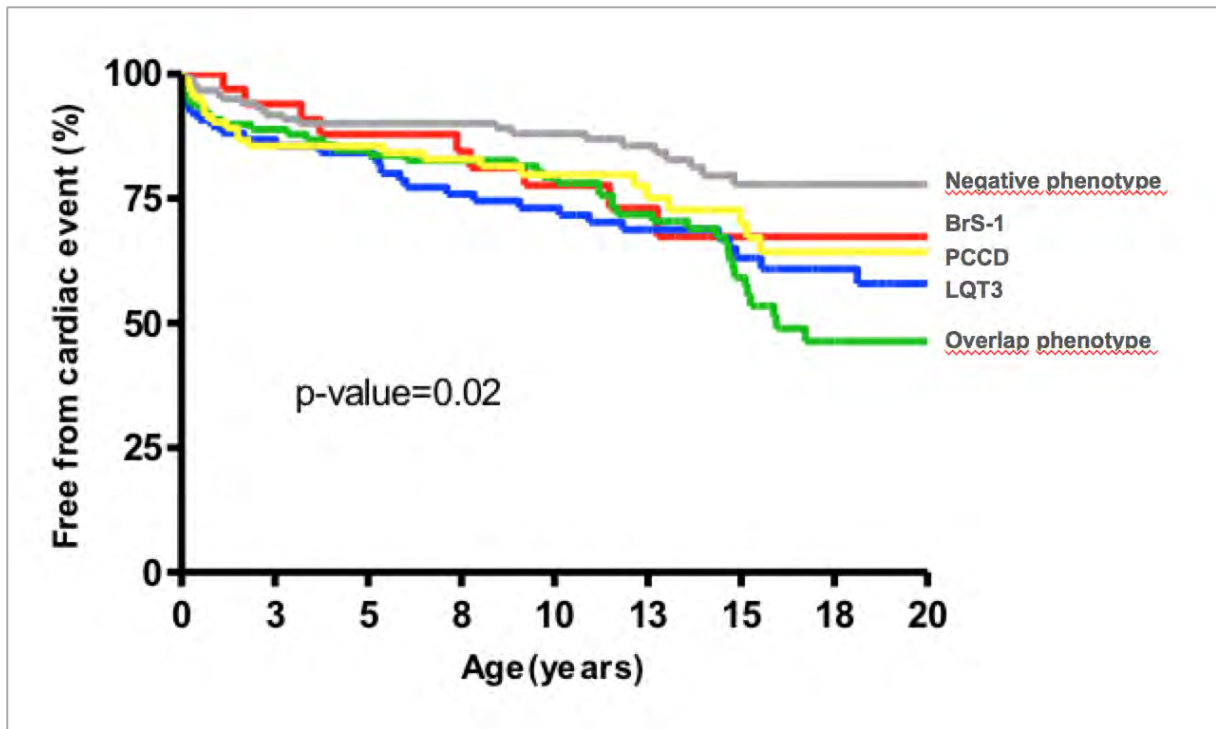
Of the 423 SCN5A mutation-positive children, 62% were diagnosed before the age of 10 years old.

Figure 2: Reason for diagnosis of cardiac sodium channelopathy



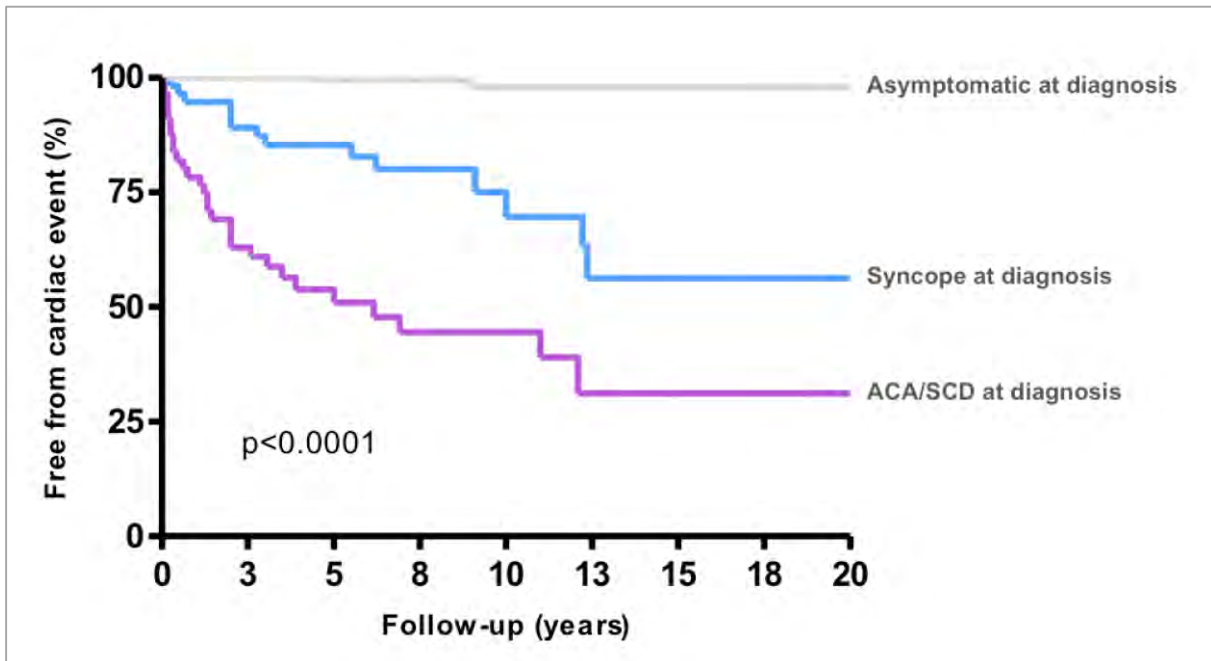
The diagnosis of cardiac sodium channelopathy was most often made because of a family history and an abnormal electrocardiogram obtained as a screening tool (red area, 70.4%). In green are the patients diagnosed after presentation for syncope (14.3%). Sudden cardiac death or resuscitated cardiac arrest was the cause of diagnosis in 13.7% of patients.

Figure 3: Kaplan-Meier curves of arrhythmic events during follow-up according to phenotype



Freedom from cardiac event in patients according to their phenotype. Overlap phenotype patients experienced more cardiac events compared to those with a negative, as did isolated LQT3 patients, isolated PCCD patients and isolated BrS-1 patients.

Figure 4: Kaplan-Meier curves of arrhythmic events during follow-up according to the clinical status at diagnosis

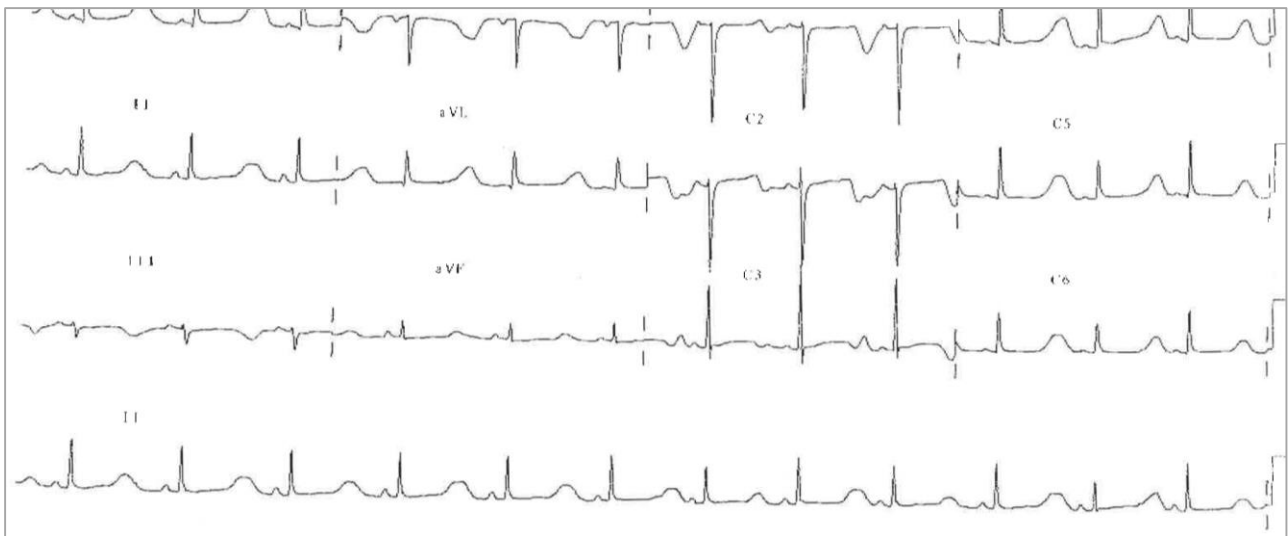


Freedom from arrhythmic event in patients classified in 3 groups: those with ACA/SCD as first symptom, those with syncope as first symptom and those diagnosed while asymptomatic. Patients with ACA/SCD as first symptom were more predisposed to underwent a second arrhythmic event than those with syncope as first symptom and those diagnosed while asymptomatic. Patients with syncope as first symptom were more predisposed to underwent a further arrhythmic event than those diagnosed while asymptomatic.

III.5 Exemples de tracés ECG issus de notre étude

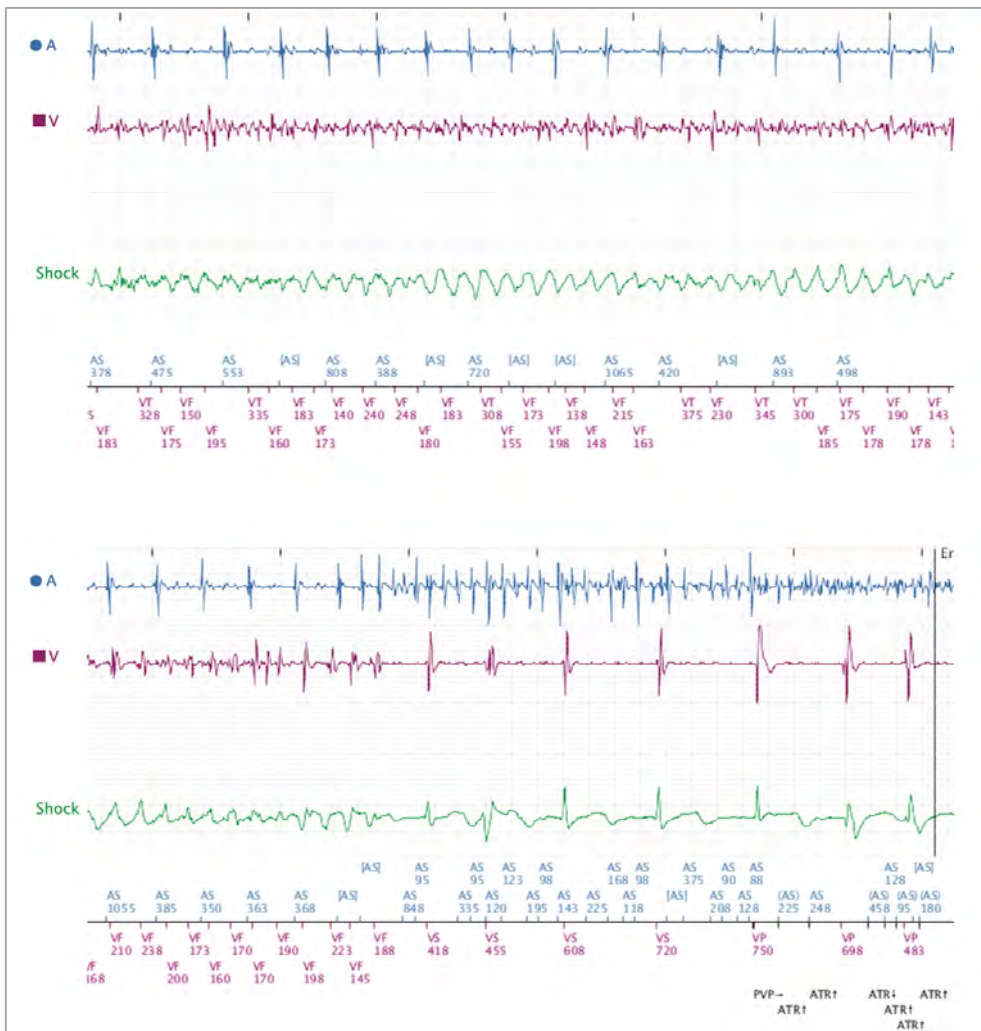
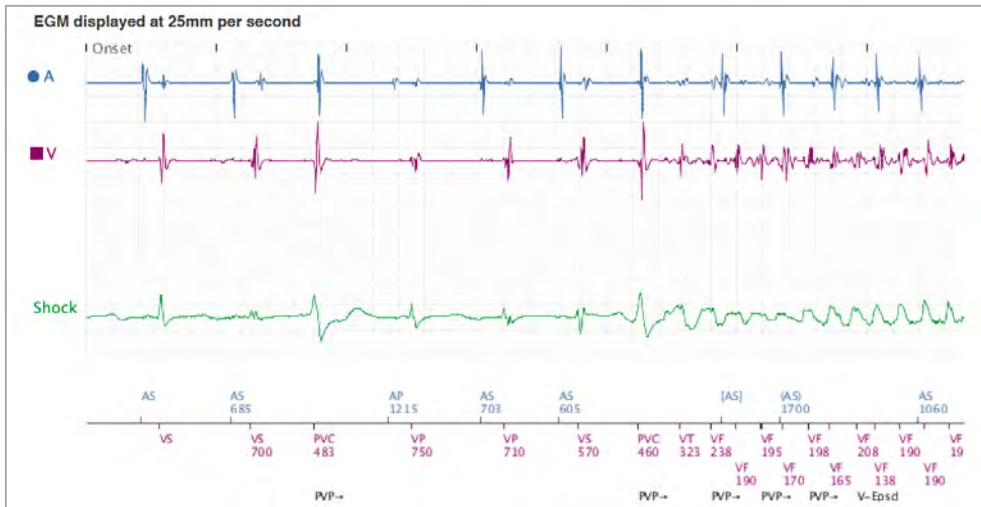
Les quelques tracés suivants ont été choisis dans la base d'ECG constituée dans la cadre de cette étude, pour illustrer ce travail.

Figure 4-12: Tracés du patient *SCN5A* Ped. 267 (London, UK)

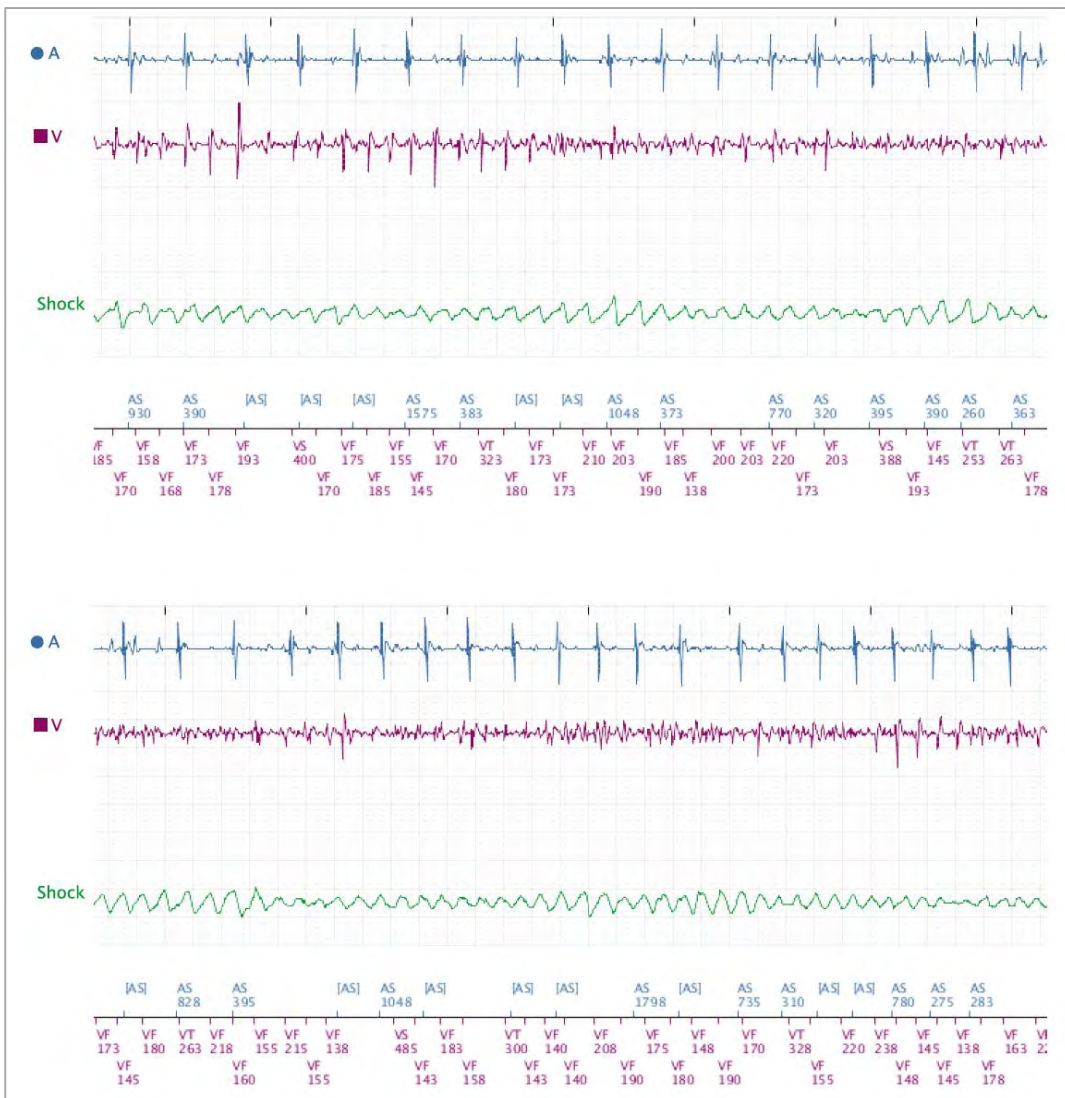
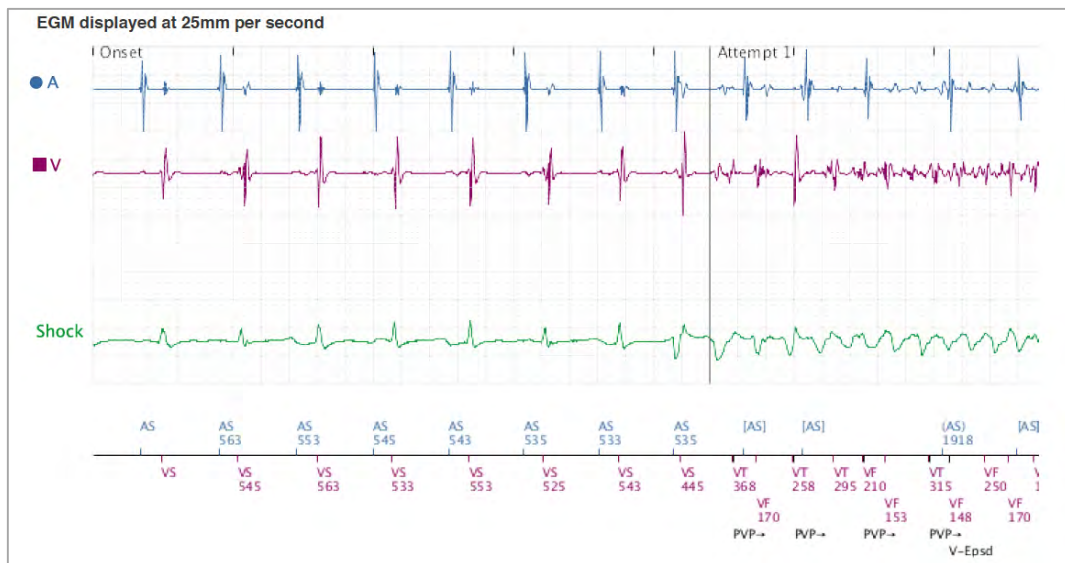


Jeune garçon sans antécédent familial notable, ayant présenté une syncope au repos à l'âge de 8,9 ans. L'ECG met en évidence un syndrome du QT long avec un intervalle QT corrigé mesuré à 626 ms (premier tracé, âge: 8,9 ans). Mise en évidence d'une mutation *SCN5A* à effet gain de fonction (c1231G>A). Implantation d'un défibrillateur automatique endocavitaire double chambre et instauration d'un traitement beta-bloquant. Après 5,5 années de suivi, 9 chocs appropriés et 15 évènements cardiovasculaires majeurs ont été documentés, incluant 5 épisodes de torsade de pointes (second tracé, page suivante, âge: 14 ans), 2 accès de tachycardie ventriculaire polymorphe, et 8 fibrillations ventriculaires (troisième tracé, page d'après, âge: 14,5 ans).

Patient SCN5A Ped. 267 (suite)



Patient SCN5A Ped. 267 (suite)



Patient SCN5A Ped. 267 (suite et fin)

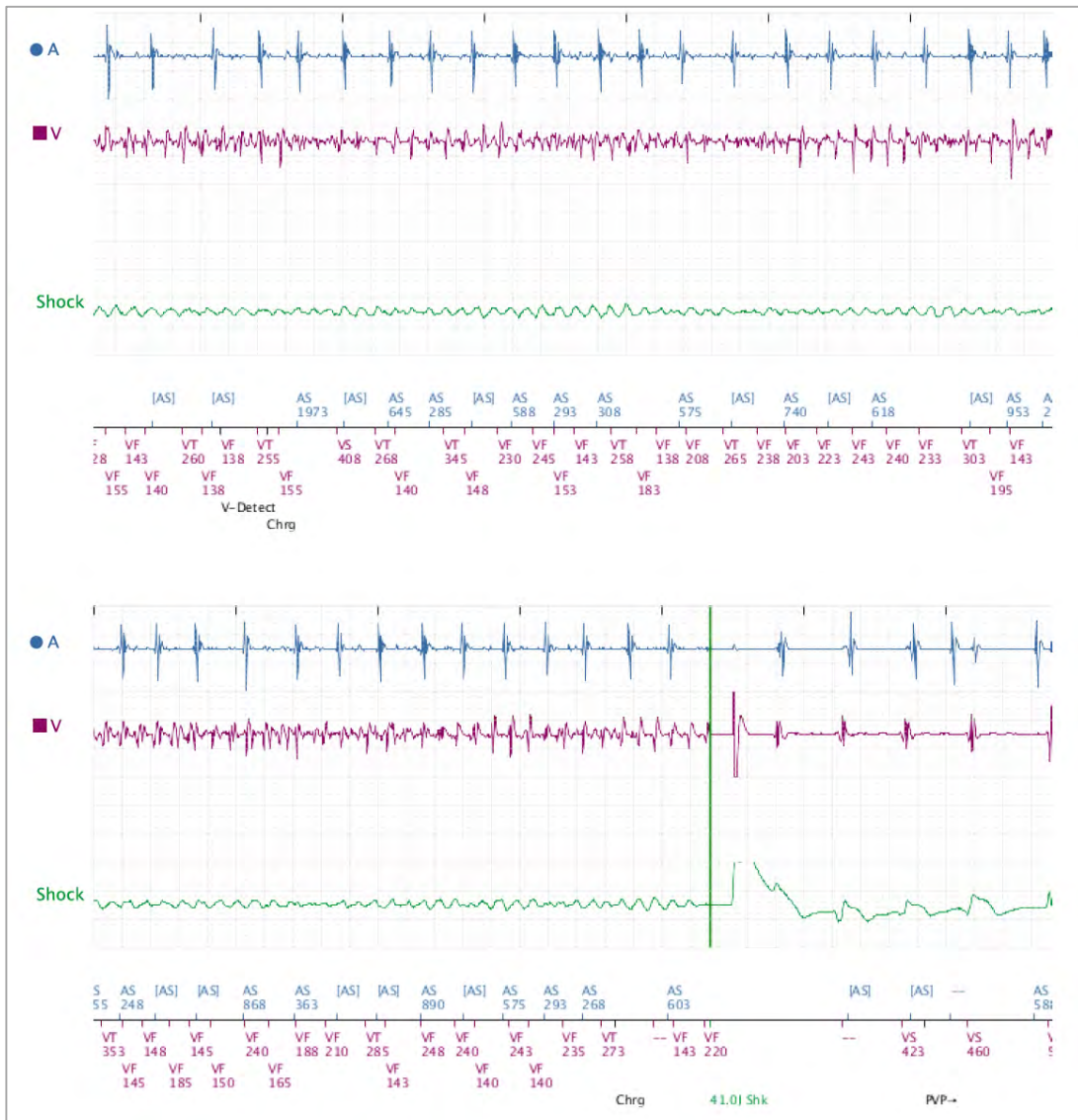
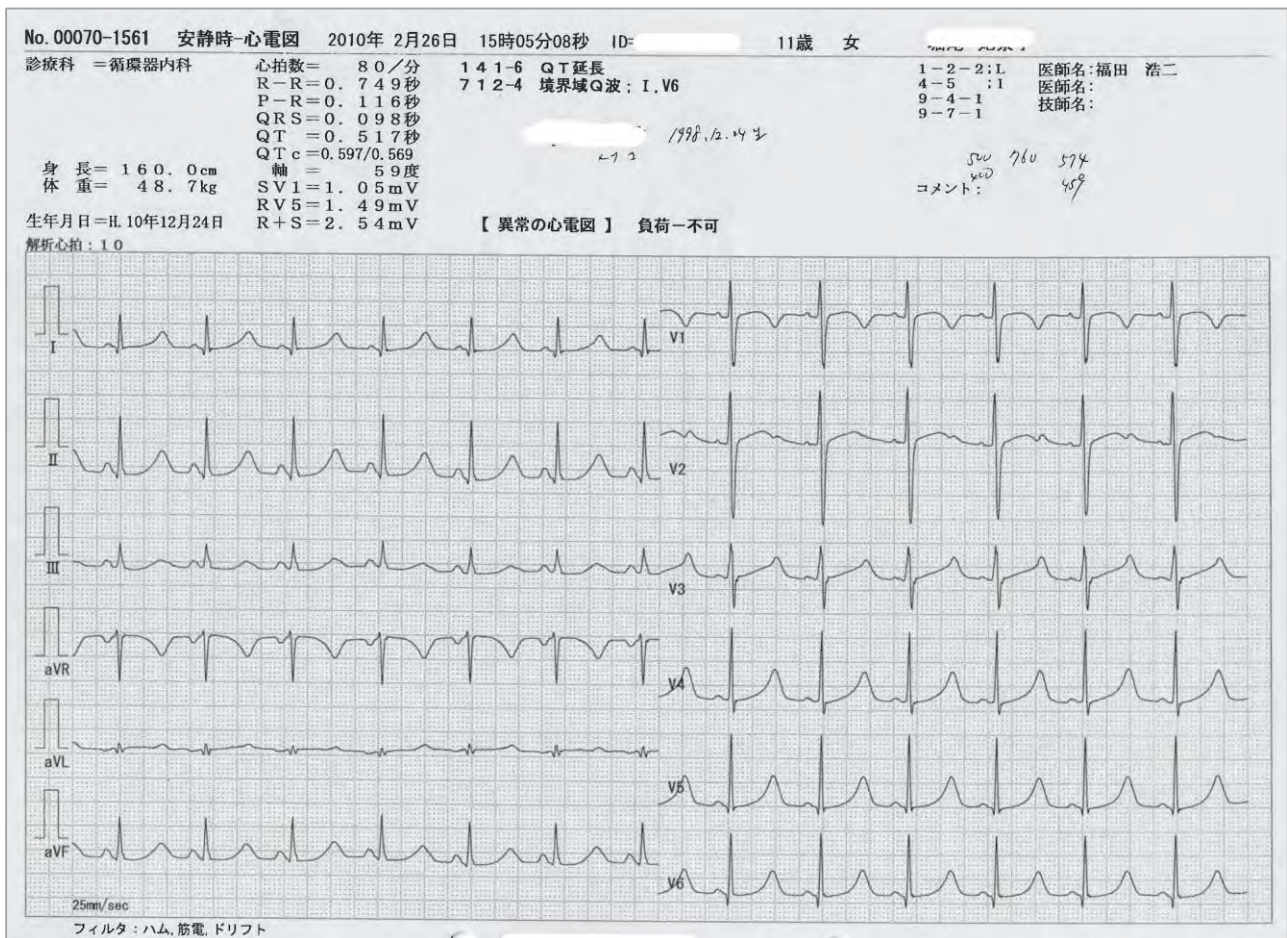


Figure 4-13: Tracés du patient *SCN5A* Ped. 399 (Osaka, Japan)



Jeune fille sans histoire familiale ayant présenté un arrêt cardiaque récupéré à l'âge de 11,2 ans survenu au repos. L'ECG basal révèle un syndrome du QT long avec un intervalle QT corrigé mesuré à 597 ms (premier tracé, âge: 11,2 ans). Mise en évidence d'une mutation *SCN5A* à effet gain de fonction (c1231G>4). Implantation d'un défibrillateur automatique monochambre endocavitaire en prévention secondaire associé à un traitement par beta-bloquant. Après 6 ans de suivi, un choc approprié a été délivré en réponse à une fibrillation ventriculaire (second tracé, page suivante, âge: 12 ans).

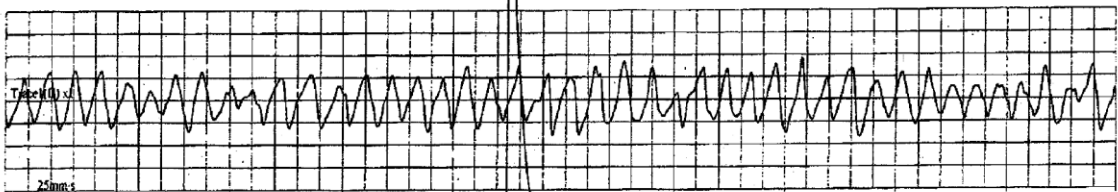
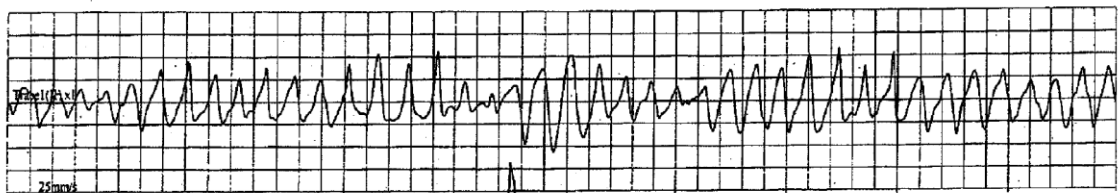
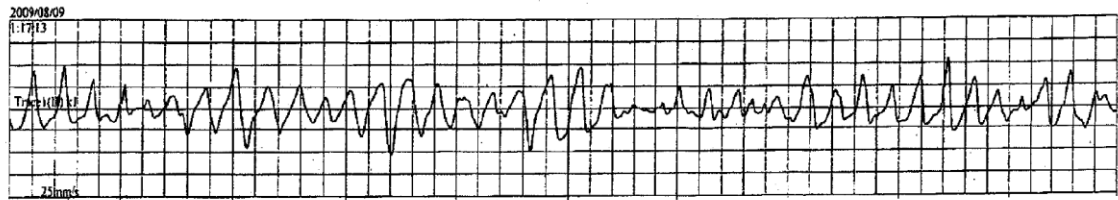
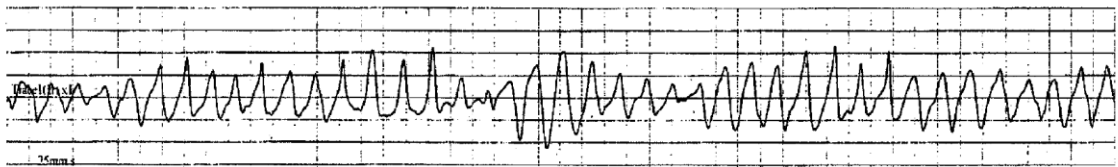
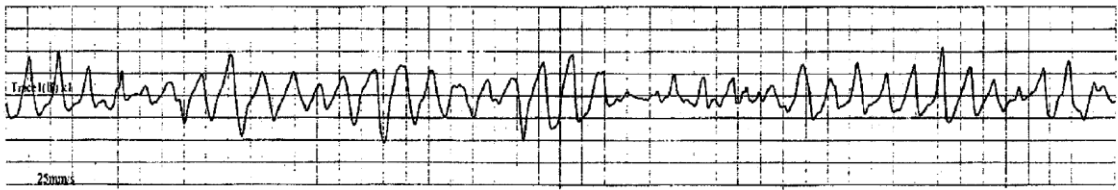
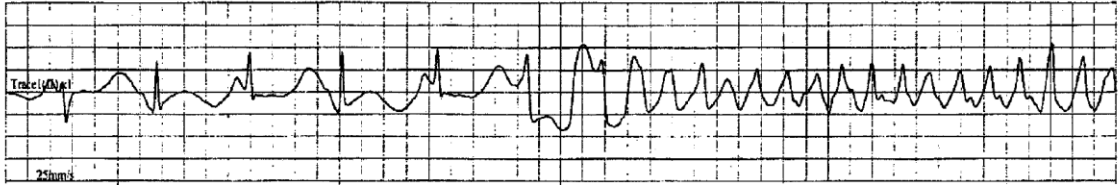
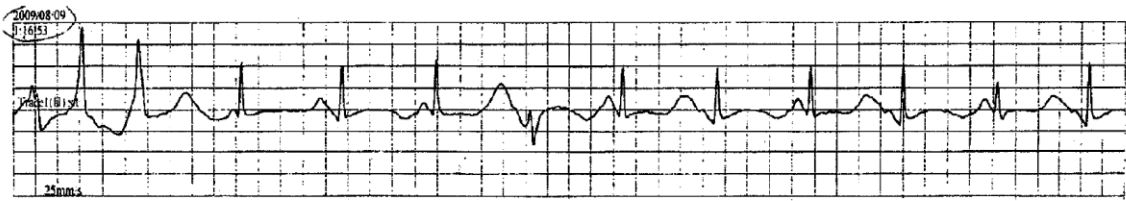
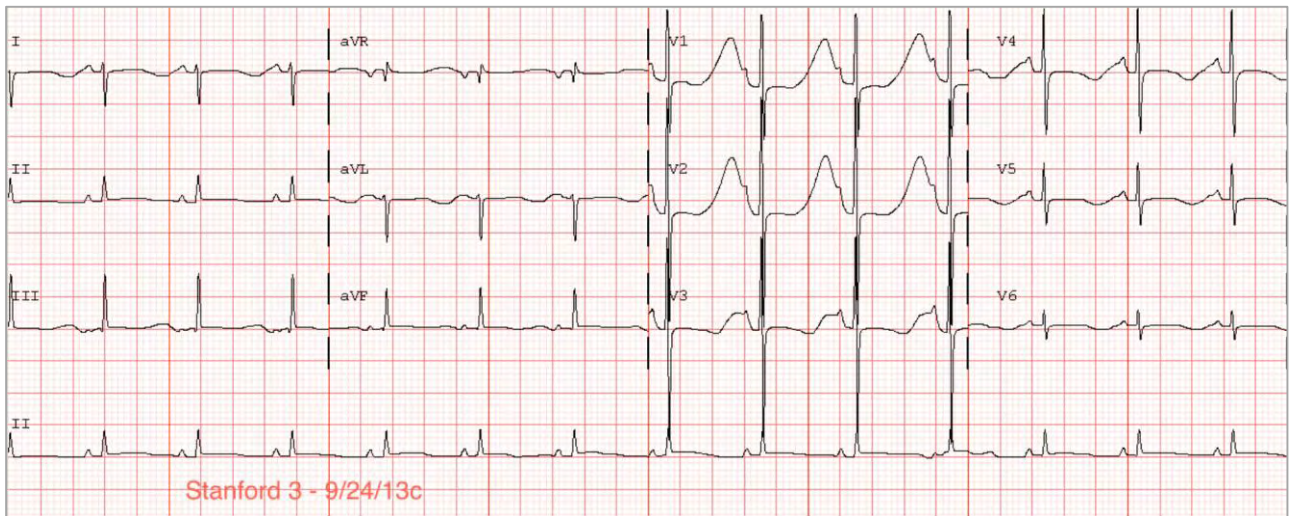
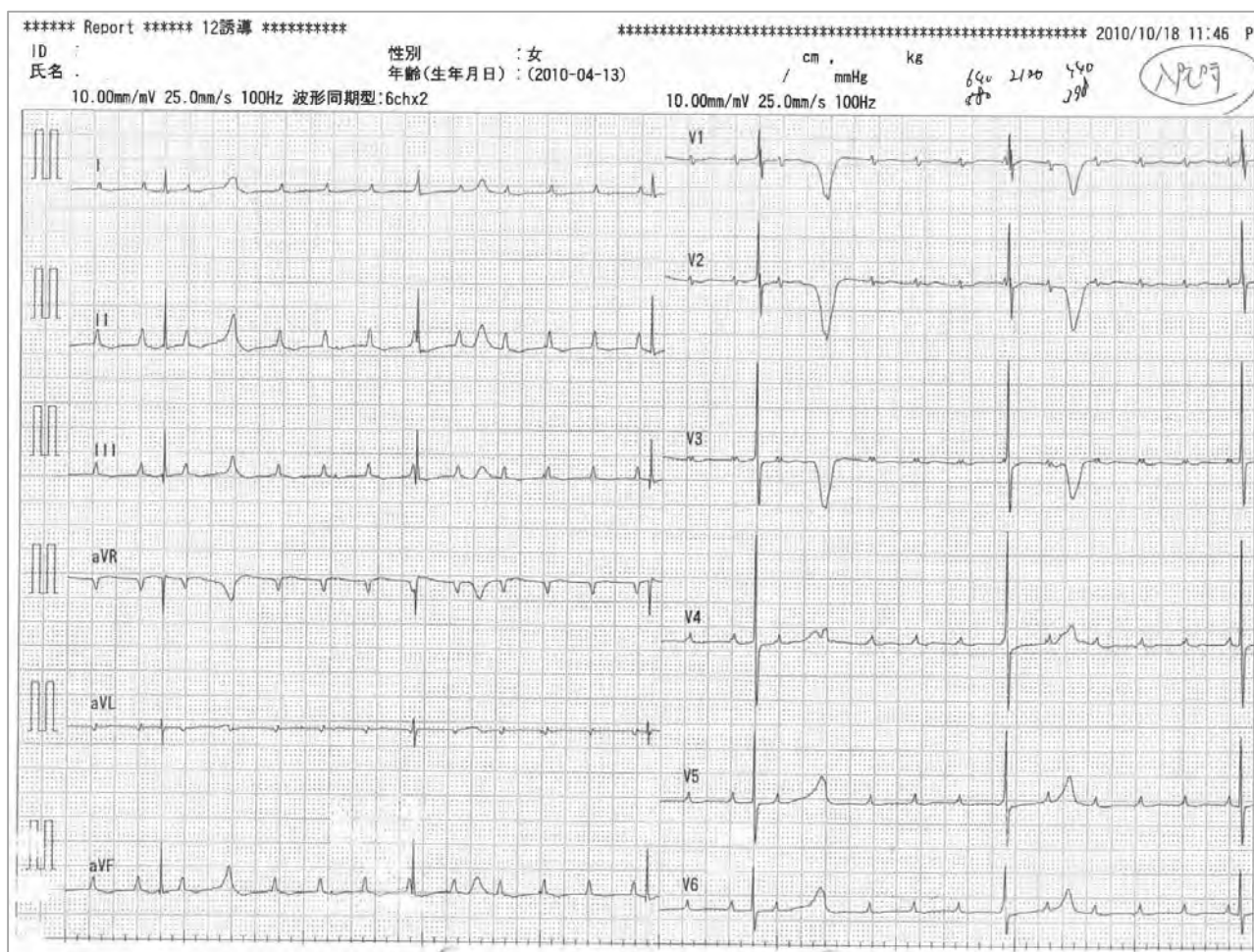


Figure 4-14: Tracé du patient *SCN5A Ped. 115* (Stanford, Palo Alto, CA, USA)



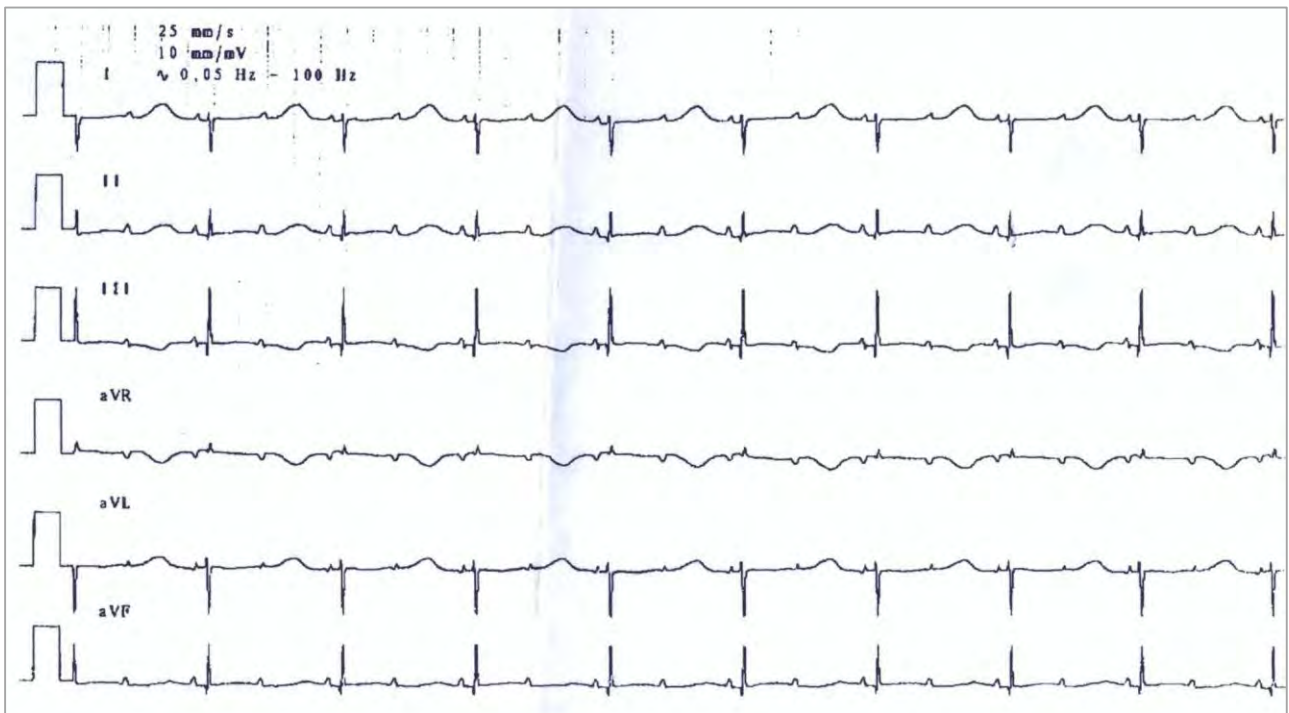
Mort subite récupérée à 2 jours de vie chez un nouveau-né de sexe féminin, sans antécédent familial. L'ECG montre un syndrome du QT long congénital avec un bloc fonctionnel 2/1, une bradycardie à 99 bpm et un intervalle QT mesuré à 560 ms, soit un intervalle QT corrigé à 719 ms (tracé ci-dessus, âge: 3 jours). Mise en évidence d'une mutation *SCN5A* (c2587G>T). Implantation d'un défibrillateur automatique épiscardique double chambre et mise sous bithérapie beta-bloquant et flécaïne. Suivi marqué par 2 épisodes de torsades de pointes documentés et 8 chocs appropriés en relation avec 2 orages électriques ayant conduit à la mise sous ECMO et transplantation cardiaque orthotopique à 8 mois de vie pour arythmies ventriculaires réfractaires subintrantes et tachycardiomyopathie.

Figure 4-15: Tracé du patient *SCN5A* Ped. 393 (Tokyo, Japan)



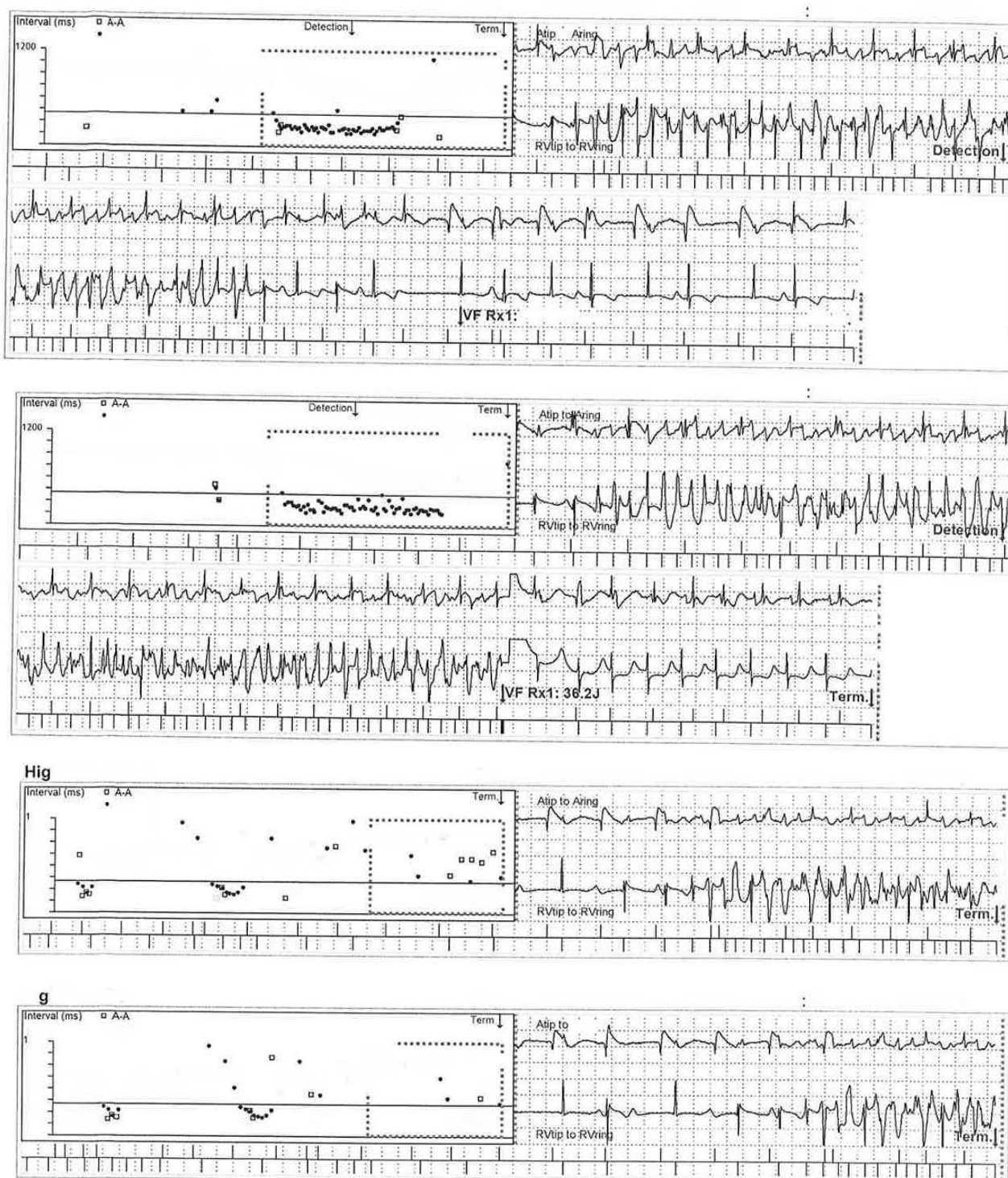
Adolescent de 13,8 ans, asymptomatique, sans antécédents familiaux cardiovasculaires. Mise en évidence sur une bradycardie lors d'un examen systématique d'un rythme cardiaque lent, motivant la réalisation d'un ECG. Mise en évidence d'une bradycardie à 30 bpm, bloc atrioventriculaire complet avec rythme d'échappement à complexe QRS fin et normo-axé, intervalle QT corrigé mesuré à 481 ms (tracé ci-dessus, âge: 13,8 ans). Le bilan génétique retrouve une mutation *SCN5A* à effet gain de fonction (c5384A>G). Implantation d'un stimulateur cardiaque endocavitaire monochambre et introduction d'un traitement par mexiletine. Documentation d'un accès de fibrillation atriale paroxystique mais absence d'arythmie ventriculaire documentée au bout d'un suivi de 5 ans.

Figure 4-16: Tracé du patient *SCN5A Ped. 234* (Paris, France)



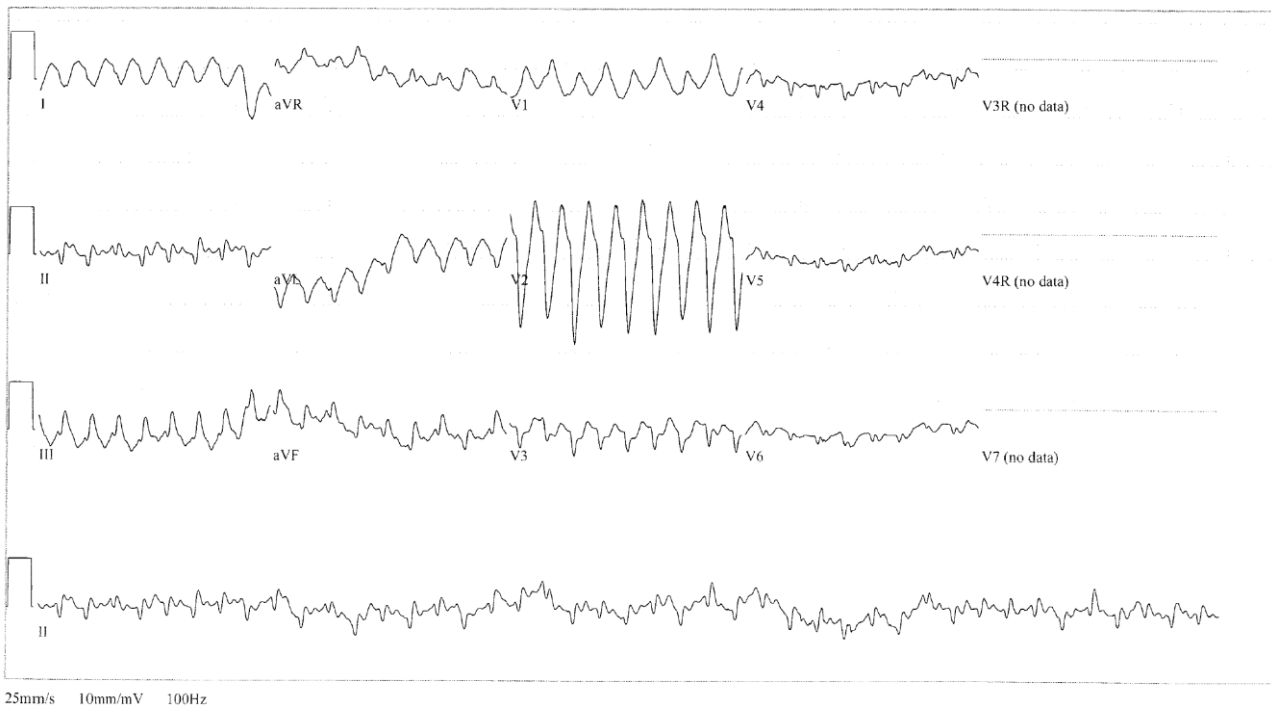
Mort subite récupérée chez un nouveau-né de sexe masculin âgé de 14 jours de vie. L'ECG met en évidence une bradycardie profonde à 58 bpm secondaire à un bloc atrioventriculaire 2/1 fonctionnel dans le cadre d'un syndrome du QT long avec un intervalle QT corrigé mesuré à 765 ms (tracé ci-dessus, âge: 15 jours). Antécédents familiaux de syncope, dysfonction sinusale, troubles de conduction et implantation d'un stimulateur cardiaque, mort subite et mort subite récupérée. Mise en évidence d'une mutation *SCN5A* (c4473G>T). Implantation d'un stimulateur cardiaque épicaudique monochambre et introduction d'un traitement beta-bloquant. Le suivi est marquée par une torsade de pointe documentée à 3 mois, une tachycardia ventriculaire polymorphe à 6 mois, et une mort subite à l'âge de 12,5 mois malgré un traitement beta-bloquant bien conduit.

Figure 4-17: Tracés du patient *SCN5A Ped. 269* (London, UK)



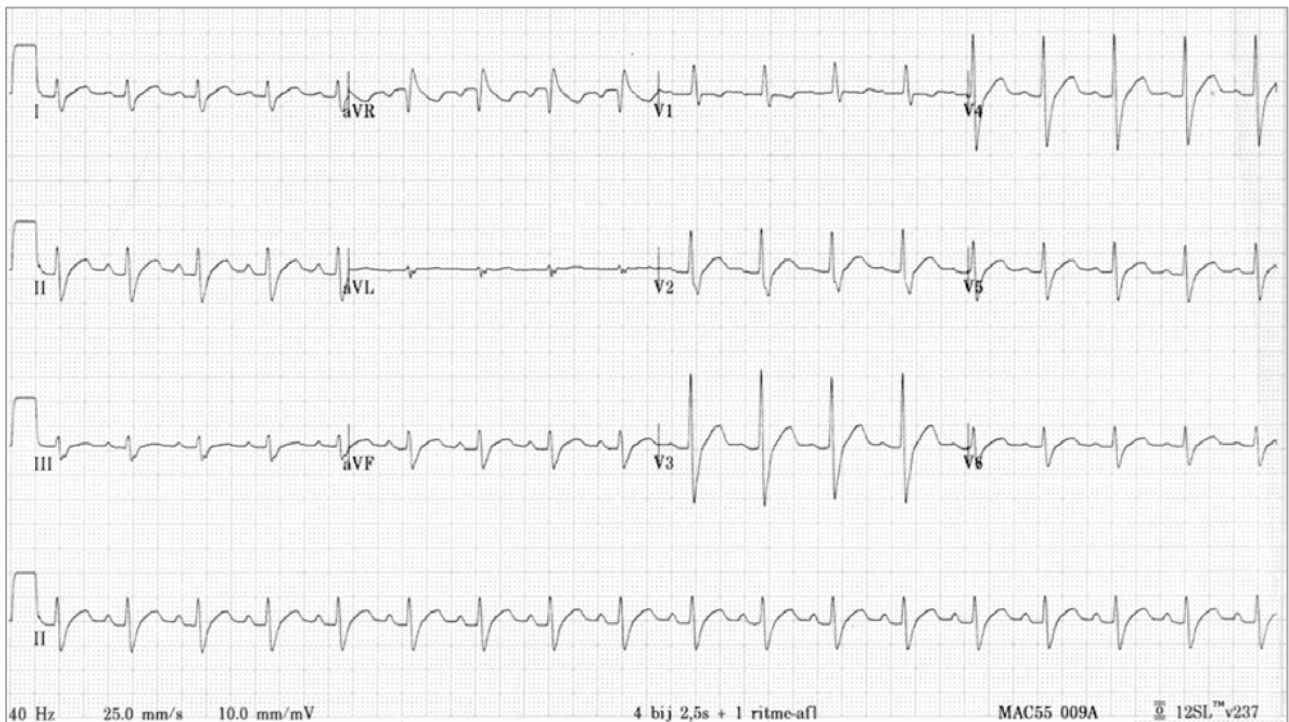
Adolescent ayant présenté une syncope au repos à l'âge de 14,7 ans. Antécédents familiaux de syncopes et d'implantation de défibrillateur. L'ECG met en évidence un syndrome du QT long avec un intervalle QT corrigé à 534 ms, sans sus-décalage du segment ST. Implantation d'un défibrillateur automatique endocavitaire monochambre, associé à un traitement beta-bloquant. Après un suivi de 3,7 années, 11 chocs appropriés ont été documentés en lien avec accès de tachycardia ventriculaire monomorphe soutenue, un orage électrique (traces ci-dessus, âge: 18 ans) et une fibrillation ventriculaire.

Figure 4-18: Tracés du patient *SCN5A* Ped. 359 (Toronto, Canada)



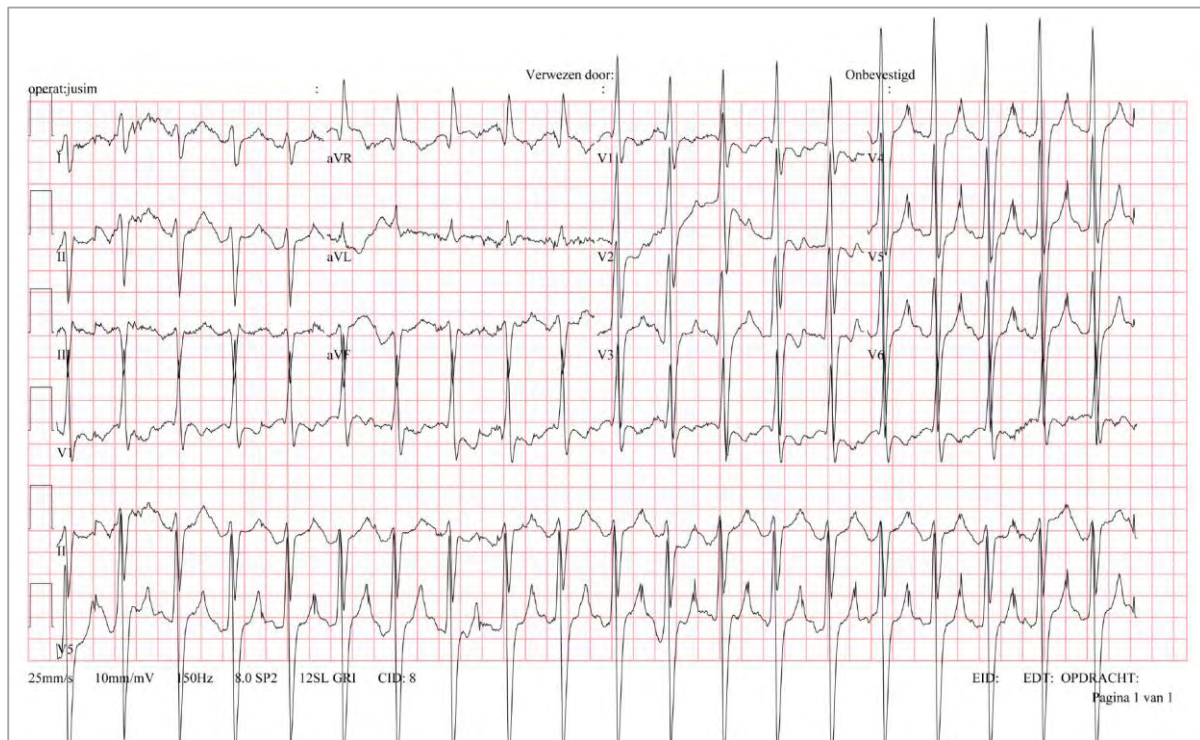
Mort subite récupérée chez un nourrisson de sexe féminin, âgé de 18 mois, survenue en contexte fébrile. Antécédents familiaux de syncopes non explorées. L'ECG basal montre un bloc atrioventriculaire du premier degré (PR 200 ms), un intervalle QT corrigé mesuré à 444 ms et l'absence de sus-décalage spontané du segment ST. Mise en évidence d'une mutation *SCN5A* à effet perte de fonction (c4845C>G). Introduction d'un traitement beta-bloquant. Après un suivi de 3,5 ans, documentation d'un accès de tachycardie ventriculaire soutenue symptomatique (tracé ci-dessus, âge 20 mois).

Figure 4-19: Tracés du patient *SCN5A Ped. 14* (Amsterdam, The Netherlands)



Nourisson de sexe féminin, sans antécédents familiaux, ayant présenté une mort subite récupérée à l'âge de 2,2 mois, survenue en contexte fébrile. L'ECG enregistré au décours de l'évènement est sans particularité (premier tracé, âge: 2,2 mois; QT corrigé: 428 ms, pas de sus-décalage type 1 du segment ST). Mise en évidence d'une mutation *SCN5A* à effet perte de fonction (c934+1G>A). Introduction d'un traitement beta-bloquant. Après 6,5 ans de suivi, 3 accès de tachycardie ventriculaire soutenus ont été documentés exclusivement en période néonatale et en contexte fébrile (second tracé, âge: 3 mois).

Figure 4-20: Tracés du patient SCN5A Ped.12 (Amsterdam, The Netherlands)



Nourrisson de sexe masculin, ayant présenté une syncope à l'âge de 3 mois. Antécédents familiaux de mort subite et de mort subite du nourrisson. Troubles de conduction étagés (PR: 205 ms, QRS: 125 ms) et allongement de l'intervalle QT (QT: 360 ms, QT corrigé: 494 ms) sur l'ECG au diagnostic (premier tracé, âge: 3 mois). Mise en évidence d'une double mutation SCN5A (c468G>A et c673C>T homozygote). Deux épisodes de tachycardie ventriculaire soutenue documentés dans l'enfance (second tracé, âge: 13 ans) et un orage électrique à l'âge de 14 ans malgré un traitement bêta-bloquant bien conduit ayant justifié l'implantation d'un défibrillateur automatique endocavitaire double chambre en prévention secondaire. Après un suivi de 20 ans, 8 thérapies de défibrillation appropriées ont été délivrées en réponse à des accès de tachycardie ventriculaire monomorphe soutenus.

Figure 4-21: Tracés du patient *SCN5A Ped.100* (Auckland, New Zealand)



Nourrisson de sexe féminin, ayant présenté un arrêt cardiaque inaugural (réanimé) à l'âge de 21 mois, en contexte fébrile. Pas d'antécédents familiaux. L'ECG initial documente une tachycardie régulière à 300 bpm à complexes QRS larges avec dissociation atrioventriculaire (premier tracé, âge: 21 mois). L'ECG basal enregistré après cardioversion spontanée évoque un syndrome de Brugada, l'aspect en dôme du segment ST (type 1) étant spontané, en particulier lors de l'enregistrement dans le 3e espace intercostal, et confirmé par un test à l'ajmaline positif (second tracé, page suivante, âge: 21 mois). Mise en évidence d'une mutation *SCN5A* (c4299+1dup) à effet perte de fonction. La survenue d'une récurrence de tachycardie ventriculaire soutenue symptomatique sous traitement par sotalol conduit à l'implantation d'un défibrillateur automatique épiscardique monochambre à l'âge de 4,5 ans. Après 9 ans de suivi, 1 choc approprié a été délivré en réponse à une nouvelle tachycardie ventriculaire monomorphe soutenue (troisième tracé, page suivante, âge: 6 ans).

Patient *SCN5A Ped.100* (suite)

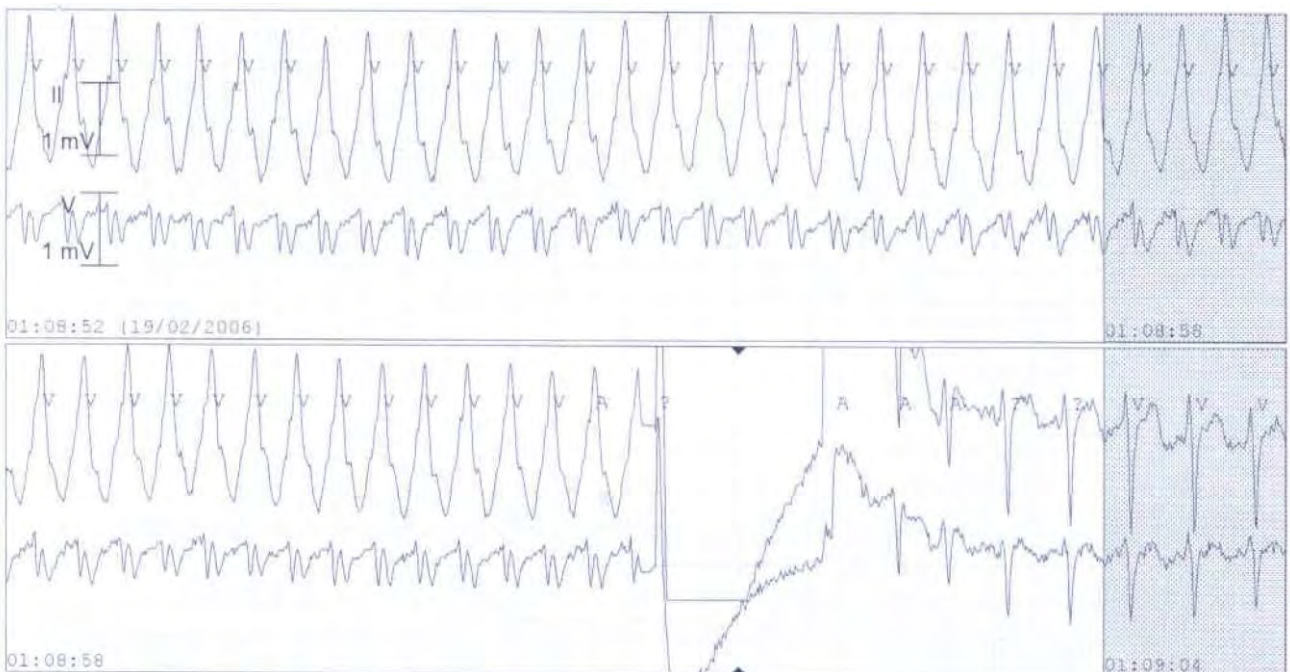
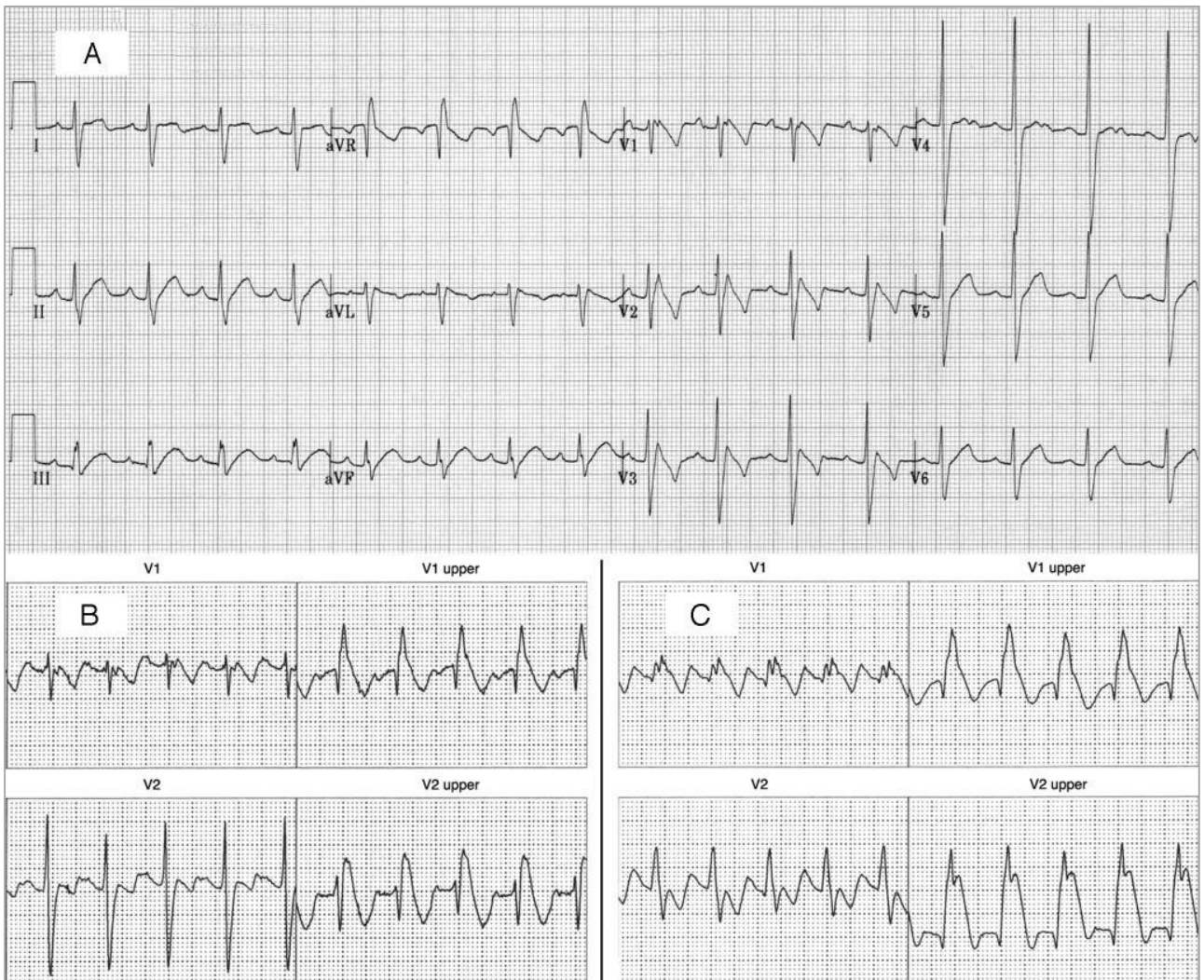
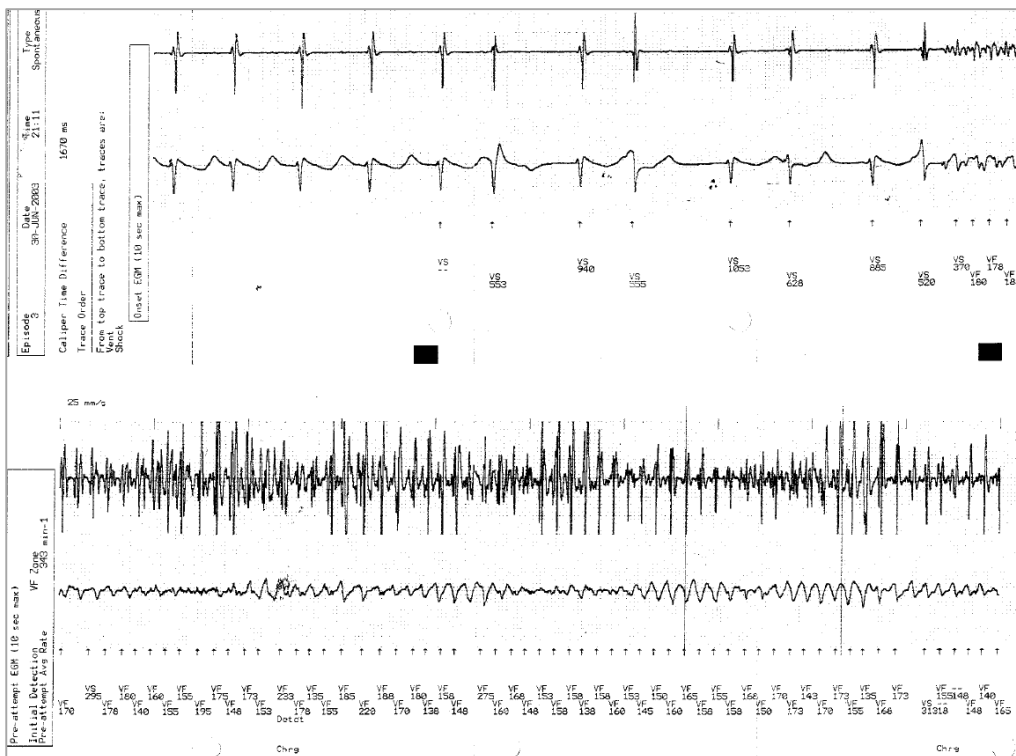
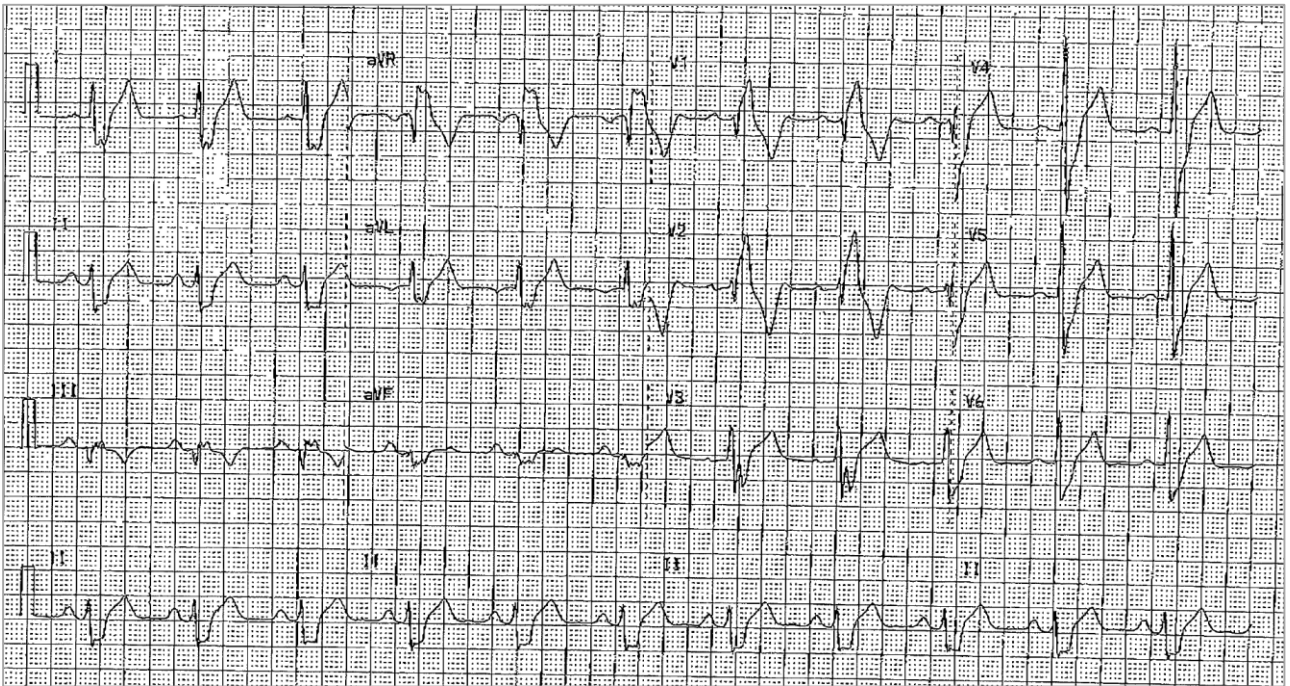


Figure 4-22: Tracé du patient *SCN5A* Ped. 93 (Copenhagen, Denmark)



Syncope à l'exercice chez un jeune garçon de 11 ans, sans antécédents familiaux notables. L'ECG révèle un aspect de syndrome de Brugada type 1 spontané (premier tracé, âge: 11 ans). Mise en évidence d'une mutation *SCN5A* (c673C>T). Stimulation ventriculaire programmée positive avec induction d'une tachycardie ventriculaire, conduisant à l'implantation d'un défibrillateur automatique endocavitaire double chambre en prévention secondaire. Un choc approprié documenté au cours du suivi, en relation avec une fibrillation ventriculaire (électrogramme endocavitaire, second tracé, âge: 17,5 ans).

IV- PERSPECTIVES

Ce travail d'inclusion multicentrique donne lieu à de nombreuses perspectives. Pour pouvoir présenter ici des résultats préliminaires, nous avons dû faire une analyse sur un premier échantillon de 423 patients pour qui l'ensemble des données relatives au génotype, au phénotype et au suivi avaient pu être recueillies avant l'impression de cette thèse. Les patients de Boston, Philadelphie et certains patients de Milan sont encore en cours d'inclusion et nous devrions être en mesure de constituer une cohorte globale de près de 500 enfants mutés *SCN5A* d'ici quelques semaines.

Notre première analyse vise à mieux caractériser les relations génotype-phénotype dans cette série à l'âge pédiatrique. D'autres axes de travail pourront être secondairement utilisés pour exploiter la base de données, tels que l'analyse spécifique des critères de risque chez les enfants porteurs d'une mutation *SCN5A* et présentant des troubles de conduction (n=171), ceux porteurs d'un LQT3 (n=158) ou d'un syndrome de Brugada (n=61), ainsi que l'analyse plus spécifique des paramètres d'évaluation à l'effort (n=116 patients) ou celle des enfants implantés d'un défibrillateur (n=70).

Au cours de ce travail, j'ai également été contacté par l'équipe du Pr. Peter C. Ruben, à Vancouver, Canada, dont le laboratoire (Department of Biomedical Physiology, Simon Fraser University), mène un programme de recherche fondamentale sur les propriétés biophysiques des canaux sodiques pour une meilleure compréhension des relations structure-fonction de ces canaux au niveau cardiaque (maladies rythmiques héréditaires), cérébral (épilepsie) et musculaire (paralysie périodique et dystrophie non myotonique). Le Dr. Mena Abdelsayed y étudie les mécanismes de déclenchement des arythmies ventriculaires liées à l'exercice physique dans les canalopathies sodiques cardiaques, principalement le LQT3 et le BrS, en s'intéressant à l'effet des variations de température et des variations de concentration de calcium cytosolique sur les mutants *SCN5A* associés aux syndromes de chevauchement associant BrS et LQT3. Ses premiers résultats suggèrent que les effets des mutations *SCN5A* sont diversement affectés par ces paramètres, les anomalies électrophysiologiques étant améliorées, non modifiées ou exacerbées par leurs variations [Abdelsayed *et al*, 2015; Abdelsayed *et al*, 2013].

Son hypothèse de travail actuelle est que cette réponse différentielle des canaux sodiques mutés aux variations de température et de calcium intracellulaire soit due à un effet propre à chaque mutation, lié à la localisation de la mutation dans *SCN5A*. En d'autres termes l'hypothèse est que la survenue ou non d'arythmies ventriculaires à l'effort chez les patients porteurs d'une mutation *SCN5A* diffère selon les mutations et soit lié à la mutation elle-même et à sa localisation au sein du gène.

Le Pr. Shubhayan Sanatani (Children's Heart Center, University of British Columbia, Vancouver) nous a mis en contact, pour donner accès au Dr. Abdelsayed à une base de données cliniques qui lui permette d'approfondir ses travaux par des évaluations à l'effort de patients mutés *SCN5A*. Parmi les 423 enfants inclus dans notre série multicentrique au moment de la rédaction de ma thèse, 116 ont eu un test d'effort sur bicyclette ergométrique. Pour 81 d'entre eux j'ai pu récupérer trois tracés par examen: un premier tracé au repos juste avant le test, un second tracé contemporain du pic de l'effort et un troisième tracé à 5 minutes de récupération. Je lui ai envoyé les 243 tracés et leur interprétation (fréquence cardiaque, durée de l'intervalle PR, du complexe QRS, du QT corrigé par la formule de Bazett, mesure du segment ST par rapport à la ligne isoélectrique, survenue d'évènements rythmiques), ainsi que les caractéristiques générales des patients sélectionnés, la liste des mutations correspondantes et leur topologie au sein de *SCN5A*. Cette nouvelle collaboration devrait ensuite se poursuivre à l'occasion de travaux futurs, l'équipe de Vancouver étant déjà impliquée dans ce projet et dans l'étude DISCO (chapitre 5).

**CHAPITRE 5: ETUDE DES BASES GÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES DU BLOC
 ATRIO-VENTRICULAIRE DIAGNOSTIQUÉ *IN UTERO* ET AU COURS DE
 L'ENFANCE, ASSOCIÉ A UNE CARDIOPATHIE CONGÉNITALE**

I- INTRODUCTION

Les cardiopathies sont les plus fréquentes des malformations congénitales, touchant 1 à 2% des nouveau-nés [Hoffman *et al.* 2002]. Un trouble de la conduction cardiaque associé à une cardiopathie congénitale peut être la conséquence d'anomalies de la spécification et/ou de la structuration du système cardionecteur, d'un refoulement des voies de conduction, d'altérations hémodynamiques, d'une hypoxie prolongée ou de séquelles postopératoires. Des mutations dans le gène *NKX2.5* ont été identifiées comme étant associées à des troubles de la conduction AV et/ou à des cardiopathies congénitales dont le spectre phénotypique semble vaste (allant de la communication interatriale ostium secundum isolée à l'hypoplasie du cœur gauche), non syndromique et de transmission autosomique dominante [Schott *et al.* 1998; McElhinney *et al.* 2003; Guntheroth *et al.* 2012]. Par ailleurs certaines malformations cardiaques congénitales complexes, telle que la discordance atrioventriculaire (AV) qui concerne la croix du coeur, représentent un substrat privilégié pour le développement de troubles de conduction.

Ce cinquième chapitre s'intéresse aux troubles de conduction AV associés aux cardiopathies congénitales. Il s'articule autour de deux études:

- 1- une étude rétrospective multicentrique nationale visant à préciser le phénotype cardiaque et le pronostic à long-terme des patients porteurs d'une mutation *NKX2.5* (Etude #7).
- 2- une étude rétrospective multicentrique internationale visant à préciser les caractéristiques des troubles du rythme et de la conduction cardiaques associés aux cardiopathies congénitales complexes avec discordance atrioventriculaire (Etude #8: DISCO).

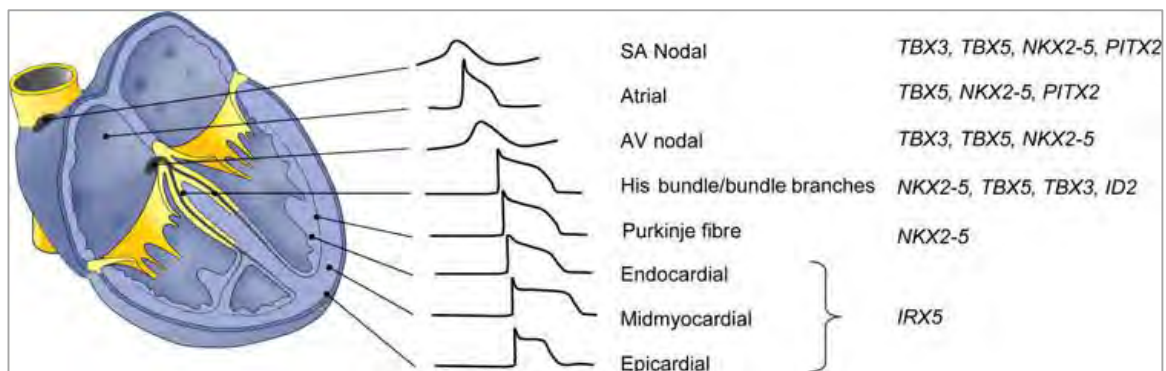
II- Etude #7: ETUDE DES TROUBLES DE CONDUCTION ET DU PHÉNOTYPE CARDIOVASCULAIRE DES PATIENTS PORTEURS D'UNE MUTATION DU GÈNE *NKX2.5*

II.1- Problématique

Les cardiopathies congénitales sont les plus fréquentes des affections présentes à la naissance, touchant 1 à 2 % des nouveau-nés [Hoffman *et al.* 2002]. Sur le plan embryologique, le système de conduction est issu des précurseurs cellulaires myocardiques présents dans le coeur foetal. C'est l'expression régionale de facteurs de transcription qui régit le processus conduisant ces cellules à se différencier en une lignée destinée à assurer la conduction cardiaque plutôt qu'en des cardiomyocytes [Bruneau *et al.* 2001; Christoffels *et al.* 2010; Moskowitz *et al.* 2007]. Les principaux facteurs de transcription identifiés à ce jour comme intervenant dans le développement du SCC humain sont les facteurs à boîte T et à boîte homéotique.

Le gène *NKX2.5* (5q35.1, 2 exons) qui appartient à la famille des homéodomaines, joue un rôle clé dans l'induction et le maintien du SCC (Figure 5-1).

Figure 5-1 : Représentation du potentiel d'action dans différentes parties du système de conduction cardiaque



Les facteurs de transcription impliqués dans le développement des différentes régions du coeur et qui en influence les propriétés électriques sont représentés. *NKX2.5* joue un rôle clé dans l'induction et le maintien du SCC à tous ses niveaux.

Adapté de [Postma *et al.*, 2011]

Le rôle de *NKX2.5* dans le développement du SCC humain a été établi à la suite de la découverte de mutations du gène correspondant au sein de 4 familles dont des membres étaient atteints de cardiopathie congénitale non syndromique et de bloc de conduction atrioventriculaire [Schott *et al*, 1998]. L'étude généalogique était en faveur d'un mode de transmission autosomique dominant. Sur 33 individus atteints, 27 présentaient une communication inter-atriale (CIA) et tous ceux dont les données cliniques étaient disponibles avaient des troubles de la conduction atrioventriculaire. Huit patients avaient également une autre malformation cardiaque congénitale: communication interventriculaire (CIV), tétralogie de Fallot, sténose aortique sous-valvulaire ou atrésie pulmonaire.

Depuis cette publication princeps, de nombreux auteurs ont génotypé *NKX2.5* dans différents groupes de patients porteurs d'une cardiopathie congénitale. Du fait de la grande diversité du phénotype cardiaque associé aux mutations *NKX2.5*, une relation génotype-phénotype n'a pas été établie à ce jour. De plus, la publication récente de cas de morts subites associées à des mutations de ce gène incitent à reconsidérer la sévérité potentielle de cette pathologie héréditaire, initialement décrite pour des malformations cardiaques congénitales considérées comme "mineures" (CIA, CIV, tétralogie de Fallot).

II.2- Objectif

L'objectif de ce travail était de colliger une vaste série de tous les patients porteurs d'une mutation *NKX2.5* génotypés en France, décrire leur phénotype cardiaque et établir leur devenir à long terme, pour mieux caractériser le phénotype cardiovasculaire associé aux mutations *NKX2.5*.

II.3- Méthodologie

Nous avons mis en place une étude de cohorte retrospective, multicentrique, nationale. Tous les patients (enfants et adultes, vivants et décédés) porteurs d'une mutation *NKX2.5* diagnostiquée dans les laboratoires de cardiogénétique de l'institut du thorax, Université de Nantes et de l'EA4173, Université de Lyon-1, ont été inclus dans ce travail, représentant une population de 47 patients génotypés.

Les données relatives à l'histoire familiale (cardiopathies congénitales, troubles de conduction, mort subite), au diagnostic (clinique, ECG, holter ECG, échocardiographie), et au suivi (prise en charge thérapeutique le cas échéant, évènement majeur au cours du suivi, date du dernier suivi et statut à la dernière consultation) ont été recueillis avec soin auprès de tous les médecins correspondants par trois investigateurs: Philippe Maury, Alice Maltret et moi.

Les ECG 12-dérivations de tous les patients inclus dans l'étude ont été recueillis au moment du diagnostic et du dernier suivi afin de juger de l'existence de troubles de conduction et de leur évolution. Les ECG ont été systématiquement réinterprétés par deux médecins co-investigateurs (Philippe Maury et moi) "en aveugle" concernant le phénotype du patient. Le diagnostic des troubles de conduction atrioventriculaire et/ou intraventriculaire et l'analyse de l'intervalle QT ont été réalisés selon les définitions usuelles et les critères recommandés par l'American Heart Association et l'Heart Rhythm Society [Surawicz *et al*, 2009; Rautaharju *et al*, 2009; Elizari *et al*, 2007; Mangrum *et al*, 2000]. Les mesures de la fréquence cardiaque, de l'intervalle PR (non réalisée en cas de BAV complet), de la durée du complexe QRS et de l'intervalle QT ont été réalisées, et l'intervalle QT a été corrigé pour la fréquence cardiaque en utilisant la formule de Bazett [Bazett *et al*, 1920].

Implication personnelle. Mon implication personnelle dans ce travail a été de réaliser le recueil des données de tous les patients génotypés à Nantes (28 patients soit 59.6% des maladies de la série).

II.4- Principaux résultats

Ce travail est présenté dans l'abstract "**Cardiac phenotype and prognosis of patients with mutations in *NKX2.5* gene**" situé à la fin de cette section. Cet abstract a été accepté en communication affichée au 12ème congrès médico-chirurgical de la Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale et 5ème Rencontres Francophones Multidisciplinaires des Cardiopathies Congénitales (Martinique, 21-24 novembre 2015). L'article correspondant est en cours de rédaction et sera soumis dans les semaines à venir.

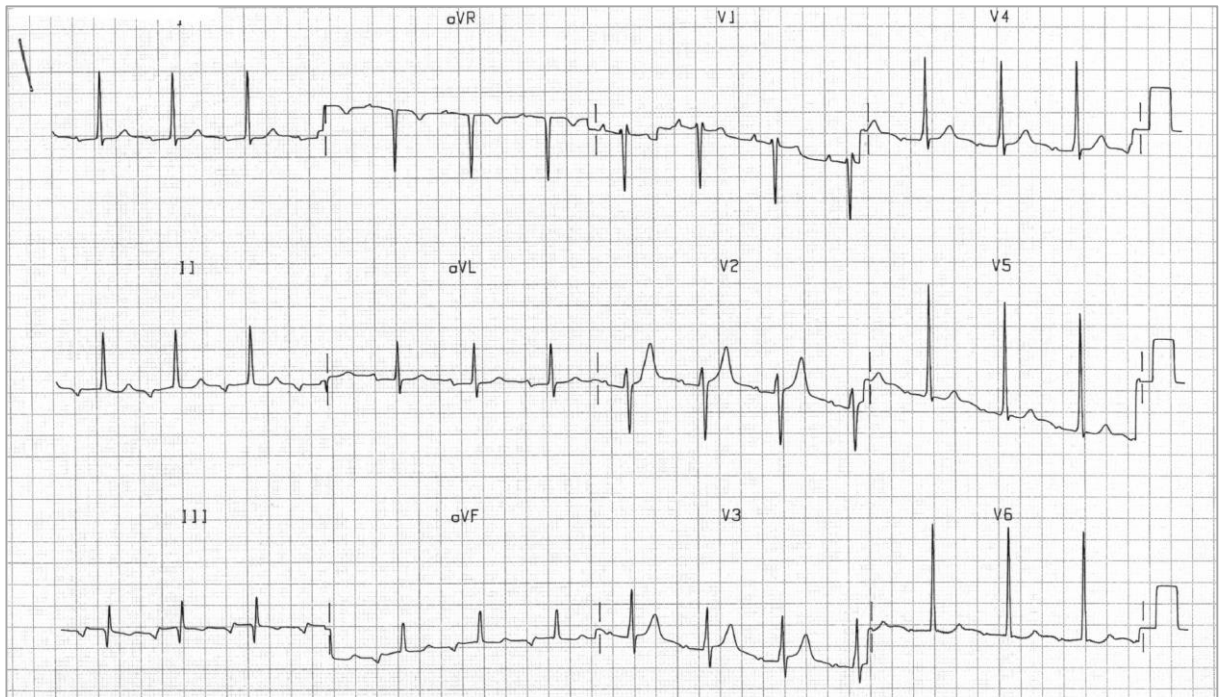
Un total de 47 patients (24 hommes, âge médian au diagnostic: 25 ans, 0-69 ans) porteurs d'une mutation *NKX2.5* ont été inclus dans ce travail, représentant 20 familles (soit 2.5 ± 1.5 patient muté par famille). Une histoire familiale de mort subite ou d'implantation d'un stimulateur cardiaque était retrouvée dans 45.0% et 25.0% des cas respectivement.

Les principales malformations cardiaques congénitales étaient une CIA et une CIV, diagnostiquées dans 70% et 15% des cas respectivement. La fonction systolique ventriculaire gauche était normale excepté chez 2 patients. Des anomalies de la conduction cardiaque étaient observées chez 82% des patients. Treize patients (27.6%) ont développé un BAV complet ou un BAV de haut grade paroxystique ou permanent au cours du suivi. Les analyses des ECG (Figure 5-2) montraient une fréquence cardiaque moyenne de 78 ± 19 bpm, un intervalle PR de 219 ± 43 ms, un complexe QRS de 86 ± 15 ms et un intervalle QT corrigé de 408 ± 27 ms. Une étude électrophysiologique était pratiquée chez 15 patients (5 blocs supra-hissiens, 3 blocs infra-hissiens). Un stimulateur cardiaque permanent était implanté chez 20 (42.6%) patients, associé à un défibrillateur implantable chez 5 (10.6%) patients. Le taux de stimulation était de $77 \pm 37\%$, six patients étant dépendants du stimulateur.

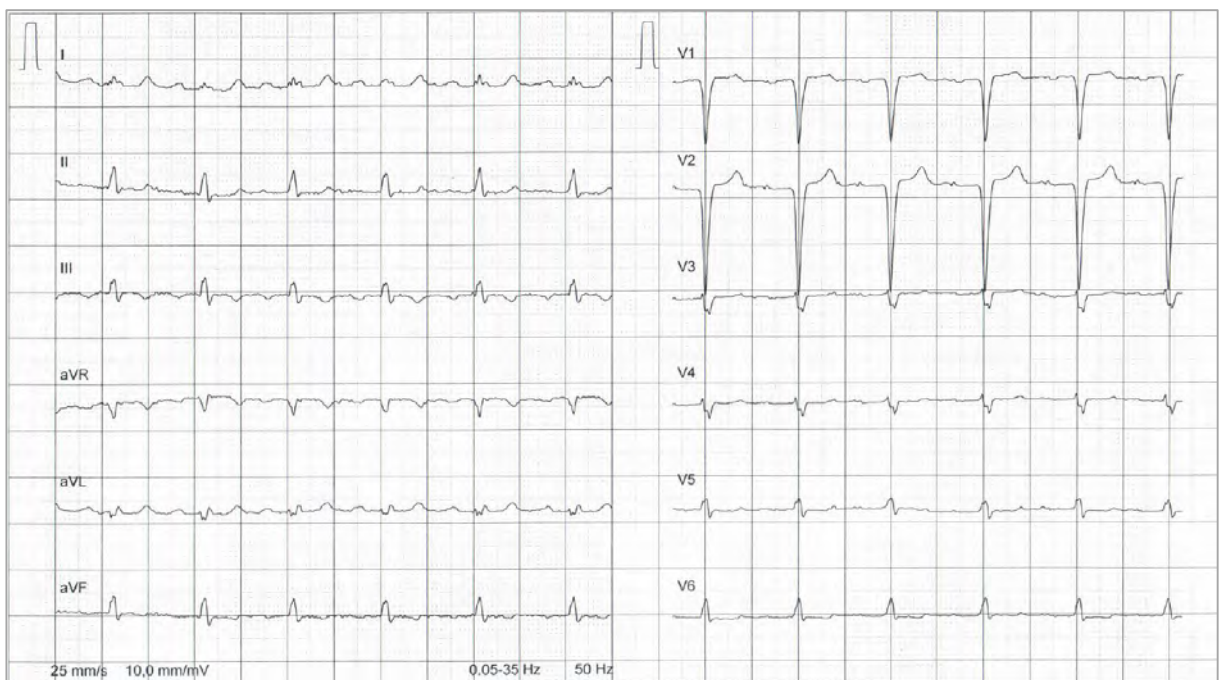
Au cours du suivi 3 patients sont décédés, 2 d'entre eux (4.3%) d'une mort subite, le troisième d'une endocardite. Des accès de tachycardie ventriculaire non-soutenue ou soutenue étaient observés chez 6 (12.8%) patients, et une arythmie supraventriculaire (majoritairement de la fibrillation atriale) paroxystique ou permanente était documentée chez 13 (27.7%) patients. Cinq patients ont évolué vers l'apparition d'une cardiomyopathie dilatée, 3 d'entre eux avec une hypertrophie ventriculaire gauche associée et 4 avec des signes de non-compaction du ventricule gauche.

Le spectre phénotypique des mutation *NKX2.5* est riche, dominé par une CIA avec/sans CIV et associée à des troubles de la conduction atrioventriculaire progressifs conduisant à l'implantation d'un stimulateur cardiaque permanent avec/sans défibrillateur chez près de la moitié des patients. L'atteinte du ventricule gauche est moins fréquente mais une cardiomyopathie dilatée, des arythmies ventriculaires et une mort subite peuvent survenir avec le temps, justifiant un suivi médical rigoureux et adapté.

Figure 5-2: ECG de patients porteurs d'une mutation NKX2.5



Patient de 17 ans (mutation NKX2.5 c.464G>C) porteur d'une communication interatriale ostium secundum et de troubles de conduction avec un BAV du premier degré (intervalle PR: 280 ms) permanent.



Patiente de 30 ans (mutation NKX2.5 c.206del) porteuse d'une communication interatriale ostium secundum, de troubles de conduction associant un BAV du premier degré (intervalle PR: 236 ms) permanent et un bloc de branche gauche complet (complexe QRS: 120 ms), d'une cardiomyopathie dilatée avec aspect de non-compaction ventriculaire gauche, et présentant une dysfonction systolique (FEVG 30%) et des accès de tachycardie ventriculaire soutenue.

POSTERS COMMENTÉS

Lundi 23 novembre de 7 h 45 à 8 h 45

P1

Aortic root dilatation and stiffness assessed by magnetic resonance imaging in adults with repaired tetralogy of FallotFlorence Pontnau^{1*}, Magalie Ladouceur^{1,2,3}, Antonio Ferreira⁴, Laurence Iserin¹, Elie Mousseaux^{3,5}¹ Adult congenital heart diseases unit, Department of cardiology, APHP-Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris, France.² Pediatric cardiology department, Centre de référence des malformations cardiaques congénitales complexes, M3C, APHP, Hôpital Necker, Paris, France.³ INSERM, U970, PARCC, Paris, France.⁴ Department of radiology, Centro hospitalar de Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal.⁵ Department of radiology, APHP, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris, France.

* Corresponding author: florence.pontnau@egp.aphp.fr

Purpose We aimed to assess dimensions and biomechanics of the thoracic aorta in patients with repaired tetralogy of Fallot (TOF), using Cardiac Magnetic Resonance (CMR).

Background Aortic root dilatation frequently occurs in TOF and can lead to aortic regurgitation (AR), aortic aneurysms and its complications. Histological studies in TOF have shown abnormalities of the aortic media that can predispose to aortic root dilatation.

Methods 50 patients (aged 29±12 years) with repaired TOF and 50 control subjects (aged 29±11 years) matched for age and sex underwent CMR imaging, with standard cine and velocity sequences. The aortic root dimensions were assessed at end-diastole at the following levels: aortic annulus, sinus of Valsalva, sinotubular junction (STJ), ascending and descending aorta. Aortic elasticity was evaluated by aortic distensibility and pulse wave velocity (PWV). CMR included conventional left ventricle (LV) and right ventricle (RV) systolic function and volume study, AR fraction measure.

Results Diameters of the aorta indexed to the body surface area were significantly increased in TOF compared to controls at level of sinus of Valsalva (22.6±3.8 vs 17.0±2.0mm/m²; p<0.001), STJ (18.2±4.1vs 13.3±1.7mm/m²; p<0.001) and ascending aorta (20.0±4.3 vs 14.3±2.0mm/m²; p<0.001). In contrast, the diameter at annulus and descending aorta was no significantly different. Ascending aorta has a reduced distensibility in patients compared to controls (3.4±2.2 vs 6.6±2.4 x10⁻³mmHg⁻¹; p<0.001) and PWV in the aortic arch is significantly increased (8.1±6.6 vs 4.3±1.3 m/s; p<0.001). Unlike controls, PWV and aortic velocity were not correlated with age in TOF. AR occurs more often in TOF than in controls. Aortic dilatation and stiffness were not related to age at surgical repair. Both LV and RV systolic functions were moderately impaired in TOF.

Conclusions Aortic root dilatation is associated with increase in aortic stiffness. These parameters can be easily measured by CMR.

Conflict of interest The authors have not transmitted any conflicts of interest.

P2

Cardiac phenotype and prognosis of patients with mutations in NKX2.5 genePhilippe Maury^{1*}, Alban Baruteau², Estelle Gandjbakhch³, Francis Besière¹, Patrice Bouvagnet⁴, Florence Kyndt², Sébastien Hascoët¹, Sylvie Di Filippo⁴, Françoise Hidden-Lucet¹, Philippe Chevalier⁴, Damien Bonnet⁵, Vincent Probst², Alice Maltret³¹ University Hospital Rangueil, Toulouse, France.² Centre du thorax, Nantes, France.³ University Hospital La Pitié Salpêtrière, Paris, France.⁴ University Hospital Louis Pradel, Lyon, France.⁵ University Hospital Necker, Paris, France.

* Corresponding author: mauryjphil@hotmail.com

Introduction Mutations in NKX2.5 gene explain familial forms of atrial septal defect (ASD) associated with atrioventricular conduction disturbances and unexplained sudden death (SD) but cardiac phenotype has not been described in a large population of patients with NKX2.5 mutations.

Methods All successive patients with mutations in NKX2.5 gene were included, representing the whole population of french NKX2.5 mutated patients.

Results 47 pts carried NKX2.5 gene mutations (24 men, median 25 yo, 0 to 69) (20 unrelated families, 2.5±1.5 mutated subject/family). There was an history of SD in 9 and of pace-maker implantation in 5 families. ASD was present in 70% (surgically corrected in 67% and percutaneously in 2 pts) and ventricular septal defect in 15%. Conduction disturbances were observed in 82%. 13 pts (27%) developed complete or high degree AV block. Available ECGs showed PR interval of 219±43 ms, QRS duration of 86±15 ms and a QTc of 408±27 ms. Electrophysiological study was performed in 15 pts (3 had infra hisian and 5 suprahisian block).

A pace-maker was implanted in 20 pts (with ICD in 5) and a loop recorder in one. Sustained or nonsustained ventricular tachycardia were observed in 6 pts. Mean ventricular pacing % was 77±37. Six pts were dependent of the pace-maker. Three patients deceased over the follow-up (2 SD and one endocarditis). 13 pts developed paroxysmal or permanent supraventricular arrhythmias (mainly atrial fibrillation). Five pts displayed dilated cardiomyopathy, 3 had left ventricular (LV) hypertrophy and 4 with features of noncompacted LV. LV ejection fraction was normal except in 2 cases (35%).

Conclusion Carriers of NKX2.5 gene mutations harbor a rich phenotype associating most of the time ASD and/or VSD together with evolutive AV block leading to pace-maker/ICD implantation in a significant part of them. Associated LV cardiomyopathy is less frequent but ventricular arrhythmias appear common and SD may happen.

Conflict of interest The authors have not transmitted any conflicts of interest.

P3

3D Transthoracic echocardiography assessment of the pulmonary valve in patients with TOFKhaled Hadeed^{1*}, Sébastien Hascoët¹, Romain Amadiou¹, Yves Dulac¹, Sophie Breinig¹, Philippe Acar¹¹ Pediatric cardiology unit, Children's Hospital, Toulouse University Hospital, France

* Corresponding author: hadeed.k@chu-toulouse.fr

Background Accurate evaluation of pulmonary valve (PV) morphology and pulmonary annulus (PA) diameter is crucial before surgical correction of tetralogy of Fallot (TOF). Our aim was to assess PV morphology using three-dimensional transthoracic echocardiography (3D-TTE) in infants with TOF before surgical correction. And to compare PA diameter obtained by different imaging modalities.

Methods 30 patients with TOF were prospectively included. All patients underwent 2D and 3D-TTE, 23 patients underwent CT-Scan and 7 cardiac catheterization. PA diameter was measured using 2D-TTE in parasternal short axis view as recommended. 3D dataset was acquired using zoom mode at PV. Both vertical (Dv) and horizontal (Dh) diameters of PA were measured. Mean 3D diameter (3DD) was calculated as (Dv+Dh/2). Eccentricity index (EI) of PA was calculated (Dv - Dh/Dv). These measurements were compared to CT-Scan and angiography when available and to perioperative measurements.

Results Mean age was 7.4 months (3-24 months), mean weight was 6.6 kg (4.5-13.5 kg). PV was described as bicuspid in 15/30 patients by 3D-TTE from en face view, with 75% agreement between 3D-TTE and perioperative finding (20/30 patients). PA geometry was slightly asymmetric by 3D-TTE. Dv was significantly larger than Dh (8.4 mm vs 7.4 mm, p = 0.001), and mean

III- Etude #8: DISCO – UNE ÉTUDE DES TROUBLES DE CONDUCTION ASSOCIÉS AUX MALFORMATIONS CARDIAQUES CONGÉNITALES COMPLEXES AVEC DISCORDANCE ATRIO-VENTRICULAIRE

III.1- Problématique

La discordance AV est une malformation cardiaque congénitale complexe et rare, d'étiologie inconnue, dont la stratégie chirurgicale a été longtemps grevée d'une morbi-mortalité significative et dont le pronostic à long terme reste incertain. De nombreuses questions se posent depuis des décennies, et peinent à être clarifiées du fait de la faible prévalence de cette cardiopathie et donc des modestes échantillons de patients étudiés dans les différents travaux publiés à ce jour, y compris lors de précédentes inclusions multicentriques. De plus les données disponibles dans la littérature médicale sont issues de séries souvent anciennes, non actualisées. A titre d'exemple la plus grande cohorte de patients porteurs d'une transposition physiologiquement corrigée des gros vaisseaux publiée à ce jour, rapportait il y a 15 ans l'évolution de 182 malades colligés dans 19 centres américains [Graham *et al*, 2000].

Pour autant, étant une malformation de la croix du coeur, la discordance AV est le substrat par excellence pour favoriser l'apparition de troubles de la conduction cardiaque. Elle favorise également la survenue d'arythmies supraventriculaires et ventriculaires, une incompetence progressive d'une valve atrioventriculaire tricuspide en position systémique et une dysfonction du ventricule droit sous-aortique [Martins *et al*, 2008; Warnes *et al*, 2006]. Enfin son étiologie est inconnue mais des travaux récents suggèrent que la question de l'héritabilité de cette cardiopathie congénitale et/ou des troubles de la conduction AV qui y sont associés, puisse se poser [Unolt *et al*, 2013].

Les principales questions en suspens sont les suivantes:

- 1- Quelle est l'histoire familiale de ces patients porteurs d'une cardiopathie complexe d'allure sporadique, et en particulier y a-t-il des arguments pour une héritabilité de la cardiopathie congénitale ou du trouble de conduction?
- 2- Quelles sont les caractéristiques et l'histoire naturelle des troubles de conduction associés à la discordance atrioventriculaire?
- 3- Quel est l'impact de la stimulation cardiaque et de la resynchronisation sur cette cardiopathie, en particulier en cas de ventricule droit systémique?
- 4- Quels sont les troubles du rythme associés à la discordance AV et leur impact pronostic?
- 5- Quels sont les facteurs de risque de dysfonction systolique tardive du ventricule systémique, qu'il soit de morphologie droite ou gauche?
- 6- Quel est le pronostic à long terme de la correction anatomique précoce de cette cardiopathie?

III.2- Objectifs

L'objectif primaire de l'étude DISCO est de décrire les caractéristiques des troubles de conduction atrio-ventriculaire natifs observés dans les cardiopathies complexes avec discordance AV, que celles-ci soient uni ou bi-ventriculaires.

Les objectifs secondaires sont de: (a) mieux comprendre la pathogénie de la discordance atrio-ventriculaire et des troubles de conduction et de rechercher des arguments pour une héritabilité; (b) décrire les caractéristiques des troubles du rythme supra-ventriculaire et ventriculaire natifs et post-opératoires, associés à la discordance atrio-ventriculaire; (c) décrire le pronostic à long terme et les facteurs pronostics de la discordance atrio-ventriculaire dans l'ère thérapeutique actuelle.

III.3- Méthodologie

Caractéristiques de l'étude. Un travail de recherche clinique visant à constituer une vaste cohorte de patients porteurs d'une discordance AV, sélectionnés de façon rétrospective, a été mis en place pour constituer une base de données cliniques, électrocardiographiques et échographiques sans équivalent sur le phénotype d'intérêt.

L'étude DISCO (Etude #8) est une étude multicentrique internationale, rétrospective sur 45 ans (1970 à 2015). Tous les patients porteurs d'une discordance AV dans soixante-quatre centres de cardiologie pédiatrique et/ou d'électrophysiologie congénitale ont été inclus dans ce travail (39 centres en Europe, 19 en Amérique du Nord, 6 en Asie-Océanie) (Figure 5-3).

Les caractéristiques de DISCO sont résumées dans les Tableaux 5-1 et 5-2. Le projet DISCO a été approuvé par le Comité de Protection des Personnes Ile-de-France VII, protocole n°PP13-003 en date du 13/02/2013, puis localement par les Institutional Review Board (IRB) de chaque institution participante (IRB approval de Stanford présenté en annexe). Ce projet de recherche a été agréé et soutenu par la Filiale de cardiologie pédiatrique et congénitale de la Société Française de Cardiologie (FCPC) [Pr Philippe Acar, Toulouse, France], le *Working Group for Cardiac Dysrhythmias and Electrophysiology of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology* (AEPC) [Pr Juha-Matti Happonen, Helsinki, Finland], par la *Pediatric and Congenital Electrophysiology Society* (PACES) [Pr Shubhayan Sanatani, Vancouver, British Columbia, Canada] et par le *Groupe Francophone de Rythmologie Pédiatrique et Congénitale* (GFRPC) [Pr Jean-Benoit Thambo, Bordeaux, France] (voir en annexe).

Figure 5-3: Etude DISCO: planisphère des 64 centres participants

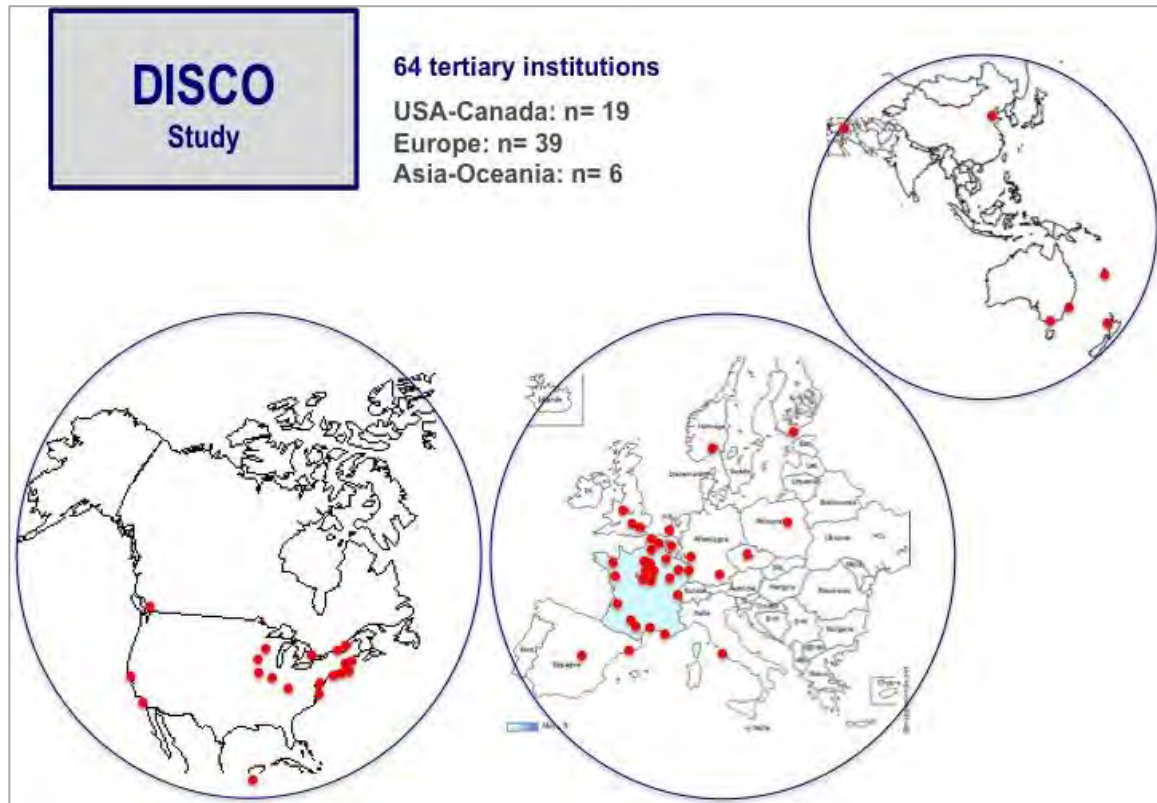


Tableau 5-1: Synopsis de l'étude DISCO (étude #8)

| | |
|------------------------------------|---|
| Titre | DISCO: Caractéristiques des troubles du rythme et de la conduction cardiaque associés aux malformations cardiaques congénitales complexes avec DISCOrdance atrio-ventriculaire |
| Institutions coordinatrices | L'institut du thorax, INSERM UMR 1087, CNRS UMR 6291 Université de Nantes, Nantes, France et L'IHU LIRYC - Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque Université Victor Segalen – Bordeaux-2, Bordeaux, France |
| Investigateur principal | Dr Alban-Elouen Baruteau |
| Statisticien | Pr. P. Kurlansky, CIOR, Columbia University, New York, USA |
| Fellows | Dr. S. Le Pennec, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes Dr. E. Fournier, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux Dr. M. Le Bloa, Clinique Pasteur, Toulouse Dr. C. Karsenty, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse Dr. M. Eloi, Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Paris |
| Schéma de l'étude | Etude rétrospective multicentrique international (64 centres participants) Europe: 39 centres, Amérique du Nord: 19 centres, Asie-Océanie: 6 centres CPP Ile de France VII le 13/02/2013 puis IRB de chaque centre participant |
| Comité d'Ethique Agrément | FCPC - Filiale de cardiologie pédiatrique et congénitale de la SFC GFRPC - Groupe Francophone Rythmologie Pédiatrique et Congénitale PACES - Pediatric and Congenital Electrophysiology Society AEPC - Association for European Paediatric Cardiology |
| Financement | European Heart Rhythm Association, Academic Research Grant 2015 Fondation Lefoulon-Delalande – Institut de France, Bourse de recherche 2015 Association for European Pediatric Cardiology, First Scientific Junior Grant 2014 |
| Comité d'experts | Pr. EA. Bacha, Columbia University – <i>Chirurgie cardiaque congénitale</i> Pr. AM. Dubin, Stanford University – <i>Electrophysiologie pédiatrique</i> Pr. CJ. McLeod, Mayo Clinic – <i>Electrophysiologie congénitale adulte</i> |
| Comité de pilotage | Pr. AM. Dubin, Stanford University, Palo Alto, CA, USA Pr. JC. Daubert, Université Rennes-1, Rennes, France Pr. L. Liberman, Columbia University, New York, NY, USA Pr. CJ. McLeod, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA Pr. RH. Pass, Albert Einstein University, Bronx, NY, USA Pr. V. Probst, L'institut du thorax, Nantes, France Pr. JB. Thambo, IHU-LIRYC, Bordeaux, France Pr. G. Van Hare, Washington University, St Louis, MO, USA Pr. EP. Walsh, Harvard Medical School, Boston, MA, USA |
| Comité scientifique | Dr. L. Nield, Toronto University, Toronto, Canada Pr. P. Bordachar, IHU-LIRYC, Bordeaux, France Dr. N. Combes, Clinique Pasteur, Toulouse, France Pr. F. Drago, IRCCS, Roma, Italy Pr. P. Khairy, Montreal University, Montreal, Canada Pr. J. Perry, University of California, San Diego, CA, USA Pr. J. Skinner, Auckland University, Auckland, New Zealand |
| Nombre de sujets inclus | 3000 patients (estimation) |
| Critères d'inclusion | Tout patient porteur d'une discordance atrio-ventriculaire diagnostiquée entre 1970 et 2015 |
| Critères d'exclusion | Aucun (consent waiver) |
| Publication | <i>En préparation</i> |

Tableau 5-2 : Liste des médecins co-investigateurs et des centres participants.

| Centres | Co-Investigateur | Institution |
|----------------|-------------------------|---|
| Europe | | |
| FRA-1 | Angèle Boët | Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Université Paris-Sud, France |
| FRA-2 | - | Refus secondaire de participer à l'étude |
| FRA-3 | Alice Maltret | Hôpital Jacques Cartier, Massy, France |
| FRA-4 | Guillaume Duthoit | La Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France |
| FRA-5 | Magalie Ladouceur | Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France |
| FRA-6 | Jean-Benoit Thambo | IHU LIRYC, CHU Bordeaux, Université Bordeaux-2, Pessac, France |
| FRA-7 | Lauriane Le Gloan | CHU Nantes, L'institut du thorax, Université de Nantes, France |
| FRA-8 | Jean-Marc Schleich | CHU Rennes, Université Rennes-1, Rennes, France |
| FRA-9 | Nicolas Combes | Clinique Pasteur, Toulouse, France |
| FRA-10 | Philippe Maury | CHU Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France |
| FRA-11 | Linda Koutbi | Hôpital de la Timone, Aix-Marseille University, Marseille, France |
| FRA-12 | Anne Moulin-Zinsch | CHU Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France |
| FRA-13 | - | Refus secondaire de participer à l'étude |
| FRA-14 | Guy Vaksman | Intercard, Lille, France |
| FRA-15 | Céline Gronier | Clinique de l'Orangerie, Strasbourg, France |
| FRA-16 | Caroline Bonnet | Hôpital d'Enfants, CHU Dijon, Université de Bourgogne, Dijon, France |
| FRA-17 | Pascal Amedro | CHU Montpellier, Université de Montpellier, France |
| FRA-18 | Ali Houeijeh | CHRU Lille, Université de Lille, France |
| FRA-19 | Anne Charbonneau | CHU de Reims, Université de Reims, France |
| FRA-20 | Bérengère Hiel | CHU d'Amiens, Université de Picardie, Amiens, France |
| FRA-21 | Constance Beyler | Hôpital Robert Debré, APHP, Paris, France |
| FRA-22 | Hugues Lucron | CHU Martinique, Université Antilles-Guyane, Martinique, Caraïbe |
| EUR-1 | Fabrizio Drago | Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Roma, Italy |
| EUR-2 | Hans Henrik Odland | Rikshospitalet, Oslo, Norway |
| EUR-3 | Juha-Matti Happonen | Helsinki University Hospital, Finland |
| EUR-4 | Christian Schreiber | German Heart Center, Munich, Germany |
| EUR-5 | Michael Zimmer | Westpfalz Klinikum, Kaiserslautern, Germany |
| EUR-6 | David Barron | Children's Hospital, Birmingham, UK |
| EUR-7 | Jasveer Mangat | Great Ormond Street Hospital, University College London, London, UK |
| EUR-8 | Sabine Ernst | Royal Brompton Hospital, Imperial College, London, UK |
| EUR-9 | Jan Janousek | University Hospital Motol, Prague, Czech Republic |
| EUR-10 | Ewa Kowalik | Institute of Cardiology, Varsaw, Poland |
| EUR-11 | Raphael Peinado | University Hospital La Paz, Madrid, Spain |
| EUR-12 | Marc Gewillig | University Hospital Leuven, Leuven, Belgium |
| EUR-13 | Maurice Beghetti | Hôpitaux Universitaires de Genève, Genève, Suisse |
| EUR-14 | - | Refus secondaire de participer à l'étude |
| EUR-15 | Willem Helbing | Sophia Children's Hospital, Rotterdam, The Netherlands |
| EUR-16 | Leonid Makarov | Russian Center for Children's Arrhythmias, Moscow, Russia |
| EUR-17 | G. Sarquella-Brugada | Hospital Sant Joan de Deu, University of Barcelona, Spain |
| Asie | | |
| ASI-1 | Kursad Tokel | Baskent University Hospital, Ankara, Turkey |
| ASI-2 | Shoujun Li | Fuwai Hospital, Beijing, China |
| Océanie | | |
| OCE-1 | | |
| OCE-2 | Jonathan Skinner | Starship Children's Hospital, Auckland University, New Zealand |
| OCE-3 | Andrew Davis | Royal Children's Hospital, Melbourne University, Melbourne, Australia |
| OCE-4 | Garry Sholler | Westmead Children's Hospital, Sydney University, Sydney, Australia |

| Centres | Co-Investigateur | Institution |
|-------------------|-------------------------|--|
| Etats-Unis | | |
| USA-1 | Edward P. Walsh | Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA |
| USA-2 | Christopher J. McLeod | Mayo Clinic, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN |
| USA-3 | Robert H. Pass | Montefiore Children's Hospital, Albert Einstein University, Bronx, NY |
| USA-4 | Leonardo Liberman | Children's Hospital of New York, Columbia University, New York, NY |
| USA-5 | Anne Dubin | Lucile Packard Children's Hospital, Stanford University, Palo Alto, CA |
| USA-6 | George H. Van Hare | Children's Hospital, Washington University, St Louis, MO |
| USA-7 | Joël Temple | Nemours/Alfred Dupont Children's Hospital, Wilmington, DE |
| USA-8 | James Perry | Rady Children's Hospital, University of California, San Diego, CA |
| USA-9 | Christopher Johnsrude | University of Louisville School of Medicine, Louisville, KY |
| USA-10 | Robert Elder | Yale University School of Medicine, New Haven, CT |
| USA-11 | Maully Shah | Children's Hospital, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA |
| USA-12 | Christopher Erickson | Omaha, Nebraska |
| USA-13 | Marlon Rosenbaum | New York Presbyterian Hospital, Columbia University, New York, NY |
| USA-14 | Mary Niu | Children's Heart Center, Oklahoma University, Oklahoma City, OK |
| USA-15 | Shailendra Upadhyay | Connecticut |
| Canada | | |
| CAN-1 | Lynne E. Nield | Hospital for Sick Children, Toronto University, Toronto, Ontario |
| CAN-2 | Shubhayan Sanatani | British Columbia University Hospital, Vancouver, British Columbia |
| CAN-3 | Paul Khairy | Montreal Heart Institute, Montreal University, Montreal, Quebec |
| CAN-4 | Sylvia Abadir | Hôpital Sainte Justine, Montreal University, Montreal, Quebec |

Critères d'inclusion et de non-inclusion. L'unique critère d'inclusion dans l'étude DISCO était: tout patient porteur d'une discordance AV pris en charge entre 1970 et 2015. Ce vaste critère a permis de collecter toutes les malformations cardiaques congénitales complexes avec discordance atrio-ventriculaire, que la cardiopathie soit uni ou bi-ventriculaire, qu'il y ait ou non des malformations cardiaques ou extra-cardiaques associées, quel que soit l'âge au moment du diagnostic de la cardiopathie (diagnostic *in utero*, dans l'enfance ou patients congénitaux adultes), que le patient ait ou non des antécédents de chirurgie cardiaque, d'implantation d'une prothèse électrique cardiaque, d'arythmies ou de troubles de la conduction. Il n'y avait aucun critère de non-inclusion et le consentement du patient n'était pas nécessaire pour cette étude rétrospective uniquement basée sur l'analyse des données disponibles dans les dossiers médicaux (case of "consent waiver").

Recueil et transfert des données. Dans chaque centre participant le co-investigateur local était en charge de:

- a/ l'identification des patients éligibles à l'inclusion dans notre étude,
- b/ l'étude des dossiers médicaux et le recueil des données selon les items du cahier d'observation,
- c/ le recueil des tracés ECG 12-dérivations requis.

Le cahier d'observation a été rédigé avec une attention particulière concernant les données relatives aux caractéristiques de la cardiopathie (présentation clinique au diagnostic de la cardiopathie, description anatomique, description échographique), à l'histoire familiale (notion de consanguinité, antécédents de cardiopathie congénitale chez les apparentés au premier degré), aux troubles de la conduction cardiaque (analyses des différents ECG, présentation clinique au diagnostic du trouble conducteur; délai à l'implantation, indication et type de stimulation cardiaque le cas échéant; délai à l'implantation, indication et type de resynchronisation cardiaque le cas échéant), aux troubles du rythme (tachycardies atriales: symptomatologie, type et mode d'arythmie, prise en charge; voie accessoire et double nœud atrio-ventriculaire: symptomatologie, mapping, prise en charge; arythmies ventriculaires: symptomatologie, type d'arythmie, prise en charge), à la prise en charge et au suivi (intervention percutanée ou chirurgicale, complications liées à la cardiopathie, complications liées à la stimulation

cardiaque, décès ou statut au dernier suivi). Un exemplaire du cahier d'observation est présenté en Figure 5-4.

Le cahier d'observation et les différents tracés ECG étaient anonymisés, chaque patient recevant un code en fonction du code de son centre et de son rang dans le centre (Tableau 5-2). Par exemple, le douzième patient inclus à Stanford University était désigné comme: USA-5-12. Une fois complétées et anonymisées, les données (cahier d'observation en format .pdf et ECGs) étaient transmises par email au "fellow" responsable du centre. Une fois les 5 bases de données constituées et vérifiées (une par "fellow"), celles-ci me seront transmises par email pour être unifiées, vérifiées et gelées avant de débiter les analyses statistiques.

Classification anatomique. Pour permettre une analyse détaillée et reproductible du substrat anatomique de la cardiopathie complexe, nous avons choisi de décrire les données anatomiques selon les deux classifications internationales les plus utilisées et les plus récentes: l'International Paediatric and Congenital Cardiac Code (IPCCC) et l'Anatomic and Clinical Classification of Congenital Heart Disease (ACC-CHD) [Franklin *et al*, 2008; Houyel *et al*, 2011].

Analyses ECG. Pour chaque patient inclus dans l'étude, les tracés ECG 12-dérivations à six moments-clés de l'histoire clinique étaient recueillis:

- a/ ECG au diagnostic de la cardiopathie,
- b/ ECG pré-opératoire au moment de la première chirurgie extra-cardiaque le cas échéant,
- c/ ECG pré-opératoire au moment de la première chirurgie intra-cardiaque le cas échéant,
- d/ ECG au moment de l'implantation du premier stimulateur cardiaque le cas échéant,
- e/ ECG au moment de la resynchronisation cardiaque le cas échéant,
- f/ ECG lors de la consultation du dernier suivi.

Ces ECG étaient anonymisés, transmis par email puis chaque tracé était réinterprété « en aveugle » par trois médecins investigateurs de l'étude. Les ECG ont été systématiquement réinterprétés par trois médecins investigateurs (Dr. Solène Le Pennec, Dr. Emmanuelle Fournier et Dr. Mathieu Le Bloa) "en aveugle" concernant le

diagnostic du trouble conducteur du patient. Les mesures des différents paramètres ECG ont été comparées aux valeurs normales pour l'âge [Fleming *et al*, 2011; Rijnbeek *et al*, 2001]. Le diagnostic des troubles de conduction atrioventriculaire et/ou intraventriculaire et l'analyse de l'intervalle QT ont été réalisés selon les définitions usuelles et les critères recommandés par l'American Heart Association et l'Heart Rhythm Society [Surawicz *et al*, 2009; Rautaharju *et al*, 2009; Elizari *et al*, 2007; Mangrum *et al*, 2000]. Les mesures de la fréquence cardiaque, de l'intervalle PR (non réalisée en cas de BAV complet), de la durée du complexe QRS et de l'intervalle QT ont été réalisées et l'intervalle QT a été corrigé pour la fréquence cardiaque en utilisant la formule de Bazett. Tous les tracés ECG ont été analysés par deux médecins, et les mesures des différents intervalles ont ensuite été moyennées.

Analyses statistiques et calcul de l'héritabilité. J'ai sollicité un support logistique auprès du Pr Paul Kurlansky, Directeur du *Center for Innovations and Outcomes Research* de la Columbia University à New York. Les analyses statistiques seront confiées aux statisticiens de son équipe. A partir du recueil des antécédents familiaux, une estimation de l'héritabilité des troubles de conduction d'une part, et des anomalies de la latéralité d'autre part sera réalisée dans cette population de patients, selon des modalités de calcul statistique similaires à celles de nos précédents travaux [Baruteau *et al*, 2012].

Risques potentiels et bénéfices attendus. DISCO est une étude rétrospective multicentrique sur dossiers, sans contact avec les patients, donc ne comportant aucun risque individuel. En revanche étant donné la taille considérable de cette base de données sans équivalent dans le monde sur cette pathologie, ses bénéfices potentiels sont majeurs: a/ dans la description de l'histoire naturelle et non-naturelle des troubles du rythme et de la conduction associés aux inversions ventriculaires; b/ dans la description de l'histoire naturelle et non-naturelle du ventricule droit systémique à l'ère actuelle; c/ dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la genèse des troubles de conduction associés aux anomalies de la latéralité cardiaque.

III.4- Structure du réseau.

L'étude DISCO a été conçue autour d'un comité de pilotage, d'un comité scientifique et d'un comité d'experts. Le comité de pilotage a été constitué de neuf experts (6 nord-américains et 3 français) en rythmologie adulte ou en électrophysiologie congénitale. Chaque membre de ce comité de pilotage a corrigé et validé le protocole de l'étude et le cahier d'observation et donné son accord pour leur diffusion. Le but du comité de pilotage était d'aider à rendre ce projet crédible et de veiller à la rigueur scientifique du protocole. Un comité scientifique a ensuite été constitué par sept autres médecins (3 nord-américains, 1 australien, 3 européens) référents en cardiologie pédiatrique et/ou en électrophysiologie congénitale. Chaque membre du comité scientifique a également apporté des modifications au protocole ou au cahier d'observation de l'étude, et validé leur diffusion. Le comité scientifique avait pour but de conforter la solidité scientifique de l'étude et sa visibilité internationale. Enfin j'ai considéré un comité d'experts (3 américains), l'un en chirurgie cardiaque pédiatrique et congénitale, le second en électrophysiologie pédiatrique, le troisième en électrophysiologie congénitale adulte. L'objectif de ces trois experts est de nous conseiller dans les analyses statistiques, l'interprétation des résultats et la rédaction des articles qui seront issus de cette base de données.

Les centres représentés par ces trois comités constituaient un premier « noyau dur » de 17 institutions. Le réseau a ensuite été élargi en contactant:

a/ tous les services de cardiologie pédiatrique et congénitale français du réseau des centres de référence et de compétence des malformations cardiaques congénitales complexes (M3C);

b/ des médecins connus ou recommandés dans d'autres centres de cardiologie pédiatrique et/ou de rythmologie en France et à l'étranger;

c/ tous les médecins membres de la *Pediatric and Congenital Electrophysiology Society* (PACES) par la diffusion du protocole de l'étude via la mailing list de tous leurs adhérents;

d/ tous les groupes ayant publié un article scientifique sur la discordance atrio-ventriculaire au cours des quinze dernières années (recherche Pubmed, 2000 à 2015).

Parmi les 160 équipes contactées, nous avons pu fédérer autour de ce projet de recherche 64 centres de cardiologie pédiatrique et/ou d'électrophysiologie congénitale répartis sur 4 continents (Figure 5-3).

Parallèlement a été constitué un groupe de cinq « fellows », internes en cardiologie ou en pédiatrie, se destinant à l'exercice de la cardiologie pédiatrique: Solène Le Pennec (CHU de Rennes), Emmanuelle Fournier (CHU de Bordeaux), Mathieu Le Bloa (Clinique Pasteur à Toulouse), Clément Karsenty (CHU de Toulouse), Maxime Eloi (Hôpital Marie-Lannelongue, à Paris). Chacun de ces « fellows » a été responsable de 5 à 15 centres, leur rôle étant d'instaurer un climat de confiance et un contact étroit et régulier avec les co-investigateurs dont ils étaient en charge en France et/ou à l'étranger, et de coordonner le recueil des données dans leurs centres. Pour quatre d'entre eux ce projet constitue leur travail de master-2 ou de thèse de médecine.

Règles de publication. Il a été défini au préalable que chaque médecin co-investigateur sera co-auteur de l'article issu de ce travail. Pour respecter le volume respectif des centres participants, il a été convenu que:

a/ l'ordre d'apparition des auteurs est déterminé par le nombre de patients apportés à la série.

b/ le nombre d'auteurs par centre est défini ainsi: 1 auteur si le centre apporte 30 patients ou moins; 2 auteurs entre 30 et 60 patients; 3 auteurs si plus de 60 patients.

Figure 5-4: Exemple du cahier d'observation de l'étude DISCO

DISCO study

DISCO study
An International Cohort Study on DISCORDant Atrio-Ventricular Connection

Please complete this form carefully for each included patient

Email it with all required ECGs to the **corelab** at: alban.baruteau@etu.univ-nantes.fr

Version 5 – November 11, 2014

IDENTIFICATION

Center's code (see Annex 1)

Patient's code

Month and year of birth

Gender (male or female)

Order in the center

*For example, for Stanford University, center's code = USA5
Patients will be coded as USA5 – 01, USA5 – 02, USA5 – 03, etc...*

| | |
|----------|--|
| Page 1 | Title page - Identification |
| Page 2 | Characteristics of the cardiopathy |
| Page 4 | Looking for a familial recurrence |
| Page 5 | Cardiac conduction defects, stimulation and CRT |
| Page 6 | Arrhythmias |
| Page 7 | Management and Follow-up |
| Page 8-9 | ECGs analysis (each ECG has to be e-mailed to the corelab at: discostudy@gmail.com) |

1

|

Page 2. CHARACTERISTICS of the CARDIOPATHY

Clinical presentation

at diagnosis of the cardiopathy:

Prenatal diagnosis

yes / no
if yes, gestational age at diagnosis : weeks
fetal bradycardia yes / no
fetal hydrops yes / no
familial screening yes / no

Postnatal diagnosis

yes / no
if yes, Date of diagnosis: Age at diagnosis:
bradycardia yes / no
heart murmur yes / no
fatigue yes / no
syncope yes / no
dyspnea yes / no NYHA class: ...
heart failure yes / no
aborted sudden death yes / no
familial screening yes / no
other (please describe):

Anatomic data:

Based on the ACC-CHD classification (Houyel et al. Orphanet J rare Dis 2011;6:64)

| | | |
|--|---------------------------------------|--|
| Levocardia <input type="checkbox"/> | dextrocardia <input type="checkbox"/> | mesocardia <input type="checkbox"/> |
| atrial situs <input type="checkbox"/> | solitus <input type="checkbox"/> | inversus <input type="checkbox"/> ambigus <input type="checkbox"/> |
| bronchial situs <input type="checkbox"/> | solitus <input type="checkbox"/> | inversus <input type="checkbox"/> ambigus <input type="checkbox"/> |
| abdominal situs <input type="checkbox"/> | solitus <input type="checkbox"/> | inversus <input type="checkbox"/> ambigus <input type="checkbox"/> |

1. Heterotaxy, including isomerism and mirror-imagery yes / no
If yes, please describe:
2. Anomalies of the venous return (systemic or pulmonary) yes / no
If yes, please describe:
3. Anomalies of the atria and interatrial communications yes / no
If yes, please describe:
4. Anomalies of the AV junctions and valves yes / no
If yes, please describe:
5. Complex anomalies of AV connections yes / no
If yes, please describe:
6. Functionally univentricular heart yes / no
If yes, please describe:
7. Ventricular septal defects yes / no
If yes, please describe:
8. Anomalies of the ventriculo-arterial connections yes / no
If yes, please describe:
9. Anomalies of the extrapericardial arterial trunks yes / no
If yes, please describe:

DISCO study

Echocardiographic data at diagnosis of the cardiopathy:

Based on the 2014 AHA/ACC Guidelines (Nishimura RA et al. *Circulation* 2014;129:e521-643)

Systolic function of the subpulmonary ventricle: preserved altered (EF<50%) EF<35%
Subpulmonary AV valve insufficiency (grade): A B C D
Systolic function of the subaortic ventricle: preserved altered (EF<50%) EF<35%
Subaortic AV valve insufficiency (grade): A B C D
Aortic valve insufficiency (grade): A B C D

Associated cardiac malformations: yes / no
Ventricular septal defect yes / no If yes, localisation:
unrestrictiv VSD yes / no
multiple VSD yes / no
Pulmonary stenosis yes / no If yes, Vmax (m/s):
gradient (mmHg), max: ... /mean: ...
Other cardiac malformation yes / no
If yes, please describe:

Associated extra-cardiac malformations: yes / no
If yes, please describe:

Echocardiographic data at beginning of enrollement:

Based on the 2014 AHA/ACC Guidelines (Nishimura RA et al. *Circulation* 2014;129:e521-643)

Systolic function of the subpulmonary ventricle: preserved altered (EF<50%) EF<35%
Subpulmonary AV valve insufficiency (grade): A B C D
Systolic function of the subaortic ventricle: preserved altered (EF<50%) EF<35%
Subaortic AV valve insufficiency (grade): A B C D
Aortic valve insufficiency (grade): A B C D

Associated cardiac malformations: yes / no
Ventricular septal defect yes / no If yes, localisation:
unrestrictiv VSD yes / no
multiple VSD yes / no
Pulmonary stenosis yes / no If yes, Vmax (m/s):
gradient (mmHg), max: ... /mean: ...
Other cardiac malformation yes / no
If yes, please describe:

Associated extra-cardiac malformations: yes / no
If yes, please describe:

DISCO study

Page 4. LOOKING FOR A FAMILIAL RECURRENCE

Consanguinity in the parents yes / no / unknown

Siblings yes / no / unknown
if yes, how many:

Siblings with congenital heart defect yes / no / unknown
if yes, Twin-sib yes / no
 Transposition of great arteries yes / no
 CCTGA yes / no
 Other congenital heart defect yes / no
 If yes, please describe:

Children yes / no / unknown
if yes, how many:

Children with congenital heart defect yes / no / unknown
if yes, Twin-sib yes / no
 Transposition of great arteries yes / no
 CCTGA yes / no
 Other congenital heart defect yes / no
 If yes, please describe:

Other relatives with congenital heart defect yes / no / unknown
if yes, First-degree relative yes / no
 Transposition of great arteries yes / no
 CCTGA yes / no
 Other congenital heart defect yes / no
 If yes, please describe:

Page 5. CARDIAC CONDUCTION DEFECTS, STIMULATION and CRT

General considerations

ECGs are reported in details at the end of the form

- No heart block
- Sinus node dysfunction
- Native, non evolutive AV block (including 1st-degree AV block)
- Native, evolutive AV block
- Traumatic, catheterization-induced AV block
- Traumatic, post-operative AV block

Clinical presentation

at diagnosis of conduction defect:

Cardiac conduction defect led to the diagnosis of CCTGA? yes / no

Prenatal diagnosis yes / no

if yes, gestational age at diagnosis : weeks

fetal bradycardia yes / no

fetal anasarca yes / no

Postnatal diagnosis yes / no

if yes, Age at diagnosis:

bradycardia yes / no

heart murmur yes / no

asthenia yes / no

syncope yes / no

dyspnea yes / no

NYHA class:

heart failure yes / no

aborted sudden death yes / no

familial screening yes / no

other (please describe):

Cardiac stimulation:

Implantation of a permanent pacemaker yes / no

If yes, Date of the first pacemaker implantation:

Indication for pacemaker implantation:

Symptomatic bradycardia

Asthenia

Exercise-induced dyspnea

Syncope

Chest pain

Systolic ventricular dysfunction

Prophylactic implantation

Heart rate < 50 bpm in an infant < 12 months

Mean daytime heart rate < 50 bpm in children > 1 year of age

Ventricular pauses > 3 RR intervals

Prolonged corrected QT interval

Escape rhythm with wide QRS complex

Other (please describe):

Type of stimulation:

Epicardial leads / endocardial leads

Single chamber / dual chamber device

If epicardial stimulation first, date of endocardial leads implantation:

Cardiac resynchronization therapy:

Implantation of a CRT device yes / no

If yes, Date of the CRT device implantation:

Indication for pacemaker implantation:

NYHA class (I to IV):

Subaortic ventricle ejection fraction (%):

Subpulmonary ventricle ejection fraction (%):

QRS duration (ms):

Echo criteria (please describe):

Type of stimulation:

Epicardial leads / endocardial leads

DISCO study

Page 6. ARRHYTHMIAS

ECGs of each arrhythmia have to be transmitted to the Corelab by email: disco.internationalstudy@gmail.com

Atrial tachycardias

yes / no
if yes, age at diagnosis: ...

- Symptoms No symptom Palpitations
 Dyspnea or congestive heart failure
 Syncope, hypotension or circulatory collapse
- Type of arrhythmia Ectopic atrial tachycardia
 Intra-atrial reentrant tachycardia / Atrial flutter
 Atrial fibrillation
- Mode of arrhythmia paroxysmic permanent
- Management Electrical cardioversion
 Antiarrhythmic drug Vaughan Williams class:
 If serial drug therapy, describe:
 Recurrence: yes / no If yes, time to recurrence: ...
 Pacemaker for brady-tachy syndrome
 successful? yes / no
 for atrial antitachycardia pacing
 successful? yes / no
 Catheter ablation
 Age / weight at the procedure: yrs / kg
 Success yes / no
 Recurrence yes / no
 If yes, time to recurrence:
 Surgery with atrial Maze operation
 Age / weight at the procedure: yrs / kg
 Partial Maze Full Maze
 Success yes / no
 Recurrence yes / no
 If yes, time to recurrence:

**Accessory AV pathways
And Twin AV nodes**

yes / no
if yes, age at diagnosis: ...

- Symptoms Mapping yes / no If yes, describe:
- Right-sided AV pathway Left-sided AV pathway
 Septal AV pathway Lateral AV pathway
 Anterior AV pathway Posterior AV pathway
 Twin AV nodes and Mönckeberg sling
- Management Electrical cardioversion
 Antiarrhythmic drug Vaughan Williams class:
 If serial drug therapy, describe:
 Recurrence: yes / no If yes, time to recurrence: ...
 Catheter ablation
 Age / weight at the procedure: yrs / kg
 Success yes / no
 Recurrence yes / no
 If yes, time to recurrence:

Ventricular arrhythmias

yes / no
if yes, age at diagnosis: ...

- Symptoms No symptoms
 Dyspnea or congestive heart failure
 Syncope, hypotension or circulatory collapse
 Aborted sudden death Sudden death
- Type of arrhythmia Premature ventricular beats
 Nonsustained ventricular tachycardia
 Sustained ventricular tachycardia / ventricular fibrillation
- Management Electrical cardioversion
 Antiarrhythmic drug Vaughan Williams class:
 If serial drug therapy, describe:
 Recurrence: yes / no If yes, time to recurrence: ...
 Catheter ablation
 Age / weight at the procedure: yrs / kg
 Success yes / no
 Recurrence yes / no
 If yes, time to recurrence:
 Implantable cardioverter/defibrillator
 Primary / Secondary prevention
 Epicardial / Endocardial leads
 Subcutaneous ICD

Page 7. MANAGEMENT and FOLLOW-UP

Management of the CCTGA:

- Surgery or transcatheter intervention yes / no
If yes, pulmonary artery banding yes / no
Age at surgery:
Fontan circulation yes / no
Age at surgery:
VSD closure yes / no
Age at surgery:
Systemic AV valve repair yes / no
Age at surgery:
Systemic AV valve replacement yes / no
Age at surgery:
Double switch operation yes / no
Age at surgery:
Ventricular assist device yes / no
Type:
Age at implantation:
Heart transplantation yes / no
Age at surgery:
Other surgery (please describe): yes / no
Age at intervention:
Transcatheter intervention (please describe): yes / no
Age at intervention:

Follow-up status

- Dead yes / no
If yes, Age at death:
Cause of death Sudden death yes / no
Heart failure yes / no
Other (please describe):
If not, Age of the last visit:
Length of follow-up (years):
Clinical status
Asymptomatic
Congestive heart failure NYHA class:
Syncope
Aborted sudden death
Appropriate ICD therapies
Inappropriate ICD therapies
Other, please describe:

Complications

Pacemaker/defibrillator -related complications

- lead endocarditis yes / no
Lead rupture yes / no
Diaphragmatic stimulation yes / no
Cardiac tamponade yes / no
Device dislodgment yes / no
Dilated cardiomyopathy yes / no
Other (please describe):
Lead dysfunction yes / no
Pericardial effusion yes / no

CCTGA -related complications

- Subaortic ventricle EF <35% yes / no
If yes, measured by echography CT MRI
Age at subaortic ventricular dysfunction:
Subpulmonary ventricle EF < 35% yes / no
If yes, measured by echography CT MRI
Age at subpulm. ventricular dysfunction:
Aortic valve regurgitation > grade B yes / no
If yes, Age at diagnosis:
Subaortic AV valve regurgitation > grade B yes / no
If yes, Age at diagnosis:
Other (please describe):

DISCO study

Pages 8-9. ECGs ANALYSIS.

Please describe each ECG and e-mail them to the corelab at: disco.internationalstudy@gmail.com

ECG at diagnosis of the cardiopathy

Patient's age :
Heart rate (bpm) : Sinus rhythm yes / no
If no, please describe:

PR interval duration (ms): Corrected QT interval (ms) :

QRS complex duration (ms): QRS axis (°): Fragmented QRS complex yes / no
Sinus node dysfunction yes / no 1st-degree AV block yes / no
2nd degree AV block yes / no
If yes, Mobitz 1 vs Mobitz 2 vs 2/1, 3/1, ...
3rd degree AV block yes / no
Right bundle branch block yes / no If yes, Complete RBBB vs incomplete RBBB
Left bundle branch block yes / no If yes, Complete LBBB vs incomplete LBBB
Left anterior fascicular block
Left posterior fascicular block

Preoperative ECG at the time of extra-cardiac surgery

Patient's age :
Heart rate (bpm) : Sinus rhythm yes / no
If no, please describe:

PR interval duration (ms): Corrected QT interval (ms) :

QRS complex duration (ms): QRS axis (°): Fragmented QRS complex yes / no
Sinus node dysfunction yes / no 1st-degree AV block yes / no
2nd degree AV block yes / no
If yes, Mobitz 1 vs Mobitz 2 vs 2/1, 3/1, ...
3rd degree AV block yes / no
Right bundle branch block yes / no If yes, Complete RBBB vs incomplete RBBB
Left bundle branch block yes / no If yes, Complete LBBB vs incomplete LBBB
Left anterior fascicular block
Left posterior fascicular block

Preoperative ECG at the time of first open-heart surgery

Patient's age :
Heart rate (bpm) : Sinus rhythm yes / no
If no, please describe:

PR interval duration (ms): Corrected QT interval (ms) :

QRS complex duration (ms): QRS axis (°): Fragmented QRS complex yes / no
Sinus node dysfunction yes / no 1st-degree AV block yes / no
2nd degree AV block yes / no
If yes, Mobitz 1 vs Mobitz 2 vs 2/1, 3/1, ...
3rd degree AV block yes / no
Right bundle branch block yes / no If yes, Complete RBBB vs incomplete RBBB
Left bundle branch block yes / no If yes, Complete LBBB vs incomplete LBBB
Left anterior fascicular block
Left posterior fascicular block

DISCO study

ECG at the time of Pacemaker implantation

Patient's age :

Heart rate (bpm) : Sinus rhythm yes / no
If no, please describe:

PR interval duration (ms): Corrected QT interval (ms) :

QRS complex duration (ms): QRS axis (°): Fragmented QRS complex yes / no
Sinus node dysfunction yes / no 1st-degree AV block yes / no
2nd degree AV block yes / no
If yes, Mobitz 1 vs Mobitz 2 vs 2/1, 3/1, ...
3rd degree AV block yes / no
Right bundle branch block yes / no If yes, Complete RBBB vs incomplete RBBB
Left bundle branch block yes / no If yes, Complete LBBB vs incomplete LBBB
Left anterior fascicular block
Left posterior fascicular block

ECG at the time of Cardiac Resynchronization Therapy

Patient's age :

Heart rate (bpm) : Sinus rhythm yes / no
If no, please describe:

PR interval duration (ms): Corrected QT interval (ms) :

QRS complex duration (ms): QRS axis (°): Fragmented QRS complex yes / no
Sinus node dysfunction yes / no 1st-degree AV block yes / no
2nd degree AV block yes / no
If yes, Mobitz 1 vs Mobitz 2 vs 2/1, 3/1, ...
3rd degree AV block yes / no
Right bundle branch block yes / no If yes, Complete RBBB vs incomplete RBBB
Left bundle branch block yes / no If yes, Complete LBBB vs incomplete LBBB
Left anterior fascicular block
Left posterior fascicular block

ECG at Last Follow-up

Patient's age :

Heart rate (bpm) : Sinus rhythm yes / no
If no, please describe:

PR interval duration (ms): Corrected QT interval (ms) :

QRS complex duration (ms): QRS axis (°): Fragmented QRS complex yes / no
Sinus node dysfunction yes / no 1st-degree AV block yes / no
2nd degree AV block yes / no
If yes, Mobitz 1 vs Mobitz 2 vs 2/1, 3/1, ...
3rd degree AV block yes / no
Right bundle branch block yes / no If yes, Complete RBBB vs incomplete RBBB
Left bundle branch block yes / no If yes, Complete LBBB vs incomplete LBBB
Left anterior fascicular block
Left posterior fascicular block

III.5- Chronologie de l'étude et résultats préliminaires.

Chronologie de l'étude. L'étude DISCO a suivi le calendrier suivant:

| | |
|--------------------------|---|
| Janvier à juin 2014: | recherches bibliographiques rédaction du protocole et du cahier d'observation recherche de financements constitution des comités (de pilotage et scientifique) validation du protocole et du cahier d'observation |
| Juillet à octobre 2014 | contact des 160 potentiels centres participants, création du réseau constitution du groupe de "fellows" |
| Nov. 2014 à mars 2015 | recueil des consentements des IRB locaux identification des patients éligibles aux critères d'inclusion |
| Mars 2015 à février 2016 | recueil des données transfert des cahiers d'observation et des ECGs |
| Février à avril 2016 | Analyses des ECG par 3 cardiologues "en aveugle", unification, vérification et gel de la base de données |
| Mai à août 2016 | analyses statistiques rédaction d'abstracts et du premier article. |

Résultats préliminaires. Ce travail a permis de créer un réseau international de cliniciens chercheurs et de concentrer depuis 2 ans soixante-quatre institutions autour d'un même projet de recherche. Ainsi, grâce à ce travail collectif et multicentrique, près de 3000 patients porteurs d'une discordance AV devraient être inclus d'ici février 2016 d'après les prévisions de chaque centre, ce qui constitue de très loin la plus grande série jamais colligée sur cette pathologie. Plusieurs travaux scientifiques seront soumis dans les 2 années à venir à partir de l'exploitation de cette base de données sans équivalent, et devraient permettre de mieux comprendre la physiopathologie de cette cardiopathie, affirmer ou infirmer une potentielle hérédité et de mieux appréhender les caractéristiques des BAV et des troubles du rythme qui y sont associés, ainsi que le pronostic à long terme à l'ère thérapeutique actuelle.

IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les troubles de conduction associés à une anomalie de l'architecture cardiaque constituent une anomalie fréquemment observée dans certaines malformations cardiaques congénitales non opérées, parmi lesquelles les CIA, les CIV, les syndromes d'hétérotaxie et la double discordance. Une cause génétique est parfois identifiée, comme c'est le cas pour une mutation du gène *NKX2.5* classiquement évoquée devant l'association d'un BAV et d'une anomalie de la septation atriale [McElhinney *et al*, 2003]. Cependant dans la grande majorité des cas, l'étiologie de la malformation cardiaque et celle du trouble de conduction restent inconnus. Etant donné la faible prévalence de ces associations pathogènes et la grande diversité des phénotypes, ceux-ci sont peu étudiés et mal documentés.

Depuis la publication princeps en 1998 [Schott *et al*, 1998], des mutations du gène *NKX2.5* ont été rapportées chez 6 patients (5.3%) d'une population de 114 malades porteurs d'une tétralogie de Fallot sans microdélétion 22q11 [Goldmuntz *et al*, 2001] et chez 18 (3%) patients parmi 608 propositus porteurs de diverses malformations cardiaques congénitales, majoritairement représentées par 4% des tétralogies de Fallot, 4% des CIA ostium secundum et des cas isolés de tronc artériel commun, ventricule droit à double issue, L-transposition des gros vaisseaux, coarctation aortique, interruption de l'arche aortique, hypoplasie du cœur gauche [McElhinney *et al*, 2003]. En revanche des mutations *NKX2.5* n'étaient jamais observées dans les cas de D-transposition des gros vaisseaux (86 patients) ni de sténose aortique valvulaire (21 patients). A ce jour, de nombreuses mutations dans *NKX2.5* ont donc été répertoriées chez des patients atteints de troubles de conduction et/ou d'une cardiopathie congénitale, ce qui démontre le rôle majeur que joue ce gène dans la cardiogenèse, dans la spécification et dans le maintien du système de conduction cardiaque. La cosegrégation de mutations *NKX2.5* avec divers types de cardiopathies congénitales suggère que ce facteur de transcription est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation de la morphogénèse cardiaque. Le phénotype cardiaque associé aux troubles de conduction est variable, les principales cardiopathies congénitales observées étant une CIA ostium secundum (OMIM 108900), une CIV (OMIM 614432), une tétralogie de Fallot (OMIM 187500), des malformations conotruncales (OMIM 217095), une hypoplasie du cœur gauche (OMIM 614435), mais aussi plus rarement une anomalie d'Ebstein, une L-transposition des gros vaisseaux ou une interruption de l'arche aortique, toutes ces cardiopathies pouvant se présenter avec ou sans trouble de conduction associé [Ta-Shma *et al*, 2014; Costa *et al*, 2013; McElhinney *et al*, 2003]. Plus récemment le spectre phénotypique s'est élargi avec la publication de cas de non-compaction du ventricule gauche, de périodes de Luciani-Wenckebach, de fibrillation atriale et la survenue de morts subites [Guntheroth *et al*. 2012; Ouyang *et al*. 2011].

Dans la première partie de ce chapitre nous avons pu montrer, à partir d'une série nationale de 47 patients mutés *NKX2.5* que si le phénotype est classiquement dominé par des anomalies simples de la septation cardiaque (CIA ostium secundum dans 70% des cas, CIV dans 15% des cas) et des troubles de conduction (plus de 80% des cas), près d'un tiers de ces patients progressent vers un BAV de haut grade, et certains évoluent vers une cardiomyopathie dilatée (plus de 10%) ou font une mort subite. A ce stade, le recueil de données de cette étude est finalisé, les analyses statistiques et la rédaction de l'article est en cours. Nous essayerons d'apporter des éléments pour une corrélation genotype-phénotype des mutations *NKX2.5*.

Le second projet de recherche de ce chapitre porte sur les troubles de conduction associés aux cardiopathies avec discordance AV. Une étude multicentrique (64 institutions) a été initiée depuis 2 ans, afin de préciser les caractéristiques de ces BAV associés à une anomalie complexe de l'architecture cardiaque. En affectant la croix du coeur, cette malformation représente un "modèle" anatomopathologique et probablement développemental pour l'étude des troubles de conduction associés aux cardiopathies congénitales. Des anomalies des voies de conduction sont classiquement décrites dans la discordance AV [Shea et al, 1979; Van Praagh *et al*, 1998; Sharland *et al*, 2005] et il est aujourd'hui convenu que la survenue d'un BAV est due à l'allongement/étirement progressif des voies de conduction [Anderson et al, 2004; Smith *et al*, 2006].

Nous avons choisi de remettre en cause cette hypothèse – jusqu'à preuve du contraire – car: (a) celle-ci est issue de travaux réalisés sur des séries de petite taille et souvent anciennes de pièces anatomiques; et (b) elle n'explique pas pourquoi 20 à 30% des patients ayant une double discordance maintiendront une conduction AV normale tout au long de leur vie [Daliento *et al*, 1986]. Par ailleurs, bien que l'étiologie de la discordance AV soit inconnue [Wallis *et al*, 2011], des travaux récents, basés sur l'étude des apparentés des patients porteurs d'une discordance AV, suggèrent une composante héréditaire [Unolt *et al*, 2013]. Cette piste est relativement inattendue, dans la mesure où la double discordance semble être une cardiopathie sporadique, s'accompagne rarement de malformations extra-cardiaques et s'inscrit rarement dans un cadre syndromique. Cependant, l'association de cas de double discordance et de syndromes d'hétérotaxie ont été rapportés dans certaines familles [Marino *et al*, 2002; Thammineni *et al*, 2011]. Certains auteurs ont également rapporté la co-segrégation de cas de "transposition corrigée" et de "transposition complète" parmi les apparentés au premier degré de plusieurs noyaux familiaux, suggérant très fortement un processus physiopathologique commun entre ces deux malformations [Digilio *et al*, 2001; Oyen *et al*, 2010]. Des travaux récents ont montré que la "transposition corrigée" n'est pas toujours une malformation sporadique et qu'elle peut s'inscrire dans un cadre familial. En cas de "transposition corrigée" le risque de récurrence de cardiopathie congénitale dans la fratrie du propositus est compris entre 2.6 et 5.2%, et la cardiopathie

congénitale la plus fréquemment rencontrée chez les frères et soeurs du cas index est une “transposition complète” des gros vaisseaux [Piacentini *et al*, 2005; Peyvandi *et al*, 2014]. Sur le plan moléculaire, des mutations du gène *CRYPTIC* ont été rapportées à la fois dans des cas de syndrome d’hétérotaxie et dans des cas de “transposition complète” des gros vaisseaux [Gaiò *et al*, 1999; Martins *et al*, 2008]. Et plusieurs mutations dans différents gènes connus pour être impliqués dans le processus de latéralisation du développement embryonnaire (*GDF1*, *PROSIT240*, *CFC1*, *FOXH1*, *ZIC3*, *NODAL* et *NKX2.5*) ont été rapportées comme étant responsables d’une discordance ventriculo-artérielle [Goldmuntz *et al*, 2002; Muncke *et al*, 2003; Karkera *et al*, 2007; De Luca *et al*, 2010]. Bien que ne concernant qu’une minorité de patients ayant une transposition des gros vaisseaux, ces études apportent un éclairage nouveau pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la discordance ventriculo-artérielle. Elles démontrent que la transposition des gros vaisseaux n’est pas toujours sporadique. Certaines formes de “transposition corrigée” ou de “transposition complète” peuvent s’inscrire dans un cadre familial et être dues à des mutations dans des gènes de la latéralité, rejoignant le cadre nosologique des syndromes d’hétérotaxie. L’étude des pedigree de ces formes familiales montre que celles-ci ne répondent pas aux lois de Mendel et suggère un processus oligogénique ou un processus plus complexe associant possiblement plusieurs facteurs génétiques et environnementaux [De Luca *et al*, 2010; Keavney *et al*, 2010].

Le but de notre travail est d’estimer l’héritabilité du trouble de conduction dans la discordance AV, l’héritabilité de la discordance AV elle-même, et les caractéristiques des troubles de conduction qui s’y associent. Le recueil des données est en cours sur une population finale évaluée à 3000 patients. Nous espérons pouvoir ainsi mieux comprendre la physiopathologie de ces BAV malformatifs.

CHAPITRE 6: DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Appréhender les bases génétiques et moléculaires du BAV diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance, c'est tenter de mieux caractériser une cause rare d'une pathologie rare, puisque: (a) la prévalence du BAV congénital sur coeur sain est de 1 pour 20.000 naissances et celle du BAV de l'enfance est inconnue; et (b) les étiologies des BAV pédiatriques sont multiples et nettement dominées par les causes malformatives et immunologiques. A titre d'exemple une maladie dysimmunitaire maternelle rend compte de plus de 90% des BAV congénitaux [Chameides *et al*, 1977; Michaelsson *et al*, 1997]. Les formes génétiques des troubles conductifs de l'enfant ne sont donc pas un problème de santé publique. Cependant, identifier chez l'enfant les facteurs génétiques responsables d'une prédisposition aux troubles de conduction est fondamental dans la mesure où cette démarche permet une meilleure compréhension des voies moléculaires impliquées dans la physiopathologie de ces phénotypes ce qui devrait permettre à l'avenir de mieux stratifier le risque évolutif et développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Pour préciser la physiopathologie du BAV héréditaire diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance, nous avons mené plusieurs études abordant successivement:

- (a) le BAV isolé et non-immun;
- (b) le BAV rencontré dans les canalopathies sodiques;
- et (c) le BAV malformatif, associé à une cardiopathie congénitale.

BAV PÉDIATRIQUE ISOLÉ ET NON-IMMUN: VERS LA CARACTÉRISATION D'UNE PATHOLOGIE HÉRÉDITAIRE

A partir d'une étude multicentrique colligeant 141 propositus pédiatriques porteurs d'un BAV isolé et non-immun d'apparence sporadique, 130 parents et 130 sujets sains contrôles appariés, nous avons pu montrer une forte héritabilité de cette forme de trouble de conduction, nous conduisant à constituer une DNA-thèque sur ce phénotype d'intérêt et à initier des études de biologie moléculaire. Une première approche gène candidat a identifié des mutations au sein des gènes *GJA5*, *SCN5A*, *SCN1B*, *NKX2.5* et *TRPM4*. Une seconde approche, basée sur l'analyse de trios familiaux, a identifié 19 variants *de novo* et 2630 variants hétérozygotes composites dont la validation est en cours.

Jusqu'à présent cette forme rare de BAV congénital ou de l'enfance était considérée comme "idiopathique". Apporter des arguments pour une origine génétique est une surprise [Cannon *et al*, 2012]. La conséquence de ce résultat en pratique clinique est de proposer la réalisation d'une enquête familiale et d'un ECG 12-dérivations de dépistage aux apparentés au premier degré de tout nouveau-né ou enfant atteint d'un BAV sur coeur sain sans maladie dysimmunitaire

maternelle. Notre travail rappelle qu'un BAV héréditaire ne survient pas toujours dans un contexte familial et incite à envisager une cause génétique, même si le trouble conductif est d'allure sporadique et que l'histoire familiale n'est pas informative.

Cette forme de trouble de conduction pédiatrique – isolée, héréditaire et d'aggravation progressive – est-elle une maladie de Lev-Lenègre chez l'enfant ou une pathologie génétique distincte ?

Depuis la découverte du premier gène responsable de troubles de conduction à la fin des années 1990-début des années 2000 [Schott *et al*, 1999; Tan *et al*, 2001], de réels progrès ont été faits dans la compréhension des bases génétiques et moléculaires des troubles de conduction héréditaires. Bien qu'elle soit une pathologie fréquente chez le sujet âgé, résultant d'une dégénérescence fibroscléreuse du faisceau de His-Purkinje liée à l'âge, la maladie de Lev-Lenègre peut survenir chez des sujets plus jeunes (avant l'âge de 50 ans) et s'intégrer dans un cadre familial selon un mode de transmission héréditaire de type autosomique dominant [Piori *et al*, 2013; Probst *et al*, 2003]. Ces troubles de conduction héréditaires surviennent majoritairement chez l'adulte [Gourraud *et al*, 2012]. Cependant des nourrissons, enfants et adolescents atteints ont été parfois rapportés au sein de grandes familles de troubles conductifs associés à des mutations dans *SCN5A* [Schott *et al*, 1999; Kanter *et al*, 2012], *SCN1B* [Watanabe *et al*, 2008] et *TRPM4* [Kruse *et al*, 2009], démontrant qu'une cause génétique pouvait rendre compte de quelques cas pédiatriques de troubles de conduction sur coeur sain s'intégrant dans un cadre familial.

A ce jour, la maladie de Lev-Lenègre familiale est considérée comme une pathologie génétique mendélienne. L'étude des pedigree familiaux suggère classiquement un modèle monogénique avec une transmission héréditaire de type autosomique dominant [Gazes *et al*, 1965; Schott *et al*, 2011]. Des approches par analyse de liaison sont venues conforter ces données en mettant en évidence le gène responsable: *SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4*, dans les familles où ségrège le phénotype d'intérêt [Schott *et al*, 1999; Watanabe *et al*, 2008; Kruse *et al*, 2009]. Les résultats de notre travail (chapitre 3) viennent remettre en cause nos certitudes quant au type de modèle génétique à considérer dans les troubles de conduction héréditaires. Le dépistage ECG des parents d'enfants atteints d'un BAV sur coeur sain a montré que plus de 50% des parents présentaient une anomalie de la conduction infra-clinique et que l'héritabilité du trouble conductif était très élevée dans cette population, apportant des arguments cliniques forts pour une origine génétique. Mais dans l'état actuel des choses, l'interprétation de nos résultats est compliquée par 4 constatations:

1/ Les troubles de conduction dépistés chez les parents sont similaires à ceux observés dans la maladie de Lev-Lenègre familiale, consistant en des troubles de conduction volontiers étagés, principalement intra-ventriculaires;

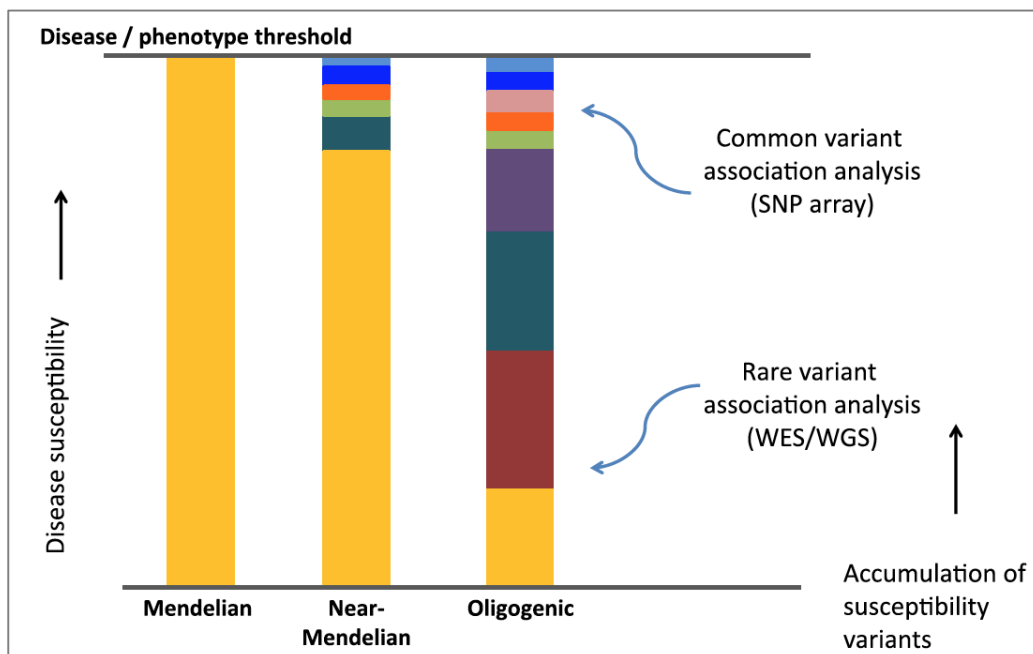
2/ Le phénotype ECG des enfants (les cas index) est fondamentalement différent, dominé par un BAV complet à complexe QRS fin. Seuls 12.1% des enfants de notre série présentaient des troubles de conduction intraventriculaire.

3/ Une histoire familiale de troubles de conduction était absente dans près de 9 cas sur 10.

4/ Une approche gène candidat (16 gènes) a été faiblement contributive, permettant de documenter des mutations dans *SCN5A*, *SCN1B*, *TRPM4*, *NKX2.5* et *GJA5* que chez un petit nombre de propositus (Figure 2-16).

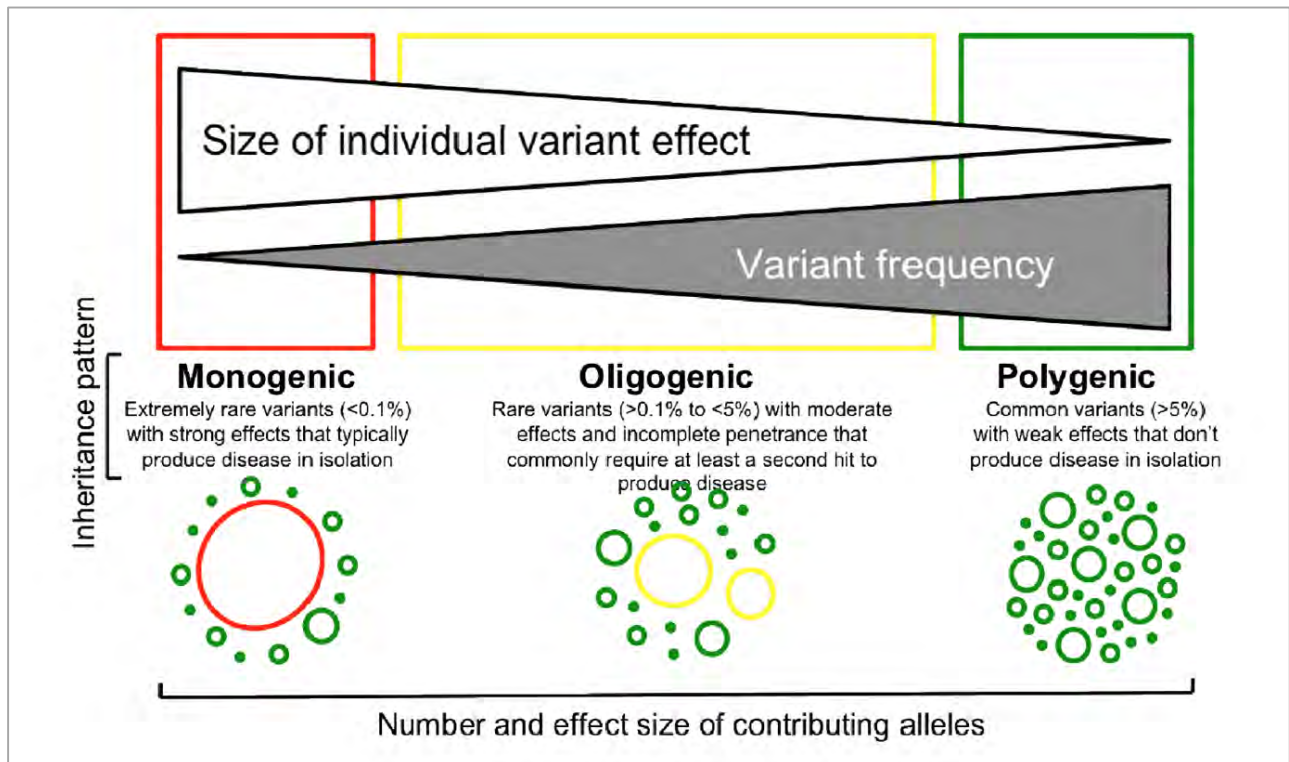
Ainsi, l'hypothèse que cette forme pédiatrique de BAV héréditaire soit une maladie mendélienne est peu probable et il semble qu'un substrat génétique plus complexe soit impliqué pour conduire au phénotype observé et à la différence de phénotypes constatée entre les parents et leurs enfants. A la différence d'une maladie mendélienne ou proche d'un modèle mendélien, dans lequel un gène unique fort a un effet fort en contribuant de façon significative à la prédisposition à la maladie, parfois partiellement modulé par des variants alléliques fréquents (polymorphismes), d'autres pathologies répondent à un modèle génétique plus complexe, oligogénique voire polygénique, où l'effet cumulé de plusieurs variants rares et fréquents éventuellement intriqués à des interactions avec des facteurs environnementaux conduit à l'expression du phénotype (Figure 6-1 et 6-2).

Figure 6-1: Continuum de complexité des bases génétiques des maladies électriques primitives



Adapté de [Bezzina *et al*, 2015]

Figure 6-2: Représentation des modèles génétiques soutendant une maladie complexe



Adapté de [Giudicessi *et al*, 2013]

Perspectives. Deux perspectives permettront certainement de faire progresser notre compréhension des bases génétiques et moléculaires impliquées dans la physiopathologie de cette forme de troubles de conduction du sujet jeune:

(a) d'une part les enquêtes familiales extensives. Réalisées à partir de quelques noyaux familiaux jugés particulièrement informatifs, ce travail de dépistage des apparentés au premier et au second degré des cas index est en cours. Il vise à identifier de grandes familles où ségrège le phénotype d'intérêt. Il permettra de préciser le mode de transmission par l'étude des pedigree familiaux et d'implémenter la biocollection par l'ADN de nouveaux apparentés atteints et sains.

(b) d'autre part la recherche de variants rares par l'analyse de trios familiaux. Réalisé par Xavier Daumy et Richard Redon à l'institut du thorax, ce travail a déjà permis d'identifier 19 variants *de novo* et 2630 variants hétérozygotes composites dont 66 ont déjà été validés dans 16 gènes. Ce travail devrait apporter des informations majeures pour une meilleure compréhension de la

complexité du substrat génétique impliqué dans l'apparition et/ou la modulation du trait phénotypique.

En effet une perspective considérable des différents travaux de cette thèse est la voie ouverte depuis quelques années par les études d'association pangénomique. Conduites parmi de grands échantillons de population générale, ces études ont pu mettre en évidence des associations robustes entre des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) et plusieurs traits phénotypiques: paramètres de conduction cardiaque (durée de l'intervalle PR, durée du complexe QRS) [Pfeufer *et al*, 2010; Sotoodehnia *et al*, 2010; Chambers *et al*, 2010; Holm *et al*, 2010], paramètres de repolarisation myocardique (durée de l'intervalle QT) [Arking *et al*, 2014], paramètres liés à l'architecture cardiaque et à la fonction systolique ventriculaire [Vasan *et al*, 2009; Arnett *et al*, 2011; Fox *et al*, 2013] (Figure 6-3). Bien qu'individuellement ces variants aient probablement un effet modeste, ils sont des candidats de premier plan pour expliquer la variabilité des phénotypes observés dans les maladies rares. Les variants ayant une fréquence rare ont probablement un effet plus important, mais leur faible prévalence les rend plus difficiles à étudier. Intégrer ces nouvelles données dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition (modèle oligo/polygénique) ou la modulation (modèle monogénique) des troubles conductifs isolés (Chapitres 3) au malformatifs (Chapitre 5) de l'enfant représente probablement un des défis majeurs des années futures.

Tableau 6-3: Loci identifiés par les études d'association pangénomique comme modulateurs des paramètres électrocardiographiques dans la population générale.

| Loci identified in GWAS on ECG parameters | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Heart rate | | PR interval | | QRS interval | | QT interval | |
| New loci | Known loci | New loci | Known loci | New loci | Known loci | New loci | Known loci |
| CD34 rs2745967 CD46, CD34, PLXNA2 rs12731740 CTSS rs11576175 LOC644502 rs12110681 EPHB4, SLC12A9, SRRT, UFSPI, ACHE rs13245899 FADS1 rs174549 GPR133 rs885389 SOXS, BCATI rs17287293 KIAA1755 rs6127471 CCDC141 rs17362508 SYT10 rs7980799 GNB4 rs7612445 FLRT2 rs17796783 CHRM2 rs12350782 GNIG1 rs1800242 B3GNT7 rs13030174 FNDC3B rs9447379 RFKA rs2067615 CPNE8 rs876838 TFPI rs4140885 | NKX2.5 rs6882776 GJA1 (rs11154022, rs1015451) PLN rs11153730 MYH7 rs223116 MYH6 rs365990 HCN4 rs4480068 | MEIS1 rs10865355 + ARHGAP24 rs7660702 WNT11 rs4944092 SOXS, BCATI rs11047543 | SCN5A, SCN10A (rs3922844*, rs11708996, rs8599222*, rs6801957 + NKX2.5 rs151253 CAV1, CAV2 rs3807989 TBX3, TBX5 rs1866112, rs3825214, rs7312625* | C1orf185, RNF11, CDKN2c, FAF1 rs17301905 NFIA rs9438640 CRIMI rs7562790 HEATR5B, STRN rs17020136 LRIG, SLC25A26 rs2242285 HAND1, SAP30L rs13165478 PI16, CDKN1A rs1321311 IGFBP3 rs7784776 VTG1A rs1734724 VTG1A rs1734728 KLF12 rs1885512 SIPA1L1 rs11848785 GOSR2 rs17608766 SETBP1 rs991014 | CASQ2 rs4074536 CACNA1D rs4687718 SCN5A, SCN10A (rs6801957, rs2051211, rs10865879, rs11710077, rs11708996, rs3851724 TBX20 rs1362212 TBX3, TBX5 rs885079*, rs10850409, rs3825214 PLN rs11153730 PRKCA rs912468 | NOS1AP rs6689543, rs4656345, rs12143842, rs14857031, rs17457880, rs4657372, rs3034467, rs7545047, rs17460657, rs347272, rs164133 RNF207 rs446111, rs2274042 CNOT1 rs246196, rs4784934 LITAF rs735951, rs12930096, rs12444261 LIG3 rs1052536 TCEA3 rs2298632 SP3 rs938291 SPATS2L rs295140 C3ORF75 rs17784882 SLC4A4 rs2363719 SMARCA4 rs3857057 GFRA3 rs10040988 GMPR rs7765828 NCOA2 rs16936870 LAPTM4B rs11179840 AZINI rs1961102 GBF1 rs2485376 FEN1, FADS2 rs174583 KLF12 rs728026 ANKRD9 rs1273905 USP50, TRPM7 rs3105593 MKL2 rs246185 TTN, CCDC141 rs7561149 SUCLA2 rs2478333 | SCN5A, SCN10A rs8799245, rs11708996, rs11710077, rs6999234 rs6801957 PLN, SLC35F1 rs457162, rs12210793 rs11153730, rs3902035 rs9489510 KCNH2 rs2072413, rs3807375 KCNQ1 rs12301696, rs2074238, rs7122937 KCNJ2 rs236588 rs10775360, rs1396515 rs17763769 KCNE1 rs1805128 ATP1B1 rs545833, rs12061601, rs10919070, rs12079745, rs13983846 CAVI rs9920 ATP2A2 rs3026445 PRKCA rs892651 SRL rs1296720 SCL8A1 rs6544311, rs12997023 |

Adapté de [Bezzina *et al*, 2015]

En résumé, la documentation d'une forte héritabilité dans le BAV isolé non-immun diagnostiqué *in utero* ou au cours de l'enfance est une avancée clinique intéressante qui a ouvert la voie et encourage à poursuivre les travaux de génétique moléculaire; de nombreuses questions concernant les bases moléculaires et le modèle génétique de cette forme rare de troubles de conduction restent à éclaircir dans le cadre de travaux futurs.

TROUBLES DE CONDUCTION ET CANALOPATHIES SODIQUES CHEZ L'ENFANT: IMPACT PRONOSTIQUE, RELATION GENOTYPE-PHENOTYPE ET PERSPECTIVES

Un second projet multicentrique international (25 institutions) nous a permis d'étudier les relations génotype-phénotype chez 423 enfants porteurs d'une mutation *SCN5A*.

Le taux d'évènement rythmique était élevé, en particulier chez les enfants présentant un BrS spontané, un LQTS, des troubles de conduction ou un syndrome de chevauchement, mais aussi chez ceux qui avaient un phénotype ECG négatif. Le phénotype variait selon la nature de la mutation, une mutation faux-sens étant plus fréquemment observée en cas de LQT3 isolé, de troubles de conduction isolés et de phénotype négatif. Un arrêt cardiaque inaugural, une syncope inaugurale et la survenue de chocs appropriés étaient plus fréquents en cas de mutation localisée dans la région transmembranaire de Nav1.5. Une double mutation *SCN5A*, une seconde mutation dans un autre gène, une dysfonction sinusale, un âge au diagnostic ≤ 1 an et l'absence d'antécédents familiaux de canalopathie sodique ou d'évènement rythmique étaient des facteurs de risque indépendants d'évènement cardiovasculaire majeur, identifiant des sous-groupes de patients à haut risque rythmique.

Perspectives. Ce travail ouvre plusieurs perspectives, en particulier:

(a) une étude plus spécifique de l'analyse du risque rythmique et de l'efficacité thérapeutique chez les patients de cette série présentant un trouble de conduction (n=171), un LQT3 (n=158) ou un BrS type 1 (n=61) puisque, comparé à la littérature médicale, il s'agit à chaque fois de la plus grande cohorte mondiale d'enfants mutés *SCN5A* présentant ce phénotype; au-delà des corrélations entre génotype et phénotype ECG, et entre génotype et risque d'évènement rythmique, il sera intéressant d'étudier la relation entre génotype et réponse au traitement car il est probable que parmi les 436 mutations identifiées (dont 184 mutations différentes), l'efficacité thérapeutique ne soit pas uniforme mais mutation-spécifique. Si cette hypothèse se confirme, ce travail pourrait déboucher sur une amélioration des protocoles thérapeutiques basée sur la description du génotype.

(b) une collaboration scientifique initiée avec l'équipe du Pr. Peter Ruben, Simon Fraser University à Vancouver, Canada, sur la réponse différentielle des canaux sodiques mutés aux variations de température et de calcium intracellulaire; l'hypothèse de travail est que cette réponse différentielle – et donc le risque de survenue d'arythmie ventriculaire à l'effort – soit due à un effet propre à chaque mutation, lié à la localisation de la mutation au sein du gène *SCN5A*. Dans cette optique, afin de corréliser leur approche fondamentale avec des données cliniques, les génotypes et les ECG des tests d'effort (243 tracés) de 81 enfants mutés *SCN5A* lui ont été transmis;

(c) la poursuite du travail en réseau avec les 25 centres participant à cette étude depuis 18 mois, et la conversion de la base de données que nous avons constitué sous la forme d'un registre, avec implémentation annuelle des modalités thérapeutiques et des données de suivi, afin d'être en mesure d'évaluer dans quelques années le devenir à l'âge adulte de ces 423 enfants porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*.

BAV MALFORMATIF DE L'ENFANT: UNE CAUSE "CLASSIQUE" MAIS MAL DOCUMENTÉE

Les BAV natifs associés aux malformations cardiaques congénitales sont une cause "classique" de troubles de conduction en pédiatrie. Une cause génétique peut être identifiée, comme une mutation du gène *NKX2.5* dont le phénotype cardiovasculaire est riche et associe troubles de conduction et cardiopathie congénitale. Cependant dans la majorité des cas, l'étiologie du trouble de conduction et celle de la malformation cardiaque restent inconnus et compte-tenu de la faible prévalence et de la grande hétérogénéité de ce phénotype, celui-ci est peu étudié et mal documenté.

Deux axes de travail nous ont permis d'avancer dans la compréhension des bases génétiques de ces BAV:

(a) A partir d'une première étude multicentrique nationale colligeant 47 patients ayant une mutation *NKX2.5*, nous avons pu montrer que si le phénotype est classiquement dominé par des anomalies simples de la septation cardiaque (CIA ostium secundum dans 70% des cas, CIV dans 15% des cas) et des troubles de conduction (plus de 80% des cas), près d'un tiers de ces patients évoluent vers un BAV de haut grade, et certains suivis sont marqués par la survenue d'une cardiomyopathie dilatée (plus de 10%) ou une mort subite. Le recueil de données de cette étude est finalisé, les analyses statistiques et la rédaction de l'article sont en cours.

(b) Un projet de recherche multicentrique de grande ampleur (64 institutions à travers le monde) a été initié au cours de cette thèse, afin de préciser les caractéristiques des BAV associés aux cardiopathies avec discordance atrioventriculaire. En affectant la croix du coeur, cette malformation complexe représente un “modèle” anatomopathologique et probablement développemental pour l'étude des troubles de conduction associés aux cardiopathies congénitales. L'héritabilité du BAV dans la discordance atrioventriculaire n'est pas connue et constitue notre hypothèse de travail, dans la mesure où quelques noyaux familiaux d'apparentés atteints de discordance atrioventriculaire ont été publiés; une plus forte prévalence dans la descendance que dans la fratrie des cas index, et des taux de prévalence relativement stables dans le temps et dans des populations différentes suggèrent par ailleurs fortement que les facteurs génétiques jouent un rôle important dans l'apparition de cette malformation.

Le recueil des données est en cours. Basée sur les estimations des différents centres, plus de 3000 malades devraient être inclus dans ce travail qui constituera une base de données sans précédent sur cette pathologie.

Perspectives. A partir des données colligées dans l'étude DISCO (64 centres, estimation: 3000 malades), plusieurs perspectives se dessinent:

(a) nous espérons pouvoir mieux caractériser l'histoire naturelle de ces BAV, estimer l'héritabilité de la discordance AV et de ces troubles de conduction par l'étude des antécédents familiaux et mieux comprendre la physiopathologie et les caractéristiques de cette forme de BAV malformatif.

(b) Si les résultats de cette approche clinique apportent des éléments forts pour renforcer l'hypothèse d'une origine génétique, nous débuterons alors une seconde étude avec une trentaine de centres sélectionnés en Europe et aux Etats-Unis (dans le cadre d'une collaboration transatlantique), pour constituer une DNA-thèque sur ce phénotype d'intérêt et ouvrir la voie aux travaux de génétique moléculaire. Se poseront alors de nouvelles questions, et en particulier celle du mode de transmission simultané d'une cardiopathie, d'une éventuelle anomalie de la latéralité, et d'un trouble de conduction...

(c) décrire les caractéristiques des troubles du rythme supra-ventriculaire et ventriculaire natifs et post-opératoires, associés à la discordance atrio-ventriculaire.

(d) décrire le devenir à long terme, les facteurs pronostics et l'efficacité des stratégies chirurgicales du ventricule droit systémique à l'ère thérapeutique actuelle.

EN CONCLUSION,

Volontairement axée sur le versant clinique d'une approche génétique intégrée, cette thèse s'est faite en collaboration étroite avec l'équipe de génétique de l'institut du thorax et a ouvert la voie à plusieurs travaux de biologie moléculaire. Elle a permis de créer et développer plusieurs réseaux de recherche en France et à l'étranger et de constituer de grandes bases de données sur quelques phénotypes d'intérêt. Notre travail a permis de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le BAV isolé et non-immun en pédiatrie, dans la compréhension des relations génotype-phénotype chez les enfants porteurs d'une mutation du gène *SCN5A*, et de préciser le spectre phénotypique des anomalies cardiovasculaires associées aux mutations du gène *NKX2.5*. Il a également permis d'initier une collaboration nouvelle avec l'équipe de Vancouver ainsi qu'un vaste projet de recherche international sur les troubles de conduction associés aux cardiopathies complexes avec discordance atrioventriculaire.

Si quelques éléments de réponse ont pu être apportés sur ces maladies rares, de nombreuses zones d'ombres persistent et nos résultats ont suscité de nouvelles interrogations qui appellent à poursuivre cette thématique de recherche par des travaux ultérieurs, afin d'aller plus avant dans la compréhension des bases génétiques et moléculaires du bloc atrioventriculaire diagnostiqué *in utero* et au cours de l'enfance.

ANNEXES

ANNEXE #1.

DESCRIPTION DES CARDIOPATHIES CONGÉNITALES

Analyse segmentaire. L'analyse segmentaire (ou segmentaire séquentielle) des malformations cardiaques congénitales est basée sur une description en trois segments ou blocs anatomiques communs à tous les spécimens cardiaques, qu'ils soient normaux ou malformés [Van Praagh et al, 1972; Anderson et al, 1984; Anderson et al, 2009b]. Ces trois segments sont le situs viscero-atrial (segment atrial), la loop ou boucle ventriculaire (segment ventriculaire ou situs ventriculaire) et le conotruncus (segment artériel ou situs artériel). La représentation schématique de l'analyse segmentaire est décrite dans la Figure 7-1. Chaque segment est défini par ses caractéristiques anatomiques propres, indépendamment de ses rapports avec les autres variables. La description de ces trois segments principaux peut être exprimée sous la forme d'un cardiotype, c'est-à-dire un ensemble de trois lettres résumant la séquence des trois segments cardiaques dans le sens veno-artériel (sens du flux sanguin). S'y associent deux segments dits de connexion: les valves atrioventriculaires correspondant à la connexion atrioventriculaire et le conus arteriosus ou infundibulum correspondant à la connexion ventriculo-artérielle.

Cardiotypes. Le situs viscero-atrial peut être de trois types: solitus {S,-,-}, inversus {I,-,-} ou ambiguus {A,-,-}. L'oreillette droite est définie par l'abouchement du segment supra-hépatique de la veine cave inférieure, par l'orifice du sinus coronaire et par la morphologie droite de l'auricule qui est triangulaire, à base d'implantation large, avec la pointe dirigée vers le bas et des muscles pectinés débordant dans l'oreillette. A contrario l'auricule gauche est en doigt de gant, à base d'implantation étroite, avec la pointe dirigée vers le haut et des muscles pectinés confinés dans l'auricule.

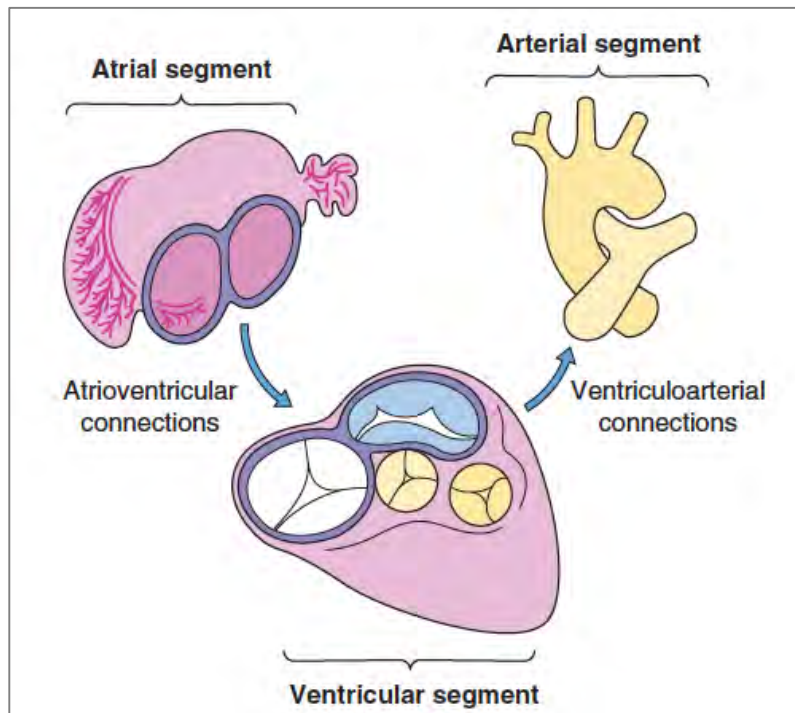
Le situs ventriculaire quant à lui peut être: solitus ou en D-loop {-,D,-}, le ventricule droit étant alors "à main droite", ou alors inversus c'est-à-dire en L-loop {-,L,-}, le ventricule droit étant "à main gauche" et le ventricule gauche "à main droite" (Figure 7-2). Sur le plan anatomique, le ventricule droit est trabéculé et peut être défini soit par sa valve atrio-ventriculaire qui est tricuspide avec des attaches septales, soit par l'existence d'une bande modératrice, d'une bande septale et d'une bande pariétale. A *contrario*, le ventricule gauche présente une surface septale lisse et accueille le(s) pilier(s) d'une valve atrio-ventriculaire mitrale ayant classiquement deux feuillets (antérieur et mural) et deux piliers (antéro-externe et postéro-interne).

Le situs artériel quant-à-lui peut être de cinq types. Lorsque les vaisseaux sont normoposés, le situs artériel est soit solitus {-,-,S}, si les gros vaisseaux sont en relation normale l'un par rapport à l'autre, c'est-à-dire que l'anneau aortique est en arrière et à droite de l'anneau pulmonaire; soit inversus {-,-,I} si l'anneau aortique est en arrière et à gauche de l'anneau pulmonaire. En cas de transposition ou de malposition des gros vaisseaux, on décrit la dextro-malposition {-,-,D} ou la levo-malposition {-,-,L} selon que l'anneau aortique est situé respectivement à droite ou à gauche de l'anneau pulmonaire, et la A-malposition {-,-,A}, lorsque l'anneau aortique est positionné en avant de l'anneau pulmonaire, les deux gros vaisseaux étant situés dans un plan strictement antéro-postérieur.

Connexions et alignements. Les segments de connexion (jonction atrio-ventriculaire et conus) sont les segments qui connectent les trois principaux segments cardiaques de multiples façons. Il s'agit d'une définition anatomique (Figure 7-3). Là encore, chaque segment se définit par ses caractéristiques anatomiques propres et non par ses rapports avec les autres variables. Ainsi la valve atrio-ventriculaire dans laquelle s'ouvre une oreillette droite n'est pas forcément la valve tricuspide, et il faudra s'attacher à reconnaître les caractéristiques propres d'une valve tricuspide pour la définir comme telle.

La jonction atrio-ventriculaire concerne la croix du coeur, c'est-à-dire les valves atrio-ventriculaires tricuspide et mitrale, la partie basse du septum interatrial (ostium primum) et la partie haute du septum interventriculaire. Le conus est l'infundibulum. Il peut être de quatre types: conus sous-pulmonaire (normal), conus sous-aortique, conus bilatéral et absence de conus.

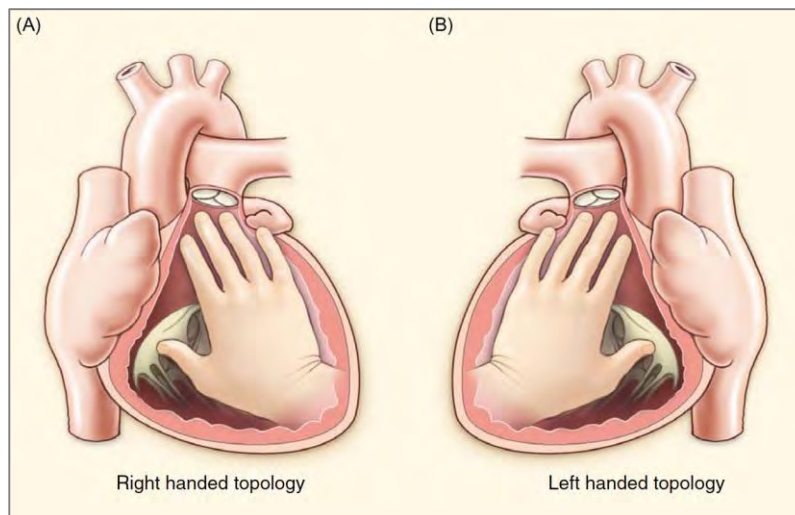
Figure 7-1: Principes de l'analyse segmentaire



Représentation schématique des trois segments principaux et des deux segments de connexion.

[Adapté de Ho SY. Cardiac morphology and nomenclature. 2011]

Figure 7-2: Topologie ventriculaire



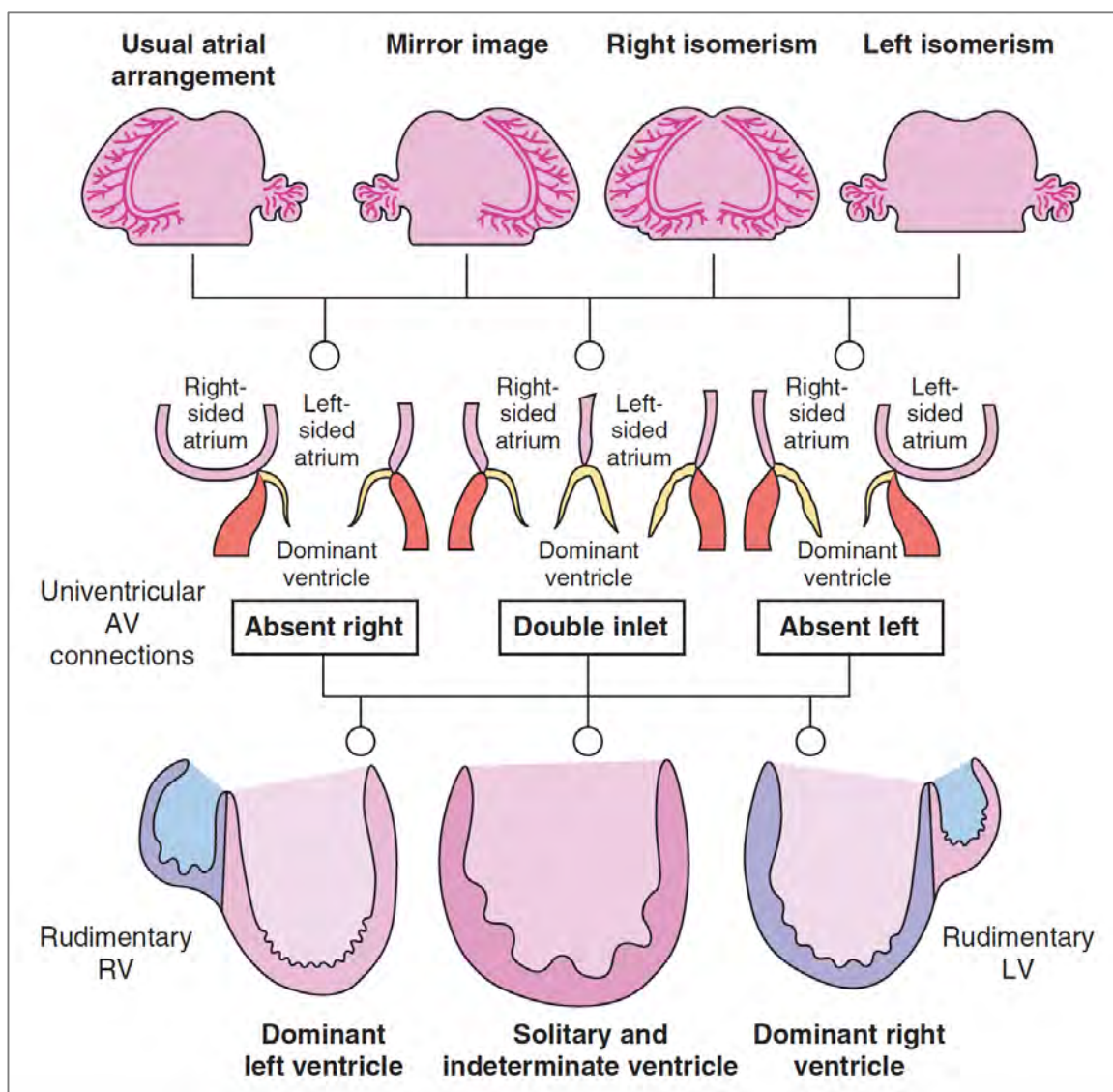
La topologie ventriculaire décrit la relation spatiale d'un ventricule par rapport à l'autre. Elle est déterminée en plaçant la paume de la main sur la face septale du ventricule de morphologie droite, de telle sorte que le poignet soit à l'apex, le pouce dans la chambre d'admission et les doigts dans la voie d'éjection. On définit alors une topologie "à main droite" (A) ou "à main gauche" (B) du ventricule morphologiquement droit, correspondant respectivement à un segment ventriculaire en D-loop (normal) ou en L-loop.

[Adapté de Anderson et al, 2011]

La notion d'alignement (concordant ou discordant) des trois principaux segments cardiaques est en revanche une définition davantage fonctionnelle qu'anatomique (Figure 7-4). Ainsi l'alignement atrioventriculaire est dit concordant si l'oreillette de morphologie droite est connectée au ventricule de morphologie droite et si l'oreillette de morphologie gauche est connectée au ventricule de morphologie gauche. L'alignement atrioventriculaire est discordant lorsque l'oreillette de morphologie droite est connectée au ventricule de morphologie gauche et que l'oreillette de morphologie gauche est connectée au ventricule de morphologie droite. De la même manière l'alignement ventriculo-artériel est défini comme concordant si le ventricule de morphologie droite est connecté au tronc artériel pulmonaire et si le ventricule de morphologie gauche est connecté à l'aorte thoracique ascendante. En revanche l'alignement ventriculo-artériel est décrit comme discordant si le ventricule morphologiquement droit est connecté à l'aorte et si le ventricule de morphologie gauche est connecté au tronc pulmonaire, ainsi que dans les ventricules droits à double issue et les ventricules gauches à double issue.

Les différents cardiotypes, connexions et alignements sont présentés dans la Figure 7-5. Enfin d'une façon générale, et en particulier en présence d'anomalies de la latéralité, il convient de préciser la position du cœur dans le thorax (dextrocardie, mesocardie, levocardie) et les situs viscéraux broncho-pulmonaire et abdominal (solitus, inversus, ambiguus). Lorsque le cardiotype est donné sans autre précision, on assume alors que les autres données non exprimées par le cardiotype sont normales.

Figure 7-3: Connexions atrioventriculaires dans les cardiopathies univentriculaires.

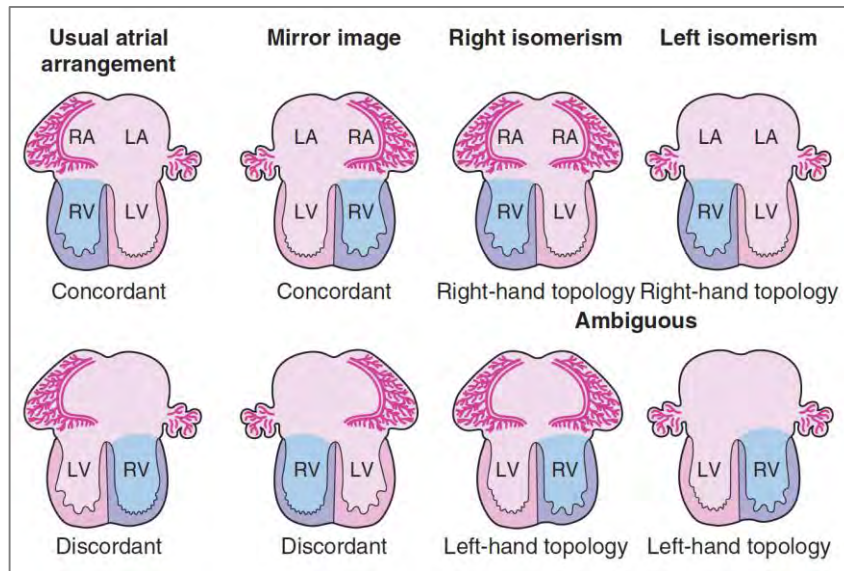


Les segments de connexion (jonction atrio-ventriculaire et conus) sont les segments qui connectent les trois principaux segments cardiaques de multiples façons. Il s'agit d'une définition anatomique. Ici sont représentés les combinaisons possibles entre segments viscéro-atrial et ventriculaire en cas de cardiopathie univentriculaire.

Usual atrial arrangement signifie situs viscéro-atrial solitus; mirror-imaged arrangement: situs viscéra-atrial inversus; right or left isomerism: situs viscéro-atrial ambiguus, syndrome d'hétérotaxie avec isomérisme droit ou gauche.

[Adapté de Ho et al, 2011]

Figure 7-4: Alignements des principaux segments cardiaques



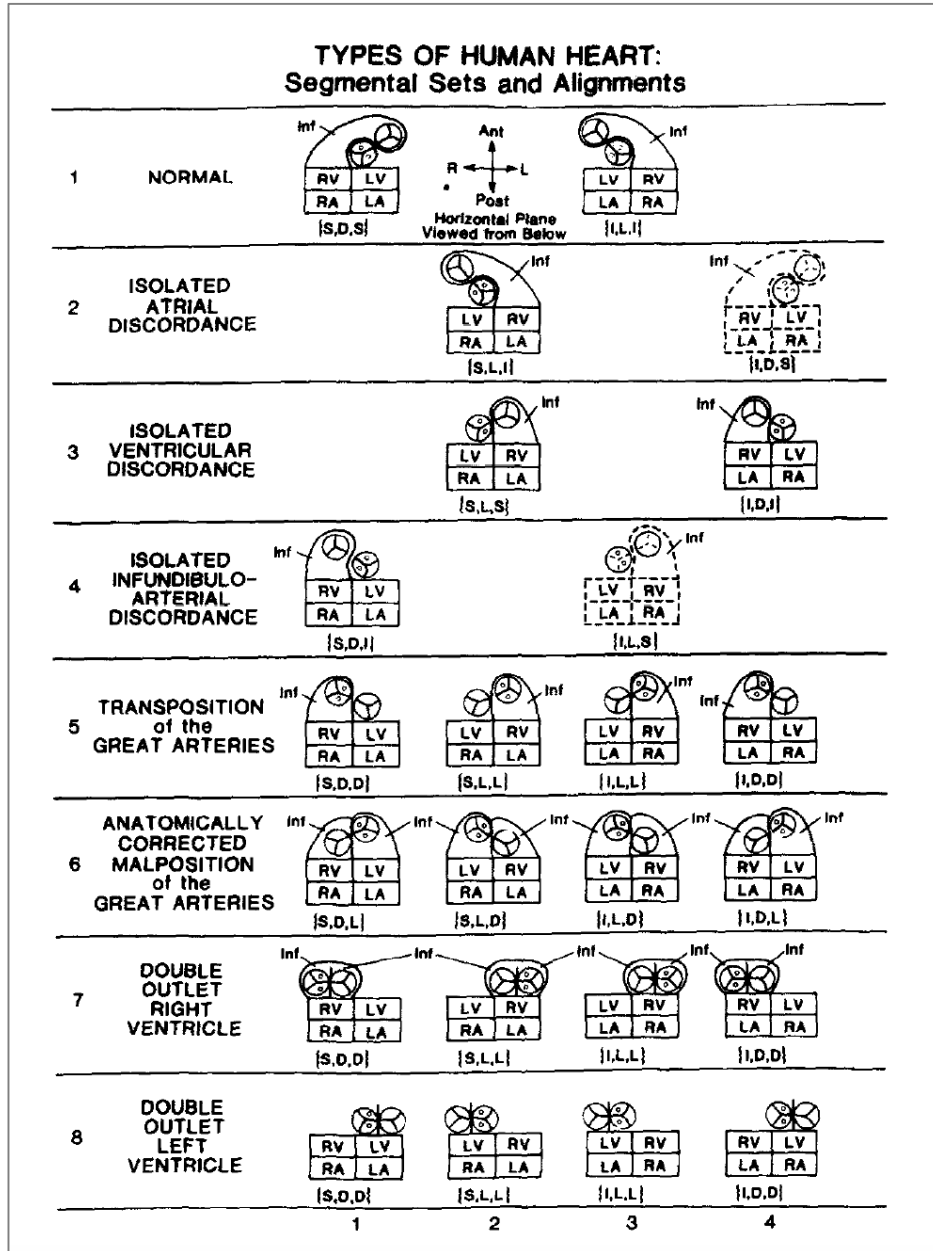
La notion d'alignement (concordant ou discordant) des trois principaux segments cardiaques est une définition fonctionnelle. L'alignement atrioventriculaire est dit concordant si l'oreillette de morphologie droite est connectée au ventricule de morphologie droite et si l'oreillette de morphologie gauche est connectée au ventricule de morphologie gauche. L'alignement atrioventriculaire est discordant lorsque l'oreillette de morphologie droite est connectée au ventricule de morphologie gauche et que l'oreillette de morphologie gauche est connectée au ventricule de morphologie droite.

Usual atrial arrangement signifie situs viscero-atrial solitus; mirror image: situs viscero-atrial inversus.

[Adapté de Ho et al, 2011]

C'est le cas par exemple des alignements. Par exemple {S,D,S} décrit un coeur normal. En l'absence d'autre précision, cela signifie que le coeur est en levocardie, le situs viscero-atrial est solitus, le segment ventriculaire en D-loop, le situs artériel solitus en présence de vaisseaux normoposés, les alignements atrioventriculaire et ventriculo-artériel concordants, le conus sous-pulmonaire avec une continuité directe mitro-aortique. En revanche "{S,D,S} avec straddling tricuspide et ventricule gauche à double entrée", signifie que les situs visceroatrial et ventriculaire sont solitus, mais que l'alignement atrioventriculaire est discordant puisque l'oreillette de morphologie droite s'ouvre dans le ventricule de morphologie gauche.

Figure 7-5: Les différents cardiotypes, connexions et alignements



Ant.: antérieur; post: postérieur; R: droit; L: gauche; RA: oreillette morphologiquement droite; LA: oreillette morphologiquement gauche; RV: ventricule morphologiquement droit; LV: ventricule morphologiquement gauche; inf: infundibulum.

[Adapté de Foran et al, 1988]

ANNEXE #2

DOCUMENTS SUPPLÉMENTAIRES CONCERNANT L'ÉTUDE DISCO

Avis de l'Institutional Review Board de Stanford University, CA, USA

STANFORD UNIVERSITY

Stanford, CA 94305 [Mail Code 5579]

David D Oakes, M.D. (650) 724-6695
CHAIR, PANEL ON MEDICAL HUMAN SUBJECTS (650) 725-8013

Certification of Human Subjects Approvals

Date: November 17, 2014
To: Anne M. Dubin, M.D., Pediatrics - Cardiology
Lan Ngoc Doan MPH CPH, Kara Sachie Motonaga MD, Scott Randolph Ceresnak M.D.
From: David D Oakes, M.D., Administrative Panel on Human Subjects in Medical Research

Protocol DISCO Study: An International Cohort Study on DISCORDant Atrio-Ventricular Connection
Protocol ID: 32505 **IRB Number:** 4947 (Panel: 6)

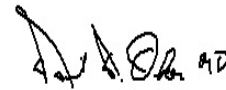
The IRB approved human subjects involvement in your research project on 11/17/2014. **Prior to subject recruitment and enrollment, if this is: a Cancer-related study, you must obtain Cancer Center Scientific Review Committee (SRC) approval;** a CTRU study, you must obtain CTRU approval; a VA study, you must obtain VA R and D Committee approval; and if a contract is involved, it must be signed.

The expiration date of this approval is 10/31/2017 at Midnight. If this project is to continue beyond that date, you must submit an updated protocol in advance for the IRB's re-approval. If this protocol is used in conjunction with any other human use it must be re-approved. Proposed changes to approved research must be reviewed and approved prospectively by the IRB. No changes may be initiated without prior approval by the IRB, except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to subjects. (Any such exceptions must be reported to the IRB within 10 working days.) Unanticipated problems involving risks to participants or others and other events or information, as defined and listed in the Report Form, must be submitted promptly to the IRB. (See Events and Information that Require Prompt Reporting to the IRB at <http://humansubjects.stanford.edu>.)

All continuing projects and activities must be reviewed and re-approved on or before Midnight of the expiration date. The approval period will be less than one year if so determined by the IRB. It is your responsibility to resubmit the project to the IRB for continuing review and to report the completion of the protocol to the IRB within 30 days.

Please remember that all data, including all signed consent form documents, must be retained for a minimum of three years past the completion of this research. Additional requirements may be imposed by your funding agency, your department, or other entities. (See Policy 1.9 on Retention of and Access to Research Data at <http://doresearch.stanford.edu/policies/research-policy-handbook>)

This institution is in compliance with requirements for protection of human subjects, including 45 CFR 46, 21 CFR 50 and 56, and 38 CFR 16.



David D Oakes, M.D., Chair

Approval Period: 11/17/2014 THROUGH 10/31/2017
Review Type: EXPEDITED - NEW
Funding: None
Expedited Under Category: 5
Assurance Number: FWA00000935 (SU), FWA00000934 (SHC), FWA00000933 (LPCH)

Soutien du Groupe Francophone de Rythmologie Pédiatrique et Congénitale



PÔLE CARDIO-THORACIQUE
**SERVICE DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES
CONGÉNITALES**

Dr Jean-Benoît THAMBO
Professeur des universités
Praticien hospitalier
Chef de service

Dr Xavier IRIART
Cardiologue
Dr Jean-Baptiste MOUTON
Dr Pierre-Emmanuel SEGUELA
Pédiatres - Soins intensifs et réanimation
Dr Julie THOMAS-CHABANEIX
Cardiologie congénitale du fœtus à l'adulte
Praticiens hospitaliers

Dr Jean-Bernard SELLY
Dr Marie VENIARD-NELSON
Chefs de clinique - Assistants

Dr Romain GIRARDOT
Dr Maria JIMENEZ
Praticiens attachés

Dr Pierre BORDACHAR
Rythmologie congénitale
enfants et adultes
Dr Frédéric SACHER
Electrophysiologie congénitale
enfants et adultes

Dr Caroline ROORYCK-THAMBO
Cardiogénétique
Dr Romain GIRARDOT
Echographie fœtale
Dr Karine NUBRET-LE CONIAT
Transplantation cardio-thoracique
Rendez-vous Tél. 05 57 65 61 10
Rendez-vous urgent Tél. 05 57 65 65 38

Cécile ESCOBEDO
Psychologue
Tél. 05 57 65 68 40 - Poste 56 840

Secrétariats
Fax 05 57 65 68 28
Consultations sur rendez-vous
Tél. 05 57 65 61 10
Hospitalisation de jour enfants
Tél. 05 57 65 61 09
Hospitalisation adultes et enfants
Tél. 05 57 65 64 65

Hospitalisation enfants 6e Ouest
Sandrine LESUEUR
Cadre de santé
Tél. 05 57 65 68 95 / 05 57 65 62 78
05 57 65 65 35 (secteur nourrissons)
05 57 65 67 95 (urgences 24h/24)
Fax 05 57 65 61 58
Hospitalisation adultes 6e Est
Nathalie BISBAU
Cadre de santé
Tél. 05 57 65 60 92
Tél. 05 57 65 64 28 - Fax 05 57 65 68 28

prenom-compose.nom-compose@chu-bordeaux.fr

Dr Alban-Elouen BARUTEAU
L'Institut du Thorax
INSERM U1087, CNRS U6291
French Reference Center for Inherited
Arrhythmias
Nantes University,
Nantes

Pessac, 15th June 2015

Dear Dr Baruteau,

The French-speaking Pediatric and Congenital Electrophysiology Unit has reviewed your study protocol and related paperwork for the study below:

The DISCO study: Characteristics of Cardiac Arrhythmias and Cardiac Conduction Disorders Associated With Complex Congenital Heart Diseases with Atrio-Ventricular DISCORDance

This study has been approved by the committee.

This is an important study which will give us paramount insights into both pathophysiology and outcomes of patients with ventricular inversion and will contribute substantially to the current knowledge.

Yours Sincerely,

Professor Jean-Benoît THAMBO, MD, PhD

HOPITAL CARDIOLOGIQUE
Du Haut-Lévêque - 33604 PESSAC
Professeur Jean-Benoît THAMBO
Cardiopathies Congénitales et Pédiatrique

GRUPE HOSPITALIER SUD - Hôpital Haut-Lévêque - Hôpital cardiologique
Avenue de Magellan 33604 Pessac cedex - Tél. 05 56 79 56 79
www.chu-bordeaux.fr

FINES5 33078364R

PAP094

**Soutien du Working Group for Cardiac Dysrhythmias and Electrophysiology,
Association for European Pediatric and Congenital Cardiology**



ASSOCIATION FOR EUROPEAN PAEDIATRIC AND CONGENITAL CARDIOLOGY
ASSOCIATION EUROPÉENNE POUR LA CARDIOLOGIE PÉDIATRIQUE ET
CONGENITALE

Göttingen, March 27, 2015

Dr. Alban-Elouen BARUTEAU
L'institut du thorax
INSERM U1087, CNRS U6291
French Reference Center for Inherited Arrhythmias
Nantes University, Nantes, France

Dear Dr. Baruteau,

The council of the Working Group for Cardiac Dysrhythmias and Electrophysiology of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC) has reviewed your study proposal and protocol for

DISCO study: Characteristics of Cardiac Arrhythmias and Cardiac Conduction Disorders Associated with Complex Congenital Heart Diseases with Atrio-Ventricular DISCOrdance

The study has been approved by the council and is fully endorsed by the Working Group.

We are confident that this extensive multi-center effort will give us important new insights into the pathophysiology and outcomes in this difficult patient group.

J-M Happonen, M.D.

Chairman, Dysrhythmia and Electrophysiology Working Group
Association for European Pediatric Cardiology

Pediatric Cardiac Electrophysiologist
Helsinki University Hospital
Pediatric Cardiology
Helsinki, Finland
juha-matti.happonen@hus.fi
+358 50 4272276

Soutien de la Pediatric and Congenital Electrophysiology Society



the Pediatric & Congenital
Electrophysiology Society

INSERM U1087, CNRS U6291
French Reference Center for Inherited Arrhythmias
Nantes University, Nantes, France

April 18, 2015

Dr Alban-Elouen BARUTEAU
L'Institut du Thorax

Ian H. Law, MD, President
Shubhayan Sanatani, MD, Vice-President (Research)
Mitch Cohen, Vice-President (Administration)
Kathryn Collins, MD, Vice President (Finance)
Charles Berul, M.D, Immediate Past-President

Dear Dr Baruteau,

The Research Committee of the Pediatric And Congenital Electrophysiology Society (PACES) has reviewed your study protocol and related paperwork for the study below:

The DISCO study: Characteristics of Cardiac Arrhythmias and Cardiac Conduction Disorders Associated With Complex Congenital Heart Diseases with Atrio-Ventricular DISCORDance

This study has been approved by the committee and has been circulated to all our members internationally, inviting them to join and be part of your study.

This is an important study which will give us paramount insights into both pathophysiology and outcomes of patients with ventricular inversion and will contribute substantially to the current knowledge.

Congratulations on this undertaking!

Sincerely,

Shubhayan Sanatani, MD, FRCPC, CCDS, FHRS
Vice-President Research
Pediatric and Congenital Electrophysiology Society

REFERENCES

- Abdelsayed M, Peters CH, Ruben PC. Differential thermosensitivity in mixed syndrome cardiac sodium channel mutants. *J Physiol*. 2015 Jul 1. doi: 10.1113/JP270139. [Epub ahead of print]
- Abe K, Machida T, Sumitomo N, Yamamoto H, Ohkubo K, Watanabe I, Makiyama T, Fukae S, Kohno M, Harrell DT, Ishikawa T, Tsuji Y, Nogami A, Watabe T, Oginosawa Y, Abe H, Maemura K, Motomura H, Makita N. Sodium channelopathy underlying familial sick sinus syndrome with early onset and predominantly male characteristics. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014;7:511-7.
- Abriel H, Rougier JS, Jalife J. Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. *Circ Res*. 2015;116:1971-88.
- Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Camm AJ, Ellinor PT, Gollob M, Hamilton R, Hershberger RE, Judge DP, Le Marec H, McKenna WJ, Schulze-Bahr E, Semsarian C, Towbin JA, Watkins H, Wilde A, Wolpert C, Zipes DP. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies. *Heart Rhythm* 2011;8:1308-39.
- Allwork SP, Bentall HH, Becker AE, Cameron H, Gerlis LM, Wilkinson JL, Anderson RH. Congenitally corrected transposition of the great arteries: morphologic study of 32 cases. *Am J Cardiol*. 1976;38:910-23.
- Almuqbil M, Srour M. Child Neurology: Andersen-Tawil syndrome. *Neurology*. 2015;84:e78-80.
- Al-Qattan MM, Abou Al-Shaar H. Molecular basis of the clinical features of Holt-Oram syndrome resulting from missense and extended protein mutations of the TBX5 gene as well as TBX5 intragenic duplications. *Gene*. 2015;560:129-36.
- Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D789-98.
- Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George AL Jr, Benson DW. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *Am J Hum Genet*. 2002;71:663-668.
- Anderson RH, Shinebourne EA, Gerlis LM. Criss-cross atrioventricular relationships producing paradoxical atrioventricular concordance or discordance. Their significance to nomenclature of congenital heart disease. *Circulation*. 1974;50:176-80.
- Anderson RH, Becker AE, Arnold R, Wilkinson JL. The conducting tissues in congenitally corrected transposition. *Circulation*. 1974;50:911-23.
- Anderson RH, Arnold R, Wilkinson JL. The conducting system in congenitally corrected transposition. *Lancet*. 1973;1:1286-8.
- Anderson RH, Becker AE, Freedom RM, Macartney FJ, Quero-Jimenez M, Shinebourne EA, Wilkinson JL, Tynan M. Sequential segmental analysis of congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*. 1984;5:281-7.
- Anderson RH. The conduction tissues in congenitally corrected transposition. *Ann Thorac Surg*. 2004;77:1881-2.
- Anderson RH, Yanni J, Boyett MR, Chandler NJ, Dobrzynski H. The anatomy of the cardiac conduction system. *Clin Anat* 2009; 22:99-113.
- Anderson RH, Shirali G. Sequential segmental analysis. *Ann Pediatr Cardiol*. 2009;2:24-35.
- Anderson KR, Danielson GK, McGoon DC, Lie JT. Ebstein's anomaly of the left-sided tricuspid valve: pathological anatomy of the valvular malformation. *Circulation*. 1978;58:187-91.
- Anderson KR, Ho SY, Anderson RH. Location and vascular supply of sinus node in human heart. *Br Heart J*. 1979;41:28-32.

- Antzelevitch C. The Brugada syndrome: diagnostic criteria and cellular mechanisms. *Eur Heart J*. 2001;22:356-63.
- 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: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation*. 2005;111:659-70.
- Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2002;3:299-309.
- Arking DE, Pulit SL, Crotti L, van der Harst P, Munroe PB, Koopmann TT, et al. Genetic association study of QT interval highlights role for calcium signaling pathways in myocardial repolarization. *Nat Genet*. 2014;46:826-36.
- Arnolds DE, Liu F, Fahrenbach JP, Kim GH, Schillinger KJ, Smemo S, McNally EM, Nobrega MA, Patel VV, Moskowitz IP. TBX5 drives Scn5a expression to regulate cardiac conduction system function. *J Clin Invest*. 2012;122:2509-18.
- Baban A, Pitto L, Pulignani S, et al. Holt-Oram syndrome with intermediate atrioventricular canal defect, and aortic coarctation: functional characterization of a de novo TBX5 mutation. *Am J Med Genet A* 2014; 164A:1419–24.
- Bailey D, Zanders E, Dean P. The end of the beginning for genomic medicine. *Nat Biotechnol*. 2001;19:207-9.
- Barsheshet A, Ackerman MJ, Benhorin J, Kaufman ES, Locati EH, Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent M, Zhang L, Goldenberg I. Risk factors for recurrent syncope and subsequent fatal or near-fatal events in children and adolescents with long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:941–950.
- Baruteau AE, Fouchard S, Behaghel A, Mabo P, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Leclercq C, Daubert JC, Schott JJ, Le Marec H, Probst V. Characteristics and long-term outcome of nonimmune isolated atrioventricular block diagnosed in utero or early childhood: a multicentre study. *Eur Heart J*. 2012;33:622–629.
- Baruteau AE, Behaghel A, Fouchard S, Mabo P, Schott JJ, Dina C, Chatel S, Villain E, Thambo JB, Marçon F, Gournay V, Rouault F, Chantepie A, Guillaumont S, Godart F, Martins RP, Delasalle B, Bonnet C, Fraisse A, Schleich JM, Lusson JR, Dulac Y, Daubert JC, Le Marec H, Probst V. Parental electrocardiographic screening identifies a high degree of inheritance for congenital and childhood non-immune isolated atrio-ventricular block. *Circulation*. 2012;126:1469–1477.
- Baruteau AE, Probst V, Abriel H. Inherited progressive cardiac conduction disorders. *Curr Opin Cardiol*. 2015 ;30 :33-39.
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, et al. Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*. 1997; 15:30–35.
- Bautista-Hernandez V, Myers PO, Cecchin F, Marx GR, Del Nido PJ. Late left ventricular dysfunction after anatomic repair of congenitally corrected transposition of the great arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;148:254-8.
- Bazett HC. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart*. 1920;7:353-70.
- Bloise R, Napolitano C, Timothy KW, Pontes Cavalcanti D, Szepesvary E, Drago F, Nastoli J, Splawski I, Keating MT, Priori SG. Clinical profile and risk of sudden death in children with Timothy syndrome. *Circulation*. 2007;114 suppl II:502.

Boczek NJ, Ye D, Jin F, Tester DJ, Huseby A, Bos JM, Johnson AJ, Kanter R, Ackerman MJ. Identification and Functional Characterization of a Novel CACNA1C-Mediated Cardiac Disorder Characterized by Prolonged QT Intervals with Hypertrophic Cardiomyopathy, Congenital Heart Defects, and Sudden Cardiac Death. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015 Aug 7. pii: CIRCEP.115.002745. [Epub ahead of print]

Beauchesne LM, Warnes CA, Connolly HM, Ammash NM, Tajik AJ, Danielson GK. Outcome of the unoperated adult who presents with congenitally corrected transposition of the great arteries. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:285-90.

Becker AE, Ho SY, Caruso G, Milo S, Anderson RH. Straddling right atrioventricular valves in atrioventricular discordance. *Circulation*. 1980;61:1133-41.

Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 1995;376 :683–685.

Benson DW, Gallagher JJ, Oldham HN, Sealy WC, Sterba R, Spach MS. Corrected transposition with severe intracardiac deformities with Wolff-Parkinson-White syndrome in a child. Electrophysiologic investigation and surgical correction. *Circulation*. 1980;61:1256-61.

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;112:1019–1028.

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.

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.

Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y, Remme CA, Gourraud JB, Simonet F, et al. Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nat Genet* 2013; 45:1044–1049.

Bezzina CR, Lahrouchi N, Priori SG. Genetics of sudden cardiac death. *Circ Res*. 2015;116:1919-36.

Bhuiyan ZA, van den Berg MP, van Tintelen JP, Bink-Boelkens MT, Wiesfeld AC, Alders M, Postma AV, van Langen I, Mannens MM, Wilde AA. Expanding spectrum of human RYR2-related disease: new electrocardiographic, structural, and genetic features. *Circulation*. 2007;116:1569–1576.

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*. 2009;89:847–885.

Biliciler-Denktaş G, Feldt RH, Connolly HM, Weaver AL, Puga FJ, Danielson GK. Early and late results of operations for defects associated with corrected transposition and other anomalies with atrioventricular discordance in a pediatric population. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122:234-41.

Bogarapu S, Bleyl SB, Calhoun A, Viskochil D, Saarel EV, Everitt MD, Frank DU. Phenotype of a patient with contiguous deletion of TBX5 and TBX3: expanding the disease spectrum. *Am J Med Genet A*. 2014;164A:1304–1309.

Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res*. 2001;88:1254–1258.

- Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1999;21:285–288.
- Bordachar P, Zachary W, Ploux S, Labrousse L, Haissaguerre M, Thambo JB. Pathophysiology, clinical course, and management of congenital complete atrioventricular block. *Heart Rhythm.* 2013;10:760-6.
- Boukens BJ, Christoffels VM. Electrophysiological patterning of the heart. *Pediatr Cardiol.* 2012;33:900-6.
- Boyett MR. 'And the beat goes on.' The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Exp Physiol.* 2009;94:1035-49.
- Brignole M, Auricchio A, Baron-Esquivias G, Bordachar P, Boriani G, Breithardt OA, et al. 2013 ESC guidelines on cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy: The task force on cardiac pacing and resynchronization therapy of the European Society of Cardiology (ESC). Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Eur Heart J.* 2013;34:2281-2329.
- Brink AJ, Torrington M. Progressive familial heart block: two types. *S Afr Med J.* 1977;52:53–59.
- Brucato A, Jonzon A, Friedman D, Allan LD, Vignati G, Gasparini M, Stein JI, Montella S, Michaelsson M, Buyon J. Proposal for a new definition of congenital complete atrioventricular block. *Lupus.* 2003;12:427-35.
- 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.
- Brugada J, Blom N, Sarquella-Brugada G, Blomstrom-Lundqvist C, Deanfield J, Janousek J, et al; European Heart Rhythm Association; Association for European Paediatric and Congenital Cardiology. Pharmacological and non-pharmacological therapy for arrhythmias in the pediatric population: EHRA and AEPIC-Arrhythmia Working Group joint consensus statement. *Europace.* 2013;15:1337-82.
- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell.* 2001;106:709–721.
- Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature.* 2008; 451:943–948.
- Brunklaus A, Ellis R, Reavey E, Semsarian C, Zuberi SM. Genotype phenotype associations across the voltage-gated sodium channel family. *J Med Genet.* 2014;51:650-8.
- Butters TD, Aslanidi OV, Inada S, Boyett MR, Hancox JC, Lei M, Zhang H. Mechanistic links between Na^+ channel (*SCN5A*) mutations and impaired cardiac pacemaking in sick sinus syndrome. *Circ Res.* 2010;107:126–137.
- Cardell BS. Corrected transposition of the great vessels. *Br Heart J.* 1956;18:186-92.
- Celermajer DS, Cullen S, Deanfield JE, Sullivan ID. Congenitally corrected transposition and Ebstein's anomaly of the systemic atrioventricular valve: association with aortic arch obstruction. *J Am Coll Cardiol.* 1991;18:1056-8.
- Chambers JC, Zhao J, Terracciano CM, Bezzina CR, Zhang W, Kaba R, et al. Genetic variation in *SCN10A* influences cardiac conduction. *Nat Genet.* 2010;42:149-52.
- Chameides L, Truex RC, Vetter V, Rashkind WJ, Galioto FM Jr, Noonan JA. Association of maternal systemic lupus erythematosus with congenital complete heart block. *N Engl J Med.* 1977;297:1204–1207.

- Chan TC, Sharieff GQ, Brady WJ. Electrocardiographic manifestations: pediatric ECG. *J Emerg Med.* 2008;35:421-30.
- Chaudhry B, Ramsbottom S, Henderson DJ. Genetics of cardiovascular development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;124:19-41.
- Chen PS, Joung B, Shinohara T, Das M, Chen Z, Lin SF. The initiation of the heart beat. *Circ J.* 2010;74:221–225.
- 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.
- Chiaromonte F, Yap VB, Miller W. Scoring pairwise genomic sequence alignments. *Pac Symp Biocomput.* 2002:115-26.
- Chockalingam P, Clur SA, Breur JM, Kriebel T, Paul T, Rammeloo LA, Wilde AA, Blom NA. The diagnostic and therapeutic aspects of loss-of-function cardiac sodium channelopathies in children. *Heart Rhythm.* 2012;9:1986-92.
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloğlu A, Ozen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S, Lifton RP. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:19096-101.
- Christiansen M, Tønder N, Larsen LA, Andersen PS, Simonsen H, Oyen N, Kanters JK, Jacobsen JR, Fosdal I, Wettrell G, Kjeldsen K. Mutations in the HERG K⁺-ion channel: a novel link between long QT syndrome and sudden infant death syndrome. *Am J Cardiol.* 2005;95:433-4.
- Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AF. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ Res.* 2010;106:240–254.
- Clancy CE, Tateyama M, Liu H, Wehrens XH, Kass RS. Non-equilibrium gating in cardiac Na⁺ channels: an original mechanism of arrhythmia. *Circulation.* 2003;107:2233-7.
- Cohen MI, Triedman JK, Cannon BC, Davis AM, Drago F, Janousek J, Klein GJ, Law IH, Morady FJ, Paul T, Perry JC, Sanatani S, Tanel RE. PACES/HRS expert consensus statement on the management of the asymptomatic young patient with a Wolff-Parkinson-White (WPW, ventricular preexcitation) electrocardiographic pattern: developed in partnership between the Pediatric and Congenital Electrophysiology Society (PACES) and the Heart Rhythm Society (HRS). Endorsed by the governing bodies of PACES, HRS, the American College of Cardiology Foundation (ACCF), the American Heart Association (AHA), the American Academy of Pediatrics (AAP), and the Canadian Heart Rhythm Society (CHRS). *Heart Rhythm.* 2012;9:1006-24.
- Connelly MS, Liu PP, Williams WG, Webb GD, Robertson P, McLaughlin PR. Congenitally corrected transposition of the great arteries in the adult: functional status and complications. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1238-43.
- Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature.* 2010;464:704-12.
- Conte G, de Asmundis C, Ciconte G, Julià J, Sieira J, Chierchia GB, Brugada P. Follow-up from childhood to adulthood of individuals with family history of Brugada syndrome and normal electrocardiograms. *JAMA.* 2014;312:2039-41.
- Costa MW, Guo G, Wolstein O, Vale M, Castro ML, Wang L, Otway R, Riek P, Cochrane N, Furtado M, Semsarian C, Weintraub RG, Yeoh T, Hayward C, Keogh A, Macdonald P, Feneley M, Graham RM, Seidman JG, Seidman CE, Rosenthal N, Fatkin D, Harvey RP. Functional characterization of a novel mutation in NKX2-5 associated with congenital heart disease and adult-onset cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6:238-47.

- Côté A, Russo P, Michaud J. Sudden unexpected deaths in infancy: what are the causes? *J Pediatr*. 1999;135:437-43.
- Cottrell AJ, Holden MP, Hunter S. Interrupted aortic arch type A associated with congenitally corrected transposition of great arteries and ventricular septal defect. Successful direct aortic anastomosis and pulmonary artery banding in an infant. *Br Heart J*. 1981;46:671-4.
- Crosson JE, Callans DJ, Bradley DJ, Dubin A, Epstein M, Etheridge S, Papez A, Phillips JR, Rhodes LA, Saul P, Stephenson E, Stevenson W, Zimmerman F. PACES/HRS expert consensus statement on the evaluation and management of ventricular arrhythmias in the child with a structurally normal heart. *Heart Rhythm*. 2014;11:e55-78.
- Crosson JE, Nies M. Brugada syndrome in children. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2015;13:173-81.
- Daliento L, Corrado D, Buja G, John N, Nava A, Thiene G. Rhythm and conduction disturbances in isolated, congenitally corrected transposition of the great arteries. *Am J Cardiol*. 1986;58:314-18.
- Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL Jr, Roden DM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation*. 2008;117:1927-35.
- Davignon A, Rautaharju P, Boisselle E, Soumis F, Mégélas M, Choquette A. Normal ECG standards for infants and children. *Pediatr Cardiol*. 1979;1:123-152.
- De Luca A, Sarkozy A, Consoli F, Ferese R, Guida V, Dentici ML, Mingarelli R, Bellacchio E, Tuo G, Limongelli G, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B. Familial transposition of the great arteries caused by multiple mutations in laterality genes. *Heart*. 2010;96:673-7.
- Demion M, Thireau J, Gueffier M, Finan A, Khoueiry Z, Cassan C, Serafini N, Aimond F, Granier M, Pasquié JL, Launay P, Richard S. Trpm4 gene invalidation leads to cardiac hypertrophy and electrophysiological alterations. *PLoS One*. 2014;9:e115256.
- Derksen RH, Meilof JF. Anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoantibody levels in relation to systemic lupus erythematosus disease activity and congenital heart block. A longitudinal study comprising two consecutive pregnancies in a patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;35:953-959.
- Digilio MC, Casey B, Toscano A, Calabro R, Pacileo G, Marasini M, Banaudi E, Giannotti A, Dallapiccola B, Marino B. Complete transposition of the great arteries: patterns of congenital heart disease in familial recurrence. *Circulation* 2001;104:2809-2814.
- Dobrzynski H, Li J, Tellez J, Greener ID, Nikolski VP, Wright SE, Parson SH, Jones SA, Lancaster MK, Yamamoto M, Honjo H, Takagishi Y, Kodama I, Efimov IR, Billeter R, Boyett MR. Computer three dimensional reconstruction of the sinoatrial node. *Circulation*. 2005;111:846-854.
- Dobrzynski H, Anderson RH, Atkinson A, Borbas Z, D'Souza A, Fraser JF, Inada S, Logantha SJ, Monfredi O, Morris GM, Moorman AF, Nikolaidou T, Schneider H, Szuts V, Temple IP, Yanni J, Boyett MR. Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. *Pharmacol Ther* 2013; 139:260-288.
- Doris PA. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease:common variant hypothesis. *Hypertension*. 2002;39:323-31.
- Dubowitz V. X;autosome translocations in females with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Nature*. 1986;322:291-2.
- Eckhardt LL. Phenotype, genotype, and cellular physiology: need for clarity in characterization. *Heart Rhythm*. 2012;9:1993-4.
- Einthoven W. The different forms of the human electro-cardiogram and their signification. *Lancet*. 1912;1:853-861.

Eliasson H, Sonesson SE, Salomonsson S, Skog A ; Swedish Congenital Heart Block Study Group, Wahren-Herlenius M, Gadler F. Outcome in young patients with isolated complete atrioventricular block and permanent pacemaker treatment : a nationwide study of 127 patients. *Heart Rhythm*. 2015, in press. doi:10.1016/j.hrthm.2015.06.028.

Elizari MV, Acunzo RS, Ferreiro M. Hemiblocks revisited. *Circulation*. 2007;115:1154-63.

Ellinor PT, Nam EG, Shea MA, Milan DJ, Ruskin JN, MacRae CA. Cardiac sodium channel mutation in atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2008;5:99-105.

EI-Sherif N, Boutjdir M. Role of pharmacotherapy in cardiac ion channelopathies. *Pharmacol Ther*. 2015 Sep 12. pii: S0163-7258(15)00178-3. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.09.002. [Epub ahead of print]

El-Zein C, Subramanian S, Ilbawi M. Evolution of the Surgical Approach to Congenitally Corrected Transposition of the Great Arteries. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*. 2015;18:25-33.

Epstein JA. Cardiac development and implications for heart disease. *N Engl J Med* 2010;363:1638-47.

Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, Estes NA 3rd, Freedman RA, Gettes LS, Gillinov AM, Gregoratos G, Hammill SC, Hayes DL, Hlatky MA, Newby LK, Page RL, Schoenfeld MH, Silka MJ, Stevenson LW, Sweeney MO, Tracy CM, Epstein AE, Darbar D, DiMarco JP, Dunbar SB, Estes NA 3rd, Ferguson TB Jr, Hammill SC, Karasik PE, Link MS, Marine JE, Schoenfeld MH, Shanker AJ, Silka MJ, Stevenson LW, Stevenson WG, Varosy PD; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; Heart Rhythm Society. 2012 ACCF/AHA/HRS focused update incorporated into the ACCF/AHA/HRS 2008 guidelines for device-based therapy of cardiac rhythm abnormalities: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:e6-75.

Evans WN, Acherman RJ, Mayman GA, Rollins RC, Kip KT. Simplified pediatric electrocardiogram interpretation. *Clin Pediatr*. 2010;49:363-72.

Fabris E, Brun F, Porto AG, Losurdo P, Vitali Serdoz L, Zecchin M, Severini GM, Mestroni L, Di Chiara A, Sinagra G. Cardiac hypertrophy, accessory pathway, and conduction system disease in an adolescent: the PRKAG2 cardiac syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:e17.

Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ Jr, Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Muehle G, Johnson W, McDonough B. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*. 1999;341:1715-1724.

Fedorov VV, Schuessler RB, Hemphill M, Ambrosi CM, Chang R, Voloshina AS, Brown K, Hucker WJ, Efimov IR. Structural and functional evidence for discrete exit pathways that connect the canine sinoatrial node and atria. *Circ Res*. 2009;104:915-923.

Fleming S, Thompson M, Stevens R, Heneghan C, Plüddemann A, Maconochie I, Tarassenko L, Mant D. Normal ranges of heart rate and respiratory rate in children from birth to 18 years of age: a systematic review of observational studies. *Lancet*. 2011;377:1011-8.

Forrester JD, Mead P. Third-degree heart block associated with lyme carditis: review of published cases. *Clin Infect Dis*. 2014;59:996-1000.

Frank M, Wirth A, Andrié RP, Kreuzberg MM, Dobrowolski R, Seifert G, Offermanns S, Nickenig G, Willecke K, Schrickel JW. Connexin45 provides optimal atrioventricular nodal conduction in the adult mouse heart. *Circ Res*. 2012;111:1528-38.

Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42:1118-25.

Franklin RC, Jacobs JP, Krogmann ON, Béland MJ, Aiello VD, Colan SD, Elliott MJ, William Gaynor J, Kurosawa H, Maruszewski B, Stellin G, Tchervenkov CI, Walter HL, Weinberg P, Anderson RH. Nomenclature for congenital and paediatric cardiac disease: historical perspectives and the International Pediatric and Congenital Cardiac Code. *Cardiol Young.* 2008;18(Suppl2):70-80.

Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;449:851-61.

Friedberg DZ, Nadas AS. Clinical profile of patients with congenital corrected transposition of the great arteries. A study of 60 cases. *N Engl J Med.* 1970;282:1053-59.

Friedrich C, Rinné S, Zumhagen S, Kiper AK, Silbernagel N, Netter MF, Stallmeyer B, Schulze-Bahr E, Decher N. Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO Mol Med* 2014;6:937-51.

Fulton ZMK, Judson CF, Norris GW. Congenital heart block occurring in a father and two children, one an infant. *Am J Med Sci.* 1910;140:339-48.

Fyler DC. Report of the New England Regional Infant Cardiac Program. *Pediatrics.* 1980;65:375-461.

Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol.* 2007;582:675-93.

Gabriel SB, Salomon R, Pelet A, Angrist M, Amiel J, Fornage M, Attié-Bitach T, Olson JM, Hofstra R, Buys C, Steffann J, Munnich A, Lyonnet S, Chakravarti A. Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet.* 2002;31:89-93.

Gaio U, Schweickert A, Fischer A, Garratt AN, Müller T, Ozcelik C, Lankes W, Strehle M, Britsch S, Blum M, Birchmeier C. A role of the cryptic gene in the correct establishment of the left-right axis. *Curr Biol.* 1999;9:1339-42.

Gazes PC, Culler RM, Taber E, Kelly TE. Congenital familial cardiac conduction defects. *Circulation.* 1965;32:32-34.

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.

Gillette DC, Busch U, Mullins CE, McNamara DG. Electrophysiologic studies in patients with ventricular inversion and "corrected transposition". *Circulation.* 1979;60:939-45.

Gillette DC, Garson A Jr. Sudden cardiac death in the pediatric population. *Circulation.* 1992;85:64-9.

Giudicessi JR, Ackerman MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Transl Res.* 2013;161:1-14.

Giudicessi JR, Ackerman MJ. Genotype- and phenotype-guided management of congenital long QT syndrome. *Curr Probl Cardiol.* 2013;38:417-55.

Goldmuntz E, Bamford R, Karkera JD, dela Cruz J, Roessler E, Muenke M. CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double-outlet right ventricle. *Am J Hum Genet.* 2002;70:776-80.

Goldschlager N. ECG atlas of advanced electrocardiogram interpretation. *J Electrocardiol.* 2014;47:272.

- Gollob MH, Green MS, Tang AS, Gollob T, Karibe A, Ali Hassan AS, Ahmad F, Lozado R, Shah G, Fananapazir L, Bachinski LL, Roberts R. Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. *N Engl J Med*. 2001;344:1823–1831.
- Goodacre S, McLeod K. ABC of clinical electrocardiography: Paediatric electrocardiography. *BMJ* 2002;324:1382-85.
- Gourraud JB, Kyndt F, Fouchard S, Rendu E, Jaafar P, Gully C, Gacem K, Dupuis JM, Longueville A, Baron E, Karakachoff M, Cebon JP, Chatel S, Schott JJ, Le Marec H, Probst V. Identification of a strong genetic background for progressive cardiac conduction defect by epidemiological approach. *Heart* 2012;98:1305-10.
- Graham TP Jr, Bernard YD, Mellen BG, Celermajer D, Baumgartner H, Cetta F, Connolly HM, Davidson WR, Dellborg M, Foster E, Gersony WM, Gessner IH, Hurwitz RA, Kaemmerer H, Kugler JD, Murphy DJ, Noonan JA, Morris C, Perloff JK, Sanders SP, Sutherland JL. Long-term outcome in congenitally corrected transposition of the great arteries: a multi-institutional study. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:255-61.
- Greener ID, Monfredi O, Inada S, Chandler NJ, Tellez JO, Atkinson A, Taube MA, Billeter R, Anderson RH, Efimov IR, Molenaar P, Sigg DC, Sharma V, Boyett MR, Dobrzynski H. Molecular architecture of the human specialised atrioventricular conduction axis. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50:642-51.
- Groh WJ. Arrhythmias in the muscular dystrophies. *Heart Rhythm*. 2012;9:1890-5.
- Guinamard R, Bouvagnet P, Hof T, Liu H, Simard C, Sallé L. TRPM4 in cardiac electrical activity. *Cardiovasc Res*. 2015;108:21-30.
- Guntheroth WG, Spiers PS. The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. *Pediatrics*. 2002;110:e64.
- Guntheroth W, Chun L, Patton KK, et al. Wenckebach periodicity at rest that normalizes with tachycardia in a family with a NKX2.5 mutation. *Am J Cardiol* 2012; 110:1646–1650.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*. 1983;306:234-8.
- Harris BU, Miyake CY, Motonaga KS, Dubin AM. Diagnosis and management of pediatric brugada syndrome: a survey of pediatric electrophysiologists. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2014;37:638-42.
- Herrmann S, Stieber J, Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels. *Pflugers Arch*. 2007;454:517–522.
- Hervé JC, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development. *Pathol Biol*. 2008;56:334-41.
- Hiramatsu T, Matsumura G, Konuma T, Yamazaki K, Kurosawa H, Imai Y. Long-term prognosis of double-switch operation for congenitally corrected transposition of the great arteries. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012;42:1004-8.
- Ho CY, Jaalouk DE, Vartiainen MK, Lammerding J. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature*. 2013;497:507-11.
- Hoesl E, Stieber J, Herrmann S, Feil S, Tybl E, Hofmann F, Feil R, Ludwig A. Tamoxifen-inducible gene deletion in the cardiac conduction system. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:62–69.
- Hof T, Simard C, Rouet R, Sallé L, Guinamard R. Implication of the TRPM4 nonselective cation channel in mammalian sinus rhythm. *Heart Rhythm*. 2013;10:1683-9.

- Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1890–1900.
- Holm H, Gudbjartsson DF, Arnar DO, Thorleifsson G, Thorgeirsson G, Stefansdottir H, Gudjonsson SA, Jonasdottir A, Mathiesen EB, Njølstad I, Nyrrnes A, Wilsgaard T, Hald EM, Hveem K, Stoltenberg C, Løchen M-L, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nat Genet.* 2010;42:117–122.
- Hong K, Berruezo-Sanchez A, Pongvarin N, Oliva A, Vatta M, Brugada J, Brugada P, Towbin JA, Dumaine R, Pin˜ero-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;15:64–69.
- Hornung TS, Calder L. Congenitally corrected transposition of the great arteries. *Heart.* 2010;96:1154-61.
- Hosseinpour AR, McCarthy KP, Griselli M, Sethia B, Ho SY. Congenitally corrected transposition: size of the pulmonary trunk and septal malalignment. *Ann Thorac Surg.* 2004;77:2163-6.
- Hothi SS, Ara F, Timperley J. Y1449C SCN5A mutation associated with overlap disorder comprising conduction disease, Brugada syndrome, and atrial flutter. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2015;26:93-97.
- Houyel L, Khoshnood B, Anderson RH, Lelong N, Thieulin AC, Goffinet F, Bonnet D; EPICARD study group. Population-based evaluation of a suggested anatomic and clinical classification of congenital heart defects based on the International Paediatric and Congenital Cardiac Code. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:64.
- Hraska V, Duncan BW, Mayer JE Jr, Freed M, del Nido PJ, Jonas RA. Long-term outcome of surgically treated patients with corrected transposition of the great arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;129:182-91.
- Hu D, Barajas-Martinez H, Pfeiffer R, Dezi F, Pfeiffer J, Buch T, Betzenhauser MJ, Belardinelli L, Kahlig KM, Rajamani S, DeAntonio HJ, Myerburg RJ, Ito H, Deshmukh P, Marieb M, Nam GB, Bhatia A, Hasdemir C, Haissaguerre M, Veltmann C, Schimpf R, Borggrefe M, Visjin S, Antzelevitch C. Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:66-79.
- Huser J, Blatter LA, Lipsius SL. Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol.* 2000;524 (pt 2);415–422.
- Hutha JC, Maloney JD, Ritter DG, Ilstrup DM, Feldt RH. Complete atrioventricular block in patients with atrioventricular discordance. *Circulation.* 1983;67:1374-77.
- Huhta JC, Danielson GK, Ritter DG, Ilstrup DM. Survival in atrioventricular discordance. *Pediatr Cardiol.* 1985;6:57-60.
- Huhta J. The natural history of congenitally corrected transposition of the great arteries. *World J Pediatr Congenit Heart Surg.* 2011;2:59-63.
- Hsu DT. Cardiac manifestations of neuromuscular disorders in children. *Paediatr Respir Rev.* 2010;11:35–38.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431:931-45.
- Ikeda T, Abe A, Yusu S, Nakamura K, Ishiguro H, Mera H, Yotsukura M, Yoshino H. The full stomach test as a novel diagnostic technique for identifying patients at risk of Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2006;17:602-7.

- Issa ZF, Miller JM, Zipes DP. Clinical arrhythmology and electrophysiology. A companion to Braunwald's heart disease. Second edition. Elsevier, 2012.
- Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, Krauss RM, Myers RM, Ridker PM, Chasman DI, Mefford H, Ying P, Nickerson DA, Eichler EE. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet.* 2009;84:148-61.
- Jacobs JP, Franklin RC, Wilkinson JL, Cochrane AD, Karl TR, Aiello VD, Béland MJ, Colan SD, Elliott MJ, Gaynor JW, Krogmann ON, Kurosawa H, Maruszewski B, Stellin G, Tchervenkov CI, Weinberg PM. The nomenclature, definition and classification of discordant atrioventricular connections. *Cardiol Young.* 2006;16 Suppl 3:72-84.
- Jaeggi ET, Hamilton RM, Silverman ED, Zamora SA, Hornberger LK. Outcome of children with fetal, neonatal or childhood diagnosis of isolated congenital atrioventricular block. A single institution's experience of 30 years. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:130-137.
- James TN. Anatomy of the cardiac conduction system in the rabbit. *Circ Res.* 1967;20:638-48.
- Janousek J, van Geldorp IE, Krupickova S, Rosenthal E, Nugent K, Tomaske M, Früh A, Elders J, Hiiipala A, Kerst G, Gebauer RA, Kubuš P, Frias P, Gabbarini F, Clur SA, Nagel B, Ganame J, Papagiannis J, Marek J, Tisma-Dupanovic S, Tsao S, Nürnberg JH, Wren C, Friedberg M, de Guillebon M, Volaufova J, Prinzen FW, Delhaas T; Working Group for Cardiac Dysrhythmias and Electrophysiology of the Association for European Pediatric Cardiology. Permanent cardiac pacing in children: Choosing the optimal pacing site: A multicenter study. *Circulation* 2013;127:613-623.
- Jansen JA, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:76-82.
- 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.
- Jhang WK, Lee BH, Kim GH, Lee JO, Yoo HW. Clinical and molecular characterisation of Holt-Oram syndrome focusing on cardiac manifestations. *Cardiol Young.* 2014;12:1-6.
- Johnson RL, Averill KH, Lamb LE. Electrocardiographic findings in 67,375 asymptomatic subjects. VII: Atrioventricular block. *Am J Cardiol.* 1960;6:153-77.
- Jongbloed MR, Vicente Steijn R, Hahurij ND, Kelder TP, Schaliij MJ, Gittenberger-de Groot AC, Blom NA. Normal and abnormal development of the cardiac conduction system; implications for conduction and rhythm disorders in the child and adult. *Differentiation.* 2012;84:131-48.
- Joung B, Ogawa M, Lin SF, Chen PS. The calcium and voltage clocks in sinoatrial node automaticity. *Korean Circ J.* 2009;39:217-222.
- Junttila MJ, Gonzalez M, Lizotte E, Benito B, Vernooy K, Sarkozy A, Huikuri HV, Brugada P, Brugada J, Brugada R. Induced Brugada-type electrocardiogram, a sign for imminent malignant arrhythmias. *Circulation.* 2008;117:1890-3.
- Kääb S, Schulze-Bahr E. Susceptibility genes and modifiers for cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 2005;67:397-413.
- Kabunga P, Lau AK, Phan K, Puranik R, Liang C, Davis RL, Sue CM, Sy RW. Systematic review of cardiac electrical disease in Kearns-Sayre syndrome and mitochondrial cytopathy. *Int J Cardiol.* 2015;181:303-310.
- Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science.* 1994;264:1604-8.
- Kanter RJ, Pfeiffer R, Hu D, Barajas-Martinez H, Carboni MP, Antzelevitch C. Brugada-like syndrome in infancy presenting with rapid ventricular tachycardia and intraventricular conduction delay. *Circulation.* 2012;125:14-22.

Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, Benito B, Berthet M, Brugada J, Brugada P, Fressart V, Guerschicoff A, Harris-Kerr C, Kamakura S, Kyndt F, Koopmann TT, Miyamoto Y, Pfeiffer R, Pollevick GD, Probst V, Zumhagen S, Vatta M, Towbin JA, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Antzelevitch C, Salisbury BA, Guicheney P, Wilde AA, Brugada R, Schott JJ, Ackerman MJ.

An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2010;7:33-46.

Kapplinger JD, Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Callis TE, Valdivia CR, Makielski JC, Wilde AA, Ackerman MJ. Enhanced Classification of Brugada Syndrome-Associated and Long-QT Syndrome-Associated Genetic Variants in the SCN5A-Encoded Na(v)1.5 Cardiac Sodium Channel. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:582-95.

Karkera JD, Lee JS, Roessler E, Banerjee-Basu S, Ouspenskaia MV, Mez J, Goldmuntz E, Bowers P, Towbin J, Belmont JW, Baxevanis AD, Schier AF, Muenke M. Loss-of-function mutations in growth differentiation factor-1 (GDF1) are associated with congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet*. 2007;81:987-94.

Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science*. 2001;293:2256-9.

Kawashima T, Sasaki H. Gross anatomy of the human cardiac conduction system with comparative morphological and developmental implications for human application. *Ann Anat*. 2011;193:1-12.

Keavney B. Left, right: a step forward in understanding transposition of the great arteries. *Heart*. 2010;96:653-5.

Kecskés M, Jacobs G, Kerselaers S, Syam N, Menigoz A, Vangheluwe P, Freichel M, Flockerzi V, Voets T, Vennekens R. The Ca(2+)-activated cation channel TRPM4 is a negative regulator of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol*. 2015;110:43.

Klaver EC, Versluijs GM, Wilders R. Cardiac ion channel mutations in the sudden infant death syndrome. *Int J Cardiol*. 2011;152:162-70.

Kligfield P, Gettes LS, Bailey JJ, Childers R, Deal BJ, Hancock EW, van Herpen G, Kors JA, Macfarlane P, Mirvis DM, Pahlm O, Rautaharju P, Wagner GS, Josephson M, Mason JW, Okin P, Surawicz B, Wellens H; American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; American College of Cardiology Foundation; Heart Rhythm Society. Recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part I: the electrocardiogram and its technology a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1109-27.

Knight CS, Litovsky SH, Pearce FB, Faye-Petersen O. Pulmonary atresia with intact ventricular septum associated with congenitally corrected transposition. *Pediatr Cardiol*. 2006;27:741-5.

Knops RE, Tjong FV, Neuzil P, Sperzel J, Miller MA, Petru J, Simon J, Sediva L, de Groot JR, Dukkupati SR, Koruth JS, Wilde AA, Kautzner J, Reddy VY. Chronic Performance of a Leadless Cardiac Pacemaker: 1-Year Follow-Up of the LEADLESS Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1497-504.

Knowlton RG, Cohen-Haguenaer O, Van Cong N, Frézal J, Brown VA, Barker D, Braman JC, Schumm JW, Tsui LC, Buchwald M, et al. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature*. 1985;318:380-2.

Koneru JN, Wood MA, Ellenbogen KA. Rare forms of preexcitation: a case study and brief overview of familial forms of preexcitation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:e82-7.

Kovach JR, Benson DW. Conduction disorders and Nav1.5. *Cardiol Clin* 2014; 6:723–731.

- Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development*. 2000;127:4179-93.
- Kruse M, Schulze-Bahr E, Corfield V, Beckmann A, Stallmeyer B, Kurtbay G, Ohmert I, Schulze-Bahr E, Brink P, Pongs O. Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J Clin Invest*. 2009;119:2737–2744.
- Kruse M, Pongs O. TRPM4 channels in the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;15:68-73.
- Kuehl KS, Loffredo CA. Population-based study of L-transposition of the great arteries: possible associations with environmental factors. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2003;67:162-7.
- Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development*. 2000;127:3501-12.
- Kupersmith J, Krongrad E, Gersony WM, Bowman FO Jr. Electrophysiologic identification of the specialized conduction system in corrected transposition of the great arteries. *Circulation*. 1974;50:795-800.
- Kurian T, Ambrosi C, Hucker W, Fedorov VV, Efimov IR. Anatomy and electrophysiology of the human AV node. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2010;33:754-62.
- Kurosawa H, Imai Y, Becker AE. Congenitally corrected transposition with normally positioned atria, straddling mitral valve, and isolated posterior atrioventricular node and bundle. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990;99:312-3.
- Kwon HW, Lee SY, Kwon BS, Kim GB, Bae EJ, Kim WH, Noh CI, Cho SI, Park SS. Long QT syndrome and dilated cardiomyopathy with SCN5A p.R1193Q polymorphism: cardioverter-defibrillator implantation at 27 months. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2012;35:e243-6.
- 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;104:3081–3086.
- Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker. *Circ Res*. 2010;106:659–673.
- Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmbhatt B, Donarum EA, Marino M, Tiso N, Viitasalo M, Toivonen L, Stephan DA, Kontula K. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2001;103:485-90.
- Lambiase P, Tinker A. Connexins in the heart. *Cell Tissue Res* 2015;360:675-84.
- Lango Allen H, Estrada K, Lettre G, Berndt SI, Weedon MN, Rivadeneira F, et al. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*. 2010;467:832-8.
- Lau JK, Sy RW, Corbett A, Kritharides L. Myotonic dystrophy and the heart: A systematic review of evaluation and management. *Int J Cardiol*. 2015;184:600-608.
- Laurent G, Saal S, Amarouch MY, Béziau DM, Marsman RF, Faivre L, Barc J, Dina C, Bertaux G, Barthez O, Thauvin-Robinet C, Charron P, Fressart V, Maltret A, Villain E, Baron E, Mérot J, Turpault R, Coudière Y, Charpentier F, Schott JJ, Loussouarn G, Wilde AA, Wolf JE, Baró I, Kyndt F, Probst V. Multifocal ectopic Purkinje-related premature contractions: a new SCN5A-related cardiac channelopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:144-56.

- Lazzerini PE, Capecchi PL, Laghi-Pasini F. Isolated atrioventricular block of unknown origin in adults and anti-Ro/SSA antibodies: clinical evidence, putative mechanisms, and therapeutic implications. *Heart Rhythm*. 2015;12:449-54.
- Le Gloan L, Pichon O, Isidor B, Boceno M, Rival JM, David A, Le Caignec C. A 8.26Mb deletion in 6q16 and a 4.95Mb deletion in 20p12 including JAG1 and BMP2 in a patient with Alagille syndrome and Wolff-Parkinson-White syndrome. *Eur J Med Genet*. 2008;51:651-7.
- Lei M, Zhang H, Grace AA, Huang CL. SCN5A and sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc Res*. 2007;74:356–365.
- Lei M, Jones SA, Liu J, Lancaster MK, Fung SS, Dobrzynski H, Camelliti P, Maier SK, Noble D, Boyett MR. Requirement of neuronal and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *J Physiol*. 2004;559:835–848.
- Lenègre J. Bundle branch block; clinical, electrical, histological and anatomical aspects. *Acta Cardiol*. 1955;103:279-86.
- Lenègre J, Moreau P. Chronic auriculo-ventricular block: anatomical, clinical and histological study. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1963;56:867– 888.
- Lenègre J. Etiology and pathology of bilateral bundle branch block in relation to complete heart block. *Prog Cardiovasc Dis*. 1964;6:409-44.
- Le Scouarnec S, Bhasin N, Vieyres C, Hund TJ, Cunha SR, Koval O, Marionneau C, Chen B, Wu Y, Demolombe S, Song LS, Le Marec H, Probst V, Schott JJ, Anderson ME, Mohler PJ. Dysfunction in ankyrin-B-dependent ion channel and transporter targeting causes human sinus node disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15617–15622.
- Lev M, Licata RH, May RC. The conduction system in mixed levocardia with ventricular inversion (corrected transposition). *Circulation*. 1963;28:232-7.
- Lev M. Anatomic basis for atrioventricular block. *Am J Med*. 1964;37:742–748.
- Lev M, Cuadros H, Paul MH. Interruption of the atrioventricular bundle with congenital atrioventricular block. *Circulation* 1971;43:703-10.
- Liang X, Evans SM, Sun Y. Insights into cardiac conduction system formation provided by HCN4 expression. *Trends Cardiovasc Med*. 2015;25:1-9.
- Liao Z, Chang Y, Ma J, Fang P, Zhang K, Ren X, Yang P, Yu B, Hu J, Yang Q, Ouyang F, Zhang S. Atrioventricular node reentrant tachycardia in patients with congenitally corrected transposition of the great arteries and results of radiofrequency catheter ablation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:1143-48.
- Lippi G, Montagnana M, Meschi T, Comelli I, Cervellin G. Genetic and clinical aspects of Brugada syndrome: an update. *Adv Clin Chem*. 2012;56:197-208.
- Little SC, Mohler PJ. TRPM4 modulates sinus node diastolic depolarization. *Heart Rhythm*. 2013;10:1690-1.
- Liu N, Colombi B, Memmi M, Zissimopoulos S, Rizzi N, Negri S, Imbriani M, Napolitano C, Lai FA, Priori SG. Arrhythmogenesis in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: insights from a RyR2 R4496C knock-in mouse model. *Circ Res*. 2006;99:292–298.
- Liu J, Dobrzynski H, Gianni J, Boyett MR, Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res*. 2007;73:729–738.

- Liu J, Noble PJ, Xiao G, Abdelrahman M, Dobrzynski H, Boyett MR, Lei M, Noble D. Role of pacemaking current in cardiac nodes: insights from a comparative study of sinoatrial node and atrioventricular node. *Prog Biophys Mol Biol.* 2008;96:294–304.
- Liu JF, Jons C, Moss AJ, McNitt S, Peterson DR, Qi M, Zareba W, Robinson JL, Fowler SJ, Priori SG. Clinical spectrum of patients with a Brugada ECG. *Curr Opin Cardiol* 2009;24:74–81.
- Liu H, El ZL, Kruse M, et al. Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3:374–385.
- Liu H, Chatel S, Simard C, Syam N, Salle L, Probst V, Morel J, Millat G, Lopez M, Abriel H, Schott JJ, Guinamard R, Bouvagnet P. Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 Brugada cases with 11 mutations in the TRPM4 channel. *PLoS One.* 2013;8:e54131.
- Liu M, Yang KC, Dudley SC. Cardiac sodium channel mutations: why so many phenotypes ? *Nat Rev Cardiol* 2014;11:607-15.
- Liu Y, Bai R, Wang L, Zhang C, Zhao R, Wan D, Chen X, Caceres G, Barr D, Barajas-Martinez H, Antzelevitch C, Hu D. Identification of a novel de novo mutation associated with PRKAG2 cardiac syndrome and early onset of heart failure. *PLoS One.* 2013;8:e64603.
- Locati EH, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Lehmann MH, Towbin JA, Priori SG, Napolitano C, Robinson JL, Andrews M, Timothy K, Hall WJ. Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International LQTS Registry. *Circulation.* 1998;97:2237-44.
- Lopes LM, Tavares GM, Damiano AP, Lopes MA, Aiello VD, Schultz R, Zugaib M. Perinatal outcome of fetal atrioventricular block: one-hundred-sixteen cases from a single institution. *Circulation* 2008;118:1268–1275.
- Ludwig A, Herrmann S, Hoesl E, Stieber J. Mouse models for studying pacemaker channel function and sinus node arrhythmia. *Prog Biophys Mol Biol.* 2008;98:179–185.
- Ly M, Belli E, Leobon B, Kortas C, Grollmüss OE, Piot D, Planché C, Serraf A. Results of the double switch operation for congenitally corrected transposition of the great arteries. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009;35:879-83.
- Lynch HT, Mohiuddin S, Sketch MH, Krush AJ, Carter S, Runco V. Hereditary progressive atrioventricular conduction defect: a new syndrome? *JAMA.* 1973;225:1465–1470.
- Mah DY, Porras D, Bergersen L, Marshall AC, Walsh EP, Triedman JK. Incidence of and risk factors for catheterization-induced complete heart block in the pediatric cardiac catheterization laboratory. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2014;7:127-33.
- Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barcelo J, O'Hoy K, Leblond S, Earle-Macdonald J, De Jong PJ, Wieringa B, Korneluk RG. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science.* 1992;255:1253–1255.
- Mahle WT, Marx GR, Anderson RH. Anatomy and echocardiography of discordant atrioventricular connections. *Cardiol Young.* 2006;16 Suppl 3:65-71.
- Makita N, Sasaki K, Groenewegen WA, Yokota T, Yokoshiki H, Murakami T, Tsutsui H. Congenital atrial standstill associated with coinheritance of a novel SCN5A mutation and connexin 40 polymorphisms. *Heart Rhythm.* 2005;2:1128-34.
- Malloy MH. SIDS--a syndrome in search of a cause. *N Engl J Med.* 2004;351:957-9.

- Mangrum JM, DiMarco JP. The evaluation and management of bradycardia. *N Engl J Med*. 2000;342:703-9.
- Makita N, Seki A, Sumitomo N, Chkourko H, Fukuhara S, Watanabe H, Shimizu W, Bezzina CR, Hasdemir C, Mugishima H, Makiyama T, Baruteau A, Baron E, Horie M, Hagiwara N, Wilde AA, Probst V, Le Marec H, Roden DM, Mochizuki N, Schott JJ, Delmar M. A connexin40 mutation associated with a malignant variant of progressive familial heart block type I. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:163-72.
- Marino B, Chiariello L, Bosman C, Marsico F, Calabro R, Reale A, Marion B. Criss-cross heart with discordant atrioventricular connections. *Pediatr Cardiol*. 1982;3:315-8.
- Marino B, Digilio MC, Versacci P, Anaclerio S, Dallapiccola B. Transposition of great arteries. Understanding its pathogenesis. *Ital Heart J Suppl*. 2002;3:154-60.
- Marionneau C, Abriel H. Regulation of the cardiac Na⁺ channel NaV1.5 by post-translational modifications. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;82:36-47.
- Martínez Quintana E, Rodríguez González F, Agredo Muñoz J. Criss cross heart in a congenitally corrected transposition of the great arteries. *Int J Cardiol*. 2008;130:e81-2.
- Martins P, Castela E. Transposition of the great arteries. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:27.
- Marx GR. Echocardiography for discordant atrioventricular connections. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*. 2011;2:54-8.
- McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet*. 2008;40:1166-74.
- McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol* 2012; 100:253-77.
- McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, et al. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1650–1655.
- McKay R, Anderson RH, Smith A. The coronary arteries in hearts with discordant atrioventricular connections. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;111:988-97.
- McLerie M, Lopatin AN. Dominant-negative suppression of I(K1) in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:367–378.
- McMillan MR, Day TG, Bartsota M, Mead-Regan S, Bryant R, Mangat J, Abrams D, Lowe M, Kaski JP. Feasibility and outcomes of ajmaline provocation testing for Brugada syndrome in children in a specialist paediatric inherited cardiovascular diseases centre. *Open Heart*. 2014;1:e000023.
- McNair WP, Ku L, Taylor MR, Fain PR, Dao D, Wolfel E, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation*. 2004;110:2163-7.
- Michaelsson M, Engle MA. Congenital complete heart block: an international study of the natural history. *Cardiovasc Clin*. 1972;4:85–101.
- Michaelsson M, Riesenfeld T, Jonzon A. Natural history of congenital complete atrioventricular block. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1997;20:2098–2101.
- Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscione T, DiFrancesco D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med*. 2006;354:151–157.
- Mitchell EA, Krous HF. Sudden unexpected death in infancy: a historical perspective. *J Paediatr Child Health*. 2015;51:108-12.

- Miyazaki T, Mitamura H, Miyoshi S, Soejima K, Aizawa Y, Ogawa S. Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:1061-70.
- Mizusawa Y, Wilde AA. Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:606-16.
- Miyoshi T, Maeno Y, Sago H, Inamura N, Yasukouchi S, Kawataki M, Horigome H, Yoda H, Taketazu M, Shozu M, Nii M, Kato H, Hagiwara A, Omoto A, Shimizu W, Shiraishi I, Sakaguchi H, Nishimura K, Nakai M, Ueda K, Katsuragi S, Ikeda T. Fetal bradyarrhythmia associated with congenital heart defects - nationwide survey in Japan. *Circ J*. 2015;79:854-61.
- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne 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.
- Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, Boyett MR, Morris GM. The anatomy and physiology of the sinoatrial node-a contemporary review. *Pacing Clin Electrophysiol* 2010;33:1392-406.
- Moorman AF, Lamers WH. Molecular anatomy of the developing heart. *Trends Cardiovasc Med*. 1994;4:257-64.
- Moorman AF, Christoffels VM, Anderson RH. Anatomic substrates for cardiac conduction. *Heart Rhythm*. 2005;2:875-86.
- Morgan JA, Paone G, Brewer RJ. Long-term right ventricular assist device support for congenitally corrected transposition of the great arteries. *Heart Surg Forum*. 2013;16:E27-9.
- Morgenlander JC, Nohria V, Saba Z. EKG abnormalities in pediatric patients with myotonic dystrophy. *Pediatr Neurol*. 1993;9:124-126
- Morita H, Wu J, Zipes DP. The QT syndromes : long and short. *Lancet* 2008;372:750-63.
- Morquio L. Sur une maladie infantile et familiale caractérisée par des modifications permanentes du pouls, des attaques syncopales et épileptiformes et la mort subite. *Arch Med Enfants*. 1901;4:467-75.
- Moskowitz IP, Kim JB, Moore ML, Wolf CM, Peterson MA, Shendure J, Nobrega MA, Yokota Y, Berul C, Izumo S, Seidman JG, Seidman CE. A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development. *Cell*. 2007;129:1365-1376.
- Moss AJ, Zareba W, Benhorin J, Locati EH, Hall WJ, Robinson JL, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Lehmann MH. ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation*. 1995;92:2929-34.
- Moss AJ, ZarebaW, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, Vincent GM, Locati EH, Priori SG, Napolitano C, Medina A, Zhang L, Robinson JL, Timothy K, Towbin JA, Andrews ML. Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2000;101:616-623.
- Moss AJ, Zareba W, Schwarz KQ, Rosero S, McNitt S, Robinson JL. Ranolazine shortens repolarization in patients with sustained inward sodium current due to type-3 long-QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2008;19(12):1289-93.
- Muncke N, Jung C, Rudiger H, Ulmer H, Roeth R, Hubert A, Goldmuntz E, Driscoll D, Goodship J, Schon K, Rappold G. Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation*. 2003;108:2843-50.
- Munshi NV. Gene regulatory networks in cardiac conduction system development. *Circ Res* 2012; 110:1525-1537.

Nair K, Pekhletski R, Harris L, Care M, Morel C, Farid T, Backx PH, Szabo E, Nanthakumar K. Escape capture bigeminy: phenotypic marker of cardiac sodium channel voltage sensor mutation R222Q. *Heart Rhythm*. 2012;9:1681-1688.e1.

Nakajima K, Bunko H, Tonami N, Hisada K, Mukai K, Misaki T, Iwa T. Congenitally corrected transposition of the great arteries associated with the pre-excitation syndrome. *Clin Nucl Med*. 1986;11:564-7.

Nakano Y, Shimizu W. Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet*. 2015 Jun 25, in press.

Nakashima Y, Yanez DA, Touma M, Nakano H, Jaroszewicz A, Jordan MC, Pellegrini M, Roos KP, Nakano A. Nkx2-5 suppresses the proliferation of atrial myocytes and conduction system. *Circ Res*. 2014;114:1103–1113.

Nakaya H. SCN5A mutations associated with overlap phenotype of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome. *Circ J*. 2014;78:1061-2.

Nannenber EA, Sijbrands EJ, Dijkman LM, Alders M, van Tintelen JP, Birnie M, van Langen IM, Wilde AA. Mortality of inherited arrhythmia syndromes: insight into their natural history. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:183-9.

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;294:2975-80.

Napolitano C, Bloise R, Monteforte N, Priori SG. Sudden cardiac death and genetic ion channelopathies: long QT, Brugada, short QT, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation*. 2012;125:2027-34.

Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*. 2010;42:30-5.

Nguyen HL, Pieper GH, Wilders R. Andersen-Tawil syndrome: clinical and molecular aspects. *Int J Cardiol*. 2013;170:1-16.

Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, Pras E, Dascal N, Eldar M, Glikson M. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation*. 2007;116:463–470.

Obeyesekere MN, Antzelevitch C, Krahn AD. Management of ventricular arrhythmias in suspected channelopathies. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8:221-31.

Ohye RG, Si MS, Bove EL, Hirsch-Romano JC. Left Ventricular Retraining: Theory and Practice. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*. 2015;18:40-42.

Olesen MS, Yuan L, Liang B, Holst AG, Nielsen N, Nielsen JB, Hedley PL, Christiansen M, Olesen SP, Haunsø S, Schmitt N, Jespersen T, Svendsen JH. High prevalence of long QT syndrome-associated SCN5A variants in patients with early-onset lone atrial fibrillation. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:450-9.

Olson TM, Michels VV, Ballew JD, Reyna SP, Karst ML, Herron KJ, Horton SC, Rodeheffer RJ, Anderson JL. Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *JAMA*. 2005;293:447-54.

Orchard EA, Ormerod O, Myerson S, Westaby S. Congenitally corrected transposition of the great arteries presenting in a nonagenarian. *Circulation*. 2010;122:e441-4.

Osler W. On the so-called Stokes-Adams disease. *Lancet*. 1903;II:516-24.

- Ouyang P, Saarel E, Bai Y, et al. A de novo mutation in NKX2.5 associated with atrial septal defects, ventricular noncompaction, syncope and sudden death. *Clin Chim Acta* 2011; 412:170–175.
- Oyen N, Poulsen G, Wohlfahrt J, Boyd HA, Jensen PK, Melbye M. Recurrence of discordant congenital heart defects in families. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:122-8.
- Paladini D, Volpe P, Marasini M, Russo MG, Vassallo M, Gentile M, Calabrò R. Diagnosis, characterization and outcome of congenitally corrected transposition of the great arteries in the fetus: a multicenter series of 30 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2006;27:281-5.
- Paniagua Martín MJ, Almenar L, Brossa V, Crespo-Leiro MG, Segovia J, Palomo J, Delgado J, González-Vílchez F, Manito N, Lage E, García-Guereta L, Rodríguez-Lambert JL, Albert DC. Transplantation for complex congenital heart disease in adults: a subanalysis of the Spanish Heart Transplant Registry. *Clin Transplant*. 2012;26:755-63.
- Park DS, Fishman GI. The cardiac conduction system. *Circulation*. 2011;123:904-15.
- Pasquini L, Sanders SP, Parness I, Colan S, Keane JF, Mayer JE Jr, Kratz C, Foran RB, Marino B, Van Praagh S. Echocardiographic and anatomic findings in atrioventricular discordance with ventriculoarterial concordance. *Am J Cardiol*. 1988;62:1256-62.
- Patel CR, Spector ML, Zahka KG. Congenitally corrected transposition with pulmonary atresia and intact ventricular septum. *Cardiol Young*. 2000;10:268-70.
- Peltonen L, McKusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science*. 2001;29:1224-9.
- Peters NS, Rowland E, Bennett JG, Green CR, Anderson RH, Severs NJ. The Wolff-Parkinson- Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggreffe M, Camm J, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J*. 2015 Aug 29. pii: ehv316. [Epub ahead of print] No abstract available.
- White syndrome: the cellular substrate for conduction in the accessory atrioventricular pathway. *Eur Heart J*. 1994;15:981–987.
- Peyvandi S, Ingall E, Woyciechowski S, Garbarini J, Mitchell LE, Goldmuntz E. Risk of congenital heart disease in relatives of probands with conotruncal cardiac defects: an evaluation of 1,620 families. *Am J Med Genet A*. 2014;164A:1490-5.
- Pfeufer A, van Noord C, Marciante KD, Arking DE, Larson MG, Smith AV, et al. Genome-wide association study of PR interval. *Nat Genet*. 2010;42:153–159.
- Piacentini G, Digilio MC, Capolino R, Zorzi AD, Toscano A, Sarkozy A, D'Agostino R, Marasini M, Russo MG, Dallapiccola B, Marino B. Familial recurrence of heart defects in subjects with congenitally corrected transposition of the great arteries. *Am J Med Genet A* 2005;137:176-80.
- 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.
- Pond AL, Nerbonne JM. ERG proteins and functional cardiac I(Kr) channels in rat, mouse, and human heart. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:286-94.
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res*. 2002;91:e21–e26.

Postma AV, Denjoy I, Kamblock J, Alders M, Lupoglazoff JM, Vaksman G, Dubosq-Bidot L, Sebillon P, Mannens MM, Guicheney P, Wilde AA. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet.* 2005;42:863–870.

Postma AV, Christoffels VM, Bezzina CR. Developmental aspects of cardiac arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res.* 2011;91:243-51.

Pourrier M, Nattel S. Anchoring proteins and cardiac sudden death: how and why? *Med Sci.* 2004;20:437-41

Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation.* 1999;99:529-33.

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.

Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2001;103:196-200.

Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, 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;105:1342-7.

Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF/AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm.* 2013;10:1932–1963.

Pritchard JK, Cox NJ. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet.* 2002;11:2417-23.

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;41:643–652.

Probst V, Denjoy I, Meregalli PG, Amirault JC, Sacher F, Mansourati J, Babuty D, Villain E, Victor J, Schott JJ, Lupoglazoff JM, Mabo P, Veltmann C, Jesel L, Chevalier P, Clur SA, Haissaguerre M, Wolpert C, Le Marec H, Wilde AA. Clinical aspects and prognosis of Brugada syndrome in children. *Circulation.* 2007;115:2042-8.

Probst V, Wilde AA, Barc J, Sacher F, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Le Scouarnec S, Kyndt F, Le Caignec C, Guicheney P, Gouas L, Albuissou J, Meregalli PG, Le Marec H, Tan HL, Schott JJ. SCN5A mutations and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2:552-7.

Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, Sklar P, International Schizophrenia Consortium. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature.* 2009;460:748-52.

Quinn DW, McGuirk SP, Metha C, Nightingale P, de Giovanni JV, Dhillon R, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006;444:444-54.

Refaat MM, Hotait M, London B. Genetics of sudden cardiac death. *Curr Cardiol Rep.* 2015;17:606.

Remme CA, Wilde AAM, Bezzina CR. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18:78–87.

Remme CA, Verkerk AO, Hoogaars WM, Aanhaanen WT, Scicluna BP, Annink C, van den Hoff MJ, Wilde AA, van Veen TA, Veldkamp MW, de Bakker JM, Christoffels VM, Bezzina CR. The cardiac sodium channel displays differential distribution in the conduction system and transmural heterogeneity in the murine ventricular myocardium. *Basic Res Cardiol*. 2009;104:511-22.

Remme CA. Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects. *J Physiol* 2013;591:4099-116.

Remme CA, Wilde AA. Targeting sodium channels in cardiac arrhythmia. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;15:53-60.

Rijnbeek PR, Witsenburg M, Schrama E, Hess J, Kors JA. New normal limits for the paediatric electrocardiogram. *Eur Heart J*. 2001;22:702-11.

Rizzi N, Liu N, Napolitano C, Nori A, Turcato F, Colombi B, Biciato S, Arcelli D, Spedito A, Scelsi M, Villani L, Esposito G, Boncompagni S, Protasi F, Volpe P, Priori SG. Unexpected structural and functional consequences of the R33Q homozygous mutation in cardiac caldesmon: a complex arrhythmogenic cascade in a knock in mouse model. *Circ Res*. 2008;103:298–306.

Rosen MR. Gene therapy and biological pacing. *N Engl J Med*. 2014;371:1158-9.

Ruan Y, Liu N, Priori SG. Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:337–348.

Ruffatti A, Milanesi O, Chiandetti L, Cerutti A, Gervasi MT, De Silvestro G, Pengo V, Punzi L. A combination therapy to treat second-degree anti-Ro/La-related congenital heart block: a strategy to avoid stable third-degree heart block? *Lupus* 2012;21:666-71.

Rutledge JM, Nihill MR, Fraser CD, Smith OE, McMahon CJ, Bezold LI. Outcome of 121 patients with congenitally corrected transposition of the great arteries. *Pediatr Cardiol*. 2002;23:137-45.

Rautaharju PM, Surawicz B, Gettes LS, Bailey JJ, Childers R, Deal BJ, Gorgels A, Hancock EW, Josephson M, Kligfield P, Kors JA, Macfarlane P, Mason JW, Mirvis DM, Okin P, Pahlm O, van Herpen G, Wagner GS, Wellens H; American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; American College of Cardiology Foundation; Heart Rhythm Society. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part IV: the ST segment, T and U waves, and the QT interval: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society: endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *Circulation*. 2009;119:e241-50.

Ravens U, Wettwer E. Electrophysiological aspects of changes in heart rate. *Basic Res Cardiol*. 1998;93:60-5.

Sacher F, Probst V, Iesaka Y, Jacon P, Laborderie J, Mizon-Gérard F, Mabo P, Reuter S, Lamaison D, Takahashi Y, O'Neill MD, Garrigue S, Pierre B, Jaïs P, Pasquié JL, Hocini M, Salvador-Mazenq M, Nogami A, Amiel A, Defaye P, Bordachar P, Boveda S, Maury P, Klug D, Babuty D, Haïssaguerre M, Mansourati J, Clémenty J, Le Marec H. Outcome after implantation of a cardioverter-defibrillator in patients with Brugada syndrome: a multicenter study. *Circulation*. 2006;114:2317-24.

Schallert EK, Danton GH, Kardon R, Young DA. Describing congenital heart disease by using three-part segmental notation. *Radiographics*. 2013;33:E33-46.

Schleich JM, Abdulla T, Summers R, Houyel L. An overview of cardiac morphogenesis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2013;106:612-23.

Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest*. 2003;111:1537–1545.

- Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2.5. *Science*. 1998;281:108–111.
- 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;23:20–21.
- Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993;88:782–784.
- Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2000;343:262-7.
- Schwartz PJ, Priori SG, Bloise R, Napolitano C, Ronchetti E, Piccinini A, Goj C, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Wedekind H, Nastoli J. Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet*. 2001;358:1342-3.
- Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001;103:89-95.
- Schwartz PJ, Garson A Jr, Paul T, Stramba-Badiale M, Vetter VL, Wren C; European Society of Cardiology. Guidelines for the interpretation of the neonatal electrocardiogram. A task force of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2002;23:1329-44.
- Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, Bathen J, Amlie JP, Timothy K, Shkolnikova M, Berul CI, Bitner-Glindzicz M, Toivonen L, Horie M, Schulze-Bahr E, Denjoy I. The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation*. 2006;113:783-90.
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G, Gabbarini F, Goulene K, Insolia R, Mannarino S, Mosca F, Nespole L, Rimini A, Rosati E, Salice P, Spazzolini C. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2009;120:1761-7.
- Sharieff GQ, Rao SO. The pediatric ECG. *Emerg Med Clin North Am*. 2006;24:195-208.
- Sharland G, Tingay R, Jones A, Simpson J. Atrioventricular and ventriculoarterial discordance (congenitally corrected transposition of the great arteries): echocardiographic features, associations, and outcome in 34 fetuses. *Heart*. 2005;91:1453-8.
- Shea PM, Lutz JF, Vieweg WV, Corcoran FH, Van Praagh R, Hougen TJ. Selective coronary arteriography in congenitally corrected transposition of the great arteries. *Am J Cardiol*. 1979;44:1201-6.
- Sherwin ED, Triedman JK, Walsh EP. Update on interventional electrophysiology in congenital heart disease: evolving solutions for complex hearts. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013;6:1032-40.
- Shimeno K, Takagi M, Maeda K, Tatsumi H, Doi A, Yoshiyama M. Usefulness of multichannel Holter ECG recording in the third intercostal space for detecting type 1 Brugada ECG: comparison with repeated 12-lead ECGs. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2009;20:1026–1031.
- Shimizu W. Clinical impact of genetic studies in lethal inherited cardiac arrhythmias. *Circ J*. 2008;72:1926-36.
- Shimizu W. Update of diagnosis and management of inherited cardiac arrhythmias. *Circ J*. 2013;77:2867-72.

Skinner JR, Chung SK, Nel CA, Shelling AN, Crawford JR, McKenzie N, Pinnock R, French JK, Rees MI. Brugada syndrome masquerading as febrile seizures. *Pediatrics*. 2007;119:e1206-11.

Skinner JR. Investigation following resuscitated cardiac arrest. *Arch Dis Child* 2013;98:66-71.

Sicouri S, Antzelevitch C. Afterdepolarizations and triggered activity develop in a select population of cells (M cells) in canine ventricular myocardium: the effects of acetylstrophanthidin and Bay K 8644. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1991;14:1714-20.

Sim MM. Adaptation of the systemic right ventricle in a congenitally corrected transposition of the great arteries. *Circulation*. 2013;127:e448-50.

Smit AF, Riggs AD. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:1443-8.

Smits JP, Veldkamp MW, Wilde AA. Mechanisms of inherited cardiac conduction disease. *Europace*. 2005;7:122-37.

Smits JP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Opthof T, Bhuiyan ZA, Mannens MM, Balsler 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;38:969–981.

Sorgente A, Sarkozy A, De Asmundis C, Chierchia GB, Capulzini L, Paparella G, Henkens S, Brugada P. Ajmaline challenge in young individuals with suspected Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2011;34:736-41.

Sotodehnia N, Isaacs A, de Bakker PI, Doërr M, Newton-Cheh C, Nolte IM, et al. Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nat Genet*. 2010;42:1068 –1076.

Stallmeyer B, Zumhagen S, Denjoy I, Duthoit G, Hébert JL, Ferrer X, Maugenre S, Schmitz W, Kirchhefer U, Schulze-Bahr E, Guicheney P, Schulze-Bahr E. Mutational spectrum in the Ca(2+)-activated cation channel gene TRPM4 in patients with cardiac conductance disturbances. *Hum Mutat*. 2012;33:109-17.

Stennard FA, Harvey RP. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development*. 2005;132:4897–4910.

Sternick EB, Oliva A, Gerken LM, Magalhães L, Scarpelli R, Correia FS, Rego S, Santana O, Brugada R, Wellens HJ. Clinical, electrocardiographic, and electrophysiologic characteristics of patients with a fasciculoventricular pathway: the role of PRKAG2 mutation. *Heart Rhythm*. 2011;8:58-64.

Stroud DM, Gaussin V, Burch JB, Yu C, Mishina Y, Schneider MD, Fishman GI, Morley GE. Abnormal conduction and morphology in the atrioventricular node of mice with atrioventricular canal targeted deletion of Alk3/Bmpr1a receptor. *Circulation*. 2007;116:2535–2543.

Surawicz B, Childers R, Deal BJ, Gettes LS, Bailey JJ, Gorgels A, et al; American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; American College of Cardiology Foundation; Heart Rhythm Society. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part III: intraventricular conduction disturbances: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society: endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *Circulation*. 2009;119:e235-40.

Taggart NW, Haglund CM, Tester DJ, Ackerman MJ. Diagnostic miscues in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2007;115:2613-20.

- Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balser JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001;409:1043-7.
- Ta-Shma A, El-lahham N, Edvardson S, Stepensky P, Nir A, Perles Z, Gavri S, Golender J, Yaakobi-Simhayoff N, Shaag A, Rein AJ, Elpeleg O. Conotruncal malformations and absent thymus due to a deleterious NKX2-6 mutation. *J Med Genet*. 2014;51:268-70.
- Temple IP, Inada S, Dobrzynski H, Boyett MR. Connexins and the atrioventricular node. *Heart Rhythm*. 2013;10:297-304.
- Termignon JL, Leca F, Vouhé PR, Vernant F, Bical OM, Lecompte Y, Neveux JY. "Classic" repair of congenitally corrected transposition and ventricular septal defect. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:199-206.
- Tester DJ, Kopplin LJ, Will ML, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of cardiac ryanodine receptor (RyR2) mutations in a cohort of unrelated patients referred explicitly for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 2005;2:1099-105.
- Thammineni K, Lohr J, Trefz M, Sivanandam S. Familial recurrence of congenital heart diseases. *J Perinatol*. 2011;31:742-3.
- Therrien J, Barnes I, Somerville J. Outcome of pregnancy in patients with congenitally corrected transposition of the great arteries. *Am J Cardiol*. 1999;84:820-4.
- Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmabhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet*. 2001;10:189-94.
- Tseng CE, Di Donato F, Buyon JP. Stability of immunoblot profile of anti-SSA/Ro SSB/La antibodies over time in mothers whose children have neonatal lupus. *Lupus* 1996;5:212-215.
- Uemura H, Ho SY, Anderson RH, Gerlis LM, Devine WA, Neches WH, Yagihara T, Kawashima Y. Surgical anatomy of the coronary circulation in hearts with discordant atrioventricular connections. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1996;10:194-200.
- Unolt M, Putotto C, Silvestri LM, Marino D, Scarabotti A, Massaccesi V, Caiaro A, Versacci P, Marino B. Transposition of great arteries: new insights into the pathogenesis. *Front Pediatr* 2013;1:11.
- van den Berg MP, Wilde AA, Viersma TJW, Brouwer J, Haaksma J, van der Hout AH, Stolte-Dijkstra I, Bezzina TCR, Van Langen IM, Beaufort-Krol GC, Cornel JH 2nd, Crijns HJ. Possible bradycardic mode of death and successful pacemaker treatment in a large family with features of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2001;12:630-6.
- van den Boogaard M1, Wong LY, Tessadori F, Bakker ML, Dreizehnter LK, Wakker V, Bezzina CR, 't Hoen PA, Bakkers J, Barnett P, Christoffels VM. Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer. *J Clin Invest*. 2012;122:2519-30.
- van de Boogaard M, Smemo S, Burnicka-Turek O, Arnolds DE, van de Werken HJ, Klous P, McKean D, Muehlschlegel JD, Moosmann J, Toka O, Yang XH, Koopmann TT, Adriaens ME, Bezzina CR, de Laat W, Seidman C, Seidman JG, Christoffels VM, Norega MA, Barnett P, Moskowitz IP. *J Clin Invest* 2014;124:1844-52.
- van Hoesen DA, Blom MT, Tan HL. Cardiac sodium channels and inherited electrophysiological disorders: an update on the pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 2014;15:1875-87.
- van Mierop H. Localization of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heart beat. *Am J Physiol* 1967;212:407-15.

- van Praagh R, Van Praagh S, Vlad P, Keith JD. Anatomic types of congenital dextrocardia: diagnostic and embryologic implications. *Am J Cardiol.* 1964;13:510-531.
- van Praagh R. What is congenitally corrected transposition? *N Engl J Med.* 1970;282:1097-8.
- Van Praagh R. The segmental approach to diagnosis in congenital heart disease. *Birth Defects.* 1972;8:4.
- van Praagh R, Papagiannis J, Grünenfelder J, Bartram U, Martanovic P. Pathologic anatomy of corrected transposition of the great arteries: medical and surgical implications. *Am Heart J.* 1998;135:772-85.
- van Rijsingen IA, Arbustini E, Elliott PM, Mogensen J, Hermans-van Ast JF, van der Kooi AJ, van Tintelen JP, van den Berg MP, Pilotto A, Pasotti M, Jenkins S, Rowland C, Aslam U, Wilde AA, Perrot A, Pankuweit S, Zwiderman AH, Charron P, Pinto YM. Risk factors for malignant ventricular arrhythmias in lamin a/c mutation carriers a European cohort study. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:493-500.
- van Son JA, Danielson GK, Huhta JC, Warnes CA, Edwards WD, Schaff HV, Puga FJ, Ilstrup DM. Late results of systemic atrioventricular valve replacement in corrected transposition. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;109:642-52.
- van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res.* 2001;51:217-29.
- Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, Aihara N, Nademanee K, Brugada R, Brugada J, Veerakul G, Li H, Bowles NE, Brugada P, Antzelevitch C, Towbin JA. Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet.* 2002;11:337-345.
- Veerman CC, Wilde AA, Lodder EM. The cardiac sodium channel gene SCN5A and its gene product NaV1.5: Role in physiology and pathophysiology. *Gene.* 2015 Sep 8. pii: S0378-1119(15)01060-4.
- Veltman JA, Brunner HG. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13:565-75.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291:1304-51.
- Vidaillet HJ Jr, Pressley JC, Henke E, Harrell FE Jr, German LD. Familial occurrence of accessory atrioventricular pathways (preexcitation syndrome). *N Engl J Med.* 1987;317:65-69.
- Villain E, Coatsdoat-Chalumeau N, Marijon E, Boudjemline Y, Piette JC, Bonnet D. Presentation and prognosis of complete atrioventricular block in childhood, according to maternal antibody status. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1682-7.
- Vinogradova TM, Bogdanov KY, Lakatta EG. β -Adrenergic stimulation modulates ryanodine receptor Ca(2+) release during diastolic depolarization to accelerate pacemaker activity in rabbit sinoatrial nodal cells. *Circ Res.* 2002;90:73-79.
- Viswanathan PC, Benson DW, Balsler JR. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest* 2003;111:341-6.
- Wallis GA, Debich-Spicer D, Anderson RH. Congenitally corrected transposition. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:22.
- Walsh EP, Cecchin F. Arrhythmias in adult patients with congenital heart disease. *Circulation.* 2007;115:534-45.

- Wand DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL, Benson W. Clinical, genetic and biophysical characterisation of SCN5A mutations associated with atrioventricular block. *Circulation* 2002;105:341-6.
- 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.
- 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.
- Wang DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL Jr, Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation*. 2002;105:341-6.
- Wang DW, Crotti L, Shimizu W, Pedrazzini M, Cantu F, De Filippo P, Kishiki K, Miyazaki A, Ikeda T, Schwartz PJ, George AL Jr. Malignant perinatal variant of long-QT syndrome caused by a profoundly dysfunctional cardiac sodium channel. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2008;1:370-8.
- Warnes CA. Transposition of the great arteries. *Circulation*. 2006;114:2699-709.
- Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott JJ, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesfeld AC, Pfeufer 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;118:2260–2268.
- Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011;4:874–881.
- Watanabe H, Minamino T. Genetics of Brugada syndrome. *J Hum Genet*. 2015 Jul 30. doi: 10.1038/jhg.2015.97.
- Wedekind H, Smits JP, Schulze-Bahr E, Arnold R, Veldkamp MW, Bajanowski T, Borggrefe M, Brinkmann B, Warnecke I, Funke H, Bhuiyan ZA, Wilde AA, Breithardt G, Haverkamp W. De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death. *Circulation*. 2001;104:1158-64.
- Wellcome Trust Case Control Consortium; Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*. 2007;39:1329-37.
- Wendkos MH. Familial congenital complete AV heart blocks. *Am Heart J*. 1947;34:138-42.
- Westerman GR, Lang P, Castaneda AR, Norwood WI. Corrected transposition and repair of associated intracardiac defects. *Circulation*. 1982;66:1197-202.
- Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA; Study Group on the Molecular Basis of Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. Arrhythmias of the European Society of Cardiology. *Circulation*. 2002;106:2514-9.
- Wilders R. A note on the prevalence of cardiac ion channelopathies in the sudden infant death syndrome. *Europace*. 2015 Jun 7. pii: euv081. [Epub ahead of print]
- Wilkinson JL, Smith A, Lincoln C, Anderson RH. Conducting tissues in congenitally corrected transposition with situs inversus. *Br Heart J*. 1978;40:41-8.

Wilkinson JL, Cochrane AD, Karl TR. Congenital Heart Surgery Nomenclature and Database Project: corrected (discordant) transposition of the great arteries (and related malformations). *Ann Thorac Surg*. 2000;69:S236-48.

Wilkinson JL, Anderson RH. Anatomy of discordant atrioventricular connections. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*. 2011;2:43-53.

Wolf CM, Berul CI. Inherited conduction system abnormalities--one group of diseases, many genes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006;17:446-55.

Wolf CM, Wang L, Alcalai R, Pizard A, Burgon PG, Ahmad F, Sherwood M, Branco DM, Wakimoto H, Fishman GI, See V, Stewart CL, Conner DA, Berul CI, Seidman CE, Seidman JG. Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44:293-303.

Wong LC, Behr ER. Sudden unexplained death in infants and children: the role of undiagnosed inherited cardiac conditions. *Europace*. 2014;16:1706-13.

Wong LC, Roses-Noguer F, Till JA, Behr ER. Cardiac evaluation of pediatric relatives in sudden arrhythmic death syndrome: a 2-center experience. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014;7:800-6.

Yamakawa Y, Ishikawa T, Uchino K, Mochida Y, Ebina T, Sumita S, Kobayashi T, Matsushita K, Matsumoto K, Ohkusu Y, Nishizawa T, Takigiku K, Iwamoto M, Kimura K, Umemura S. Prevalence of right bundle-branch block and right precordial ST-segment elevation (Brugada-type electrocardiogram) in Japanese children. *Circ J*. 2004;68:275-9.

Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, Romano-Adesman A, Bjornson RD, Breitbart RE, Brown KK, Carriero NJ, Cheung YH, Deanfield J, DePalma S, Fakhro KA, Glessner J, Hakonarson H, Italia MJ, Kaltman JR, Kaski J, Kim R, Kline JK, Lee T, Leipzig J, Lopez A, Mane SM, Mitchell LE, Newburger JW, Parfenov M, Pe'er I, Porter G, Roberts AE, Sachidanandam R, Sanders SJ, Seiden HS, State MW, Subramanian S, Tikhonova IR, Wang W, Warburton D, White PS, Williams IA, Zhao H, Seidman JG, Brueckner M, Chung WK, Gelb BD, Goldmuntz E, Seidman CE, Lifton RP. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature* 2013; 498:220–223.

Zareba W, Moss AJ. Long QT syndrome in children. *J Electrocardiol*. 2001;34 Suppl:167-71.

Zhang H, Holden AV, Kodama I, Honjo H, Lei M, Varghese T, Boyett MR. Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol*. 2000;279:H397–H421.

Zhang L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schwartz PJ, George AL, Horie M, Andelfinger G, Snow GL, Fu YH, Ackerman MJ, Vincent GM. Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 mutations: characteristic T-U-wave patterns predict the KCNJ2 genotype. *Circulation*. 2005;111:2720–2726.

Thèse de Doctorat

Alban-Elouen BARUTEAU

Bases Génétiques et Moléculaires du Bloc Atrio-Ventriculaire Diagnostiqué *In Utero* et au cours de l'Enfance

Genetic and molecular basis of atrio-ventricular block diagnosed *in utero* or early childhood

Résumé

Le bloc atrioventriculaire (BAV) est une maladie rare. Les bases génétiques des BAV héréditaires restent mal comprises. Pour préciser la physiopathologie des BAV héréditaires de l'enfant, nous avons mené différents travaux sur le BAV (1) isolé et non-immun, (2) associé aux canalopathies sodiques; (3) associé aux cardiopathies congénitales.

Une étude colligeant 141 enfants porteurs d'un BAV "idiopathique", 130 parents et 130 contrôles appariés, a pu montrer une forte héritabilité du BAV, nous conduisant à constituer une DNA-thèque sur ce phénotype. Une approche gène candidat a identifié des mutations au sein des gènes *GJA5*, *SCN5A*, *SCN1B*, *NKX2.5* et *TRPM4*. L'analyse de trios familiaux a identifié 19 variants *de novo* et 2630 variants hétérozygotes composites dont la validation est en cours.

Un second projet nous a permis d'étudier les relations génotype-phénotype chez 439 enfants porteurs d'une mutation *SCN5A*. Les troubles conductifs étaient associés aux mutations tronquantes et/ou situées dans le domaine transmembranaire du canal sodique. Un BAV était associé au risque d'arrêt cardiaque au cours du suivi.

Nous avons également montré dans une série de 47 patients mutés *NKX2.5*, que si le phénotype est dominé par des anomalies simples de septation et des troubles conductifs, ces patients peuvent évoluer vers le BAV de haut grade, la cardiomyopathie dilatée et la mort subite.

Enfin un projet a été initié avec 64 institutions, pour préciser les caractéristiques des BAV associés aux discordances atrioventriculaires.

Une meilleure compréhension des bases génétiques du BAV de l'enfant et des relations génotype-phénotype permettra d'améliorer leur prise en charge.

Mots clés

Bloc atrioventriculaire; conduction cardiaque; pédiatrie; génétique; mutation; mort subite; devenir; congénital.

Abstract

Atrioventricular block (AVB) is a rare disorder. Genetic basis of inherited AVB remain incompletely understood. To better characterize the physiopathology of inherited AVB in children, we conducted various projects focused on AVB (1) isolated non-immune; (2) *SCN5A* associated; (3) associated with congenital heart disease.

A study on 141 children affected by an idiopathic AVB, 130 parents and 130 matched controls, strongly supporting the hypothesis of an inheritable trait. A candidate gene approach identified mutations in *GJA5*, *SCN5A*, *SCN1B*, *NKX2.5* and *TRPM4* genes. Trios analysis identified 19 *de novo* variants and 2630 compound heterozygous variants (ongoing analysis).

In another project, we studied genotype-phenotype correlations on 439 *SCN5A* mutation carriers children. Conduction disorders were associated with truncation mutations and mutations localized in the transmembrane region. AVB was predictor of sudden death throughout follow-up.

We shown in a 47 *NKX2.5* mutation-positive patients series that, if phenotypic spectrum is dominated by septal defects and conduction abnormalities, patients are also exposed to high-grade AVB, dilated cardiomyopathy and sudden death.

Lastly, a 64-institutions research project was started to assess characteristics of AVB associated with atrioventricular discordance.

A better understanding of the genetic mechanisms underlying pediatric AVB and their genotype-phenotype correlations will help to improve patients' management.

Key Words

Atrioventricular block; cardiac conduction; pediatrics; genetics; mutation; sudden death; outcomes; congenital.